

Ю.С. Ченцов

# ЦИТОЛОГИЯ с элементами клеточной патологии

Учебное пособие  
для университетов и медицинских вузов

*Рекомендовано ГОУ ВПО «Московская медицинская академия имени И.М. Сеченова» в качестве учебного пособия для студентов учреждений высшего профессионального образования, обучающихся по медико-биологическим дисциплинам, в частности, по «Гистология. Эмбриология. Цитология», по специальностям 060101.65 «Лечебное дело», 060103.65 «Педиатрия», 060104.65 «Медико-профилактическое дело» и 060105.65 «Стоматология»*



ИЗДАТЕЛЬСТВО «МЕДИЦИНСКОЕ ИНФОРМАЦИОННОЕ АГЕНТСТВО»  
МОСКВА  
2010

УДК 576  
ББК 28.65  
Ч43

Получена положительная рецензия уполномоченного учреждения.  
Регистрационный номер базового учреждения ФГУ ФИРО 537 от 10 июля 2009 г.

**Ченцов Ю.С.**

Ч43 Цитология с элементами клеточной патологии: Учебное пособие для университетов и медицинских вузов. — М.: Издательство «Медицинское информационное агентство», 2010. — 368 с.: ил.

ISBN 978-5-9986-0013-5

Учебное пособие «Цитология с элементами клеточной патологии» выходит в свет к 150-летию издания «Целлюлярной патологии» знаменитого немецкого ученого Рудольфа Вирхова.

Приводятся основные сведения о клетках позвоночных животных и человека, о внутриклеточных структурах, даются основные представления о биохимических и функциональных свойствах клеточных органелл, а также об их характерных патологических изменениях. Описаны свойства отдельных структурно-функциональных систем: ядро, мембрана, вакуолярная система и т.д.

Анализируются главные физиологические аспекты жизнедеятельности клеток как таковых. Отдельные главы посвящены общей патологии клеток, приводящей к структурным и функциональным нарушениям их жизнедеятельности. Рассматриваются изменения клеточных структур при некрозе, при программированной клеточной гибели, при апоптозе, аутофагии, митотических катастрофах и др.

Для студентов и аспирантов университетов, медицинских и ветеринарных вузов, а также для научных работников, интересующихся клеточной биологией.

УДК 576  
ББК 28.65

ISBN 978-5-9986-0013-5

© Ченцов Ю.С., 2010  
© Оформление. ООО «Издательство  
«Медицинское информационное агентство», 2010

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав.

# Оглавление

<b>Предисловие</b> .....	5	<b>Глава 6. Ядерный белковый матрикс</b> .....	101
<b>Часть I. ВВЕДЕНИЕ: ПРЕДМЕТ ЦИТОЛОГИИ</b> .....	7	1. Общий состав ядерного белкового матрикса .....	101
<b>Глава 1. Клеточная теория</b> .....	9	2. ДНК ядерного белкового матрикса .....	104
1. Клетка — элементарная единица живого .....	10	<b>Глава 7. Четвертый — хромонемный — уровень упаковки хроматина</b> .....	107
2. Клетка — единая система сопряженных функциональных единиц .....	14	Тотальное строение митотических хромосом .....	109
3. Гомологичность клеток .....	16	<b>Глава 8. Ядерные транскрипты и их транспорт</b> .....	116
4. Клетка от клетки .....	18	1. Ядрышко — источник рибосом .....	117
5. Клетки и многоклеточный организм .....	19	2. Строение рибосом .....	118
6. Тотипотентность клеток многоклеточных организмов .....	20	3. Чем определяется число ядрышек в клетке .....	120
<b>Глава 2. Центральная догма клеточной биологии</b> .....	23	4. Множественность рибосомных генов .....	121
<b>Глава 3. Методы современной клеточной биологии — цитологии</b> .....	32	5. Строение и функционирование генов рРНК .....	122
1. Световая микроскопия .....	32	6. Ультраструктура ядрышка .....	126
2. Витальное (прижизненное изучение) клеток .....	36	7. Структурно-функциональные типы ядрышек .....	131
3. Изучение фиксированных клеток .....	39	8. Белки ядрышек .....	132
4. Электронная микроскопия .....	42	9. Общая схема работы ядрышек как специального локуса синтеза рибосом .....	133
5. Фракционирование клеток .....	48	10. Ядрышко во время митоза: периферический хромосомный материал .....	135
<b>Часть II. СТРОЕНИЕ И ХИМИЯ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА</b> .....	50	<b>Глава 9. Нерибосомные продукты клеточного ядра</b> .....	138
<b>Глава 4. Морфология ядерных структур</b> .....	50	1. Транскрипция информационных РНК .....	138
1. Роль ядерных структур в жизнедеятельности клетки .....	50	2. Морфология РНП-компонентов в ядре .....	140
2. Ядерные компоненты прокариот .....	52	<b>Глава 10. Ядерная оболочка</b> .....	144
3. Ядро эукариотических клеток .....	55	1. Компоненты ядерной оболочки .....	145
4. Эухроматин и гетерохроматин .....	60	2. Роль ядерной оболочки в ядерно- цитоплазматическом обмене .....	149
5. Хромосомный цикл .....	62	3. Импорт кариофильных белков .....	150
6. Общая морфология митотических хромосом .....	63	4. Экспорт из ядра в цитоплазму .....	152
7. Клеточный цикл эукариот .....	68	5. Динамика ядерной оболочки в митозе .....	153
8. Полиплоидия, анеуплоидия .....	72	<b>Часть III. СТРОЕНИЕ И ХИМИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ</b> .....	157
9. Пространственное расположение хромосом в интерфазном ядре .....	74	<b>Глава 11. Гиалоплазма и органеллы</b> .....	158
<b>Глава 5. Структура и химия хроматина</b> .....	78	<b>Глава 12. Общие свойства биологических мембран — липопротеидных комплексов</b> .....	161
1. ДНК хроматина .....	79	1. Структурной основой мембран является двойной слой липидов .....	161
2. Репликация эухроматических ДНК .....	83	2. Мембранные белки встроены в билипидный слой .....	164
3. Основные белки хроматина — гистоны .....	86	3. Липиды и белки мембран обладают латеральной подвижностью .....	166
4. Функциональные свойства гистонов .....	88	4. Асимметричность клеточных мембран .....	167
5. Гистоны образуют первый, нуклеосомный, уровень компактизации ДНК .....	89	5. Различные мембраны имеют различные свойства .....	168
6. Нуклеосомы при репликации и транскрипции .....	93	6. Связь мембран с цитоплазматическими белками .....	169
7. Второй уровень компактизации ДНК — 30 нм фибрилла .....	94	7. Рост некоторых мембран происходит за счет встраивания мембранных пузырьков .....	170
8. Негистоновые белки .....	97		
9. Петлевые домены ДНК — третий уровень структурной организации хроматина .....	98		

<b>Глава 13. Плазматическая мембрана, плазмолемма</b> .....	171
1. Барьерно-транспортная роль плазмолеммы .....	171
2. Трансмембранный перенос ионов и низкомолекулярных соединений .....	173
3. Везикулярный перенос: эндоцитоз и экзоцитоз .....	176
4. Рецепторно-сигнальная роль плазмолеммы .....	185
5. Межклеточное узнавание .....	188
6. Специальные структурные межклеточные соединения .....	190
<b>Глава 14. Вакуолярная система внутриклеточного транспорта</b> .....	200
1. Общая схема функционирования вакуолярной системы .....	201
2. Гранулярный эндоплазматический ретикулум .....	202
3. Котрансляционный перенос растворимых белков .....	205
4. Синтез нерастворимых (мембранных) белков .....	206
5. Синтез клеточных мембран .....	208
6. Транспорт между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи .....	210
<b>Глава 15. Аппарат (комплекс) Гольджи</b> .....	212
1. Тонкое строение аппарата Гольджи .....	212
2. Секреторная функция аппарата Гольджи .....	215
3. Модификация белков в аппарате Гольджи .....	217
4. Сортировка белков в аппарате Гольджи .....	218
<b>Глава 16. Лизосомы</b> .....	222
1. Общая характеристика лизосом .....	222
2. Лизосомные патологии .....	226
<b>Глава 17. Другие мембранные компоненты вакуолярной системы</b> .....	227
1. Гладкий (агранулярный) эндоплазматический ретикулум .....	227
2. Пероксисомы (микротельца) .....	230
<b>Часть IV. СИСТЕМА ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ КЛЕТОК</b> .....	233
<b>Глава 18. Митохондрии — строение и функции</b> .....	235
1. Общая морфология .....	235
2. Ультраструктура митохондрий .....	237
3. Функции митохондрий .....	239
4. Увеличение числа митохондрий .....	244
5. Авторепродукция митохондрий .....	245
6. Хондриом .....	247
<b>Часть V. Опорно-двигательная система (цитоскелет) клетки</b> .....	253
<b>Глава 19. Промежуточные филаменты</b> .....	256
<b>Глава 20. Микрофиламенты</b> .....	259
1. Общие свойства микрофиламентов .....	259
2. Акто-миозиновые комплексы немышечных клеток .....	264
3. Мышечные клетки .....	267
<b>Глава 21. Микротрубочки</b> .....	271
1. Общая характеристика микротрубочек .....	271
2. Центр организации микротрубочек .....	275
3. Динеины и кинезины — моторные белки .....	276
<b>Глава 22. Клеточный центр</b> .....	279
1. Центросомы и центриоли .....	279
2. Центросомный цикл .....	284
3. Базальные тельца. Строение и движение ресничек и жгутиков .....	288
<b>Часть VI. Жизненный цикл клетки</b> .....	296
<b>Глава 23. Митотическое деление клеток. Общая организация митоза</b> .....	296
1. Морфология митотической фигуры .....	297
2. Центромеры и кинетохоры .....	299
3. Механика митоза .....	302
4. Патологические формы митотического деления .....	312
5. Деление бактериальных клеток .....	317
<b>Глава 24. Мейоз</b> .....	320
1. Особенности профазы I мейотического деления .....	321
2. Стадии профазы I мейотического деления .....	323
3. Второе мейотическое деление .....	330
<b>Глава 25. Регуляция клеточного цикла</b> .....	333
1. Фактор стимуляции митоза .....	333
2. Циклины .....	336
3. Регуляция клеточного цикла у млекопитающих .....	338
4. Контрольные точки клеточного цикла .....	341
<b>Глава 26. Пути гибели клеток</b> .....	343
1. Реакция клеток на повреждение .....	343
2. Некроз .....	348
3. Программированная клеточная гибель: апоптоз, аутофагия и др. ....	350

## Предисловие

В 2008 году исполнилось 150 лет со дня выхода в свет монографии великого немецкого исследователя Рудольфа Вирхова «Целлюлярная патология»<sup>1</sup> (рис. 1). Эта книга имела важнейшее научное значение не только для медицины, но и для общей биологии. В ней Вирхов выдвигал и отстаивал два основных положения: во-первых, он считал, что всякое болезненное изменение организма обязательно связано с каким-либо патологическим процессом именно в клетках, составляющих организм, и тем самым резко подчеркивал значение клетки как элементарной единицы и основы его патологических изменений, т.е. нормальная жизнь организма и его патологическое состояние лежат в основе жизнедеятельности клеток. Поэтому со времен Вирхова изучение клетки становится в центре внимания и биолога, и физиолога, и патолога, и врача. Во-вторых, Р. Вирхов активно пропагандировал клеточную теорию, сформулированную еще в 1838 г. Т. Шванном. К ней Вирхов добавил принципиальный тезис о том, что возникновение новых клеток происходит только путем их образования из предшествующих. Его афоризм «клетка только от клетки», или «*omnis cellula e cellula*» стал общебиологическим законом. Вирхов писал: «Там, где возникает клетка, должна была предшествовать клетка, подобно тому, как животное происходит только от животного, растение — только от растения.»<sup>2</sup>



Рис. 1. Рудольф Вирхов (1821–1902)

Из основных представлений Р. Вирхова стало определено ясно, что «клетка действительно есть последний морфологический элемент всех живых тел, и что мы не имеем права искать настоящей жизнедеятельности вне ее»<sup>2</sup>. Клетка — единица жизнедеятельности, единица развития многоклеточных организмов, единица функционирования в самых различных органах, единица патологических изменений. Без знания базисных основ строения и функционирования отдельных клеточных компонентов и клетки в целом невозможно понять основы

<sup>1</sup> R. Virchow, 1858, Die Cellularpathologie, Berlin.

<sup>2</sup> Цит. по Р. Вирхов: «Патология, основанная на теории ячеек (целлюлярная патология) в применении к микроскопической анатомии нормальных и ненормальных тканей». — Москва, 1859 г.

патологических изменений клеток, которые приводят ко многим болезненным проявлениям многоклеточного макроорганизма.

Читатель-студент, ознакомившись с этим предисловием, не должен думать, что этот учебник излагает данные обо всех патологических изменениях клеток и тканей. Эту задачу решает другая обширная дисциплина — патологическая анатомия. Однако в данном учебнике хотелось отобразить наиболее общие структурные признаки патологии клеток, возникающие при их повреждении, старении и гибели.

Задачей данного издания «Цитология», адресованного главным образом к студентам-медикам и биологам, автор ставит перед собой цель — дать общие, главные представления о том, как устроены клетки, показывает общность их структурной организации, ограничиваясь описанием строения, особенностей организации и поведения, главным образом, клеток позвоночных животных (в том числе и человека). Автор намеренно опустил раздел, посвященный цитологии растений, однако счел необходимым привести сведения об основных морфологических и функциональных особенностях некоторых микроорганизмов, главных биологических врагов человека и животных.

# Часть I

## ВВЕДЕНИЕ:

### ПРЕДМЕТ ЦИТОЛОГИИ

*Цитология* (от греч. *kytos* — ячейка, клетка) — наука о клетке, предметом ее исследования является элементарная живая микроскопическая система, которая может существовать отдельно (бактерии, протисты) и в виде сложных ансамблей (многоклеточных организмов), таких, как животные и растения.

Цитология — наука о клетке, в современном звучании — **биологии клетки** — наука довольно молодая. Из среды других биологических наук она выделилась почти 100 лет назад. Впервые обобщенные сведения о строении клеток были собраны в книге Ж-Б. Карнуа «Биология клетки», вышедшей в 1884 г.

За последние 50 лет цитология из описательно-морфологической превратилась в экспериментальную науку, ставящую перед собой задачи изучения физиологии клетки, ее основных жизненных функций и свойств, ее биологии. Другими словами, современная цитология — это физиология клетки. Возможность такого переключения интересов исследователей возникла в связи с тем, что цитология тесно сопряжена с научными и методическими достижениями биохимии, биофизики, молекулярной биологии и генетики.

Цитология как наука возникла при изучении микроанатомии растений и животных, ее основным методом была световая микроскопия. В начале своего развития, вплоть до первых десятилетий прошлого века, цитология являлась, главным образом, описательно-морфологической дисциплиной, тесно связанной с гистологией, которая, в свою очередь, была базисом для развития физиологии. Но уже с 30-х годов XX века в связи с успехами генетики, физики и химии цитология стала использовать новые эффективные методы исследований, как химические (цито- и гистохимия, радиоавтография), так и физические (люминесцентная, интерференционная световая микроскопия), что дало начало развитию цито-физиологических исследований. Наконец, введение в практику цитологических исследований электронной микроскопии (50-е годы XX века) открыло новую страницу не только в изучении клеток и тканей, но и преобразовало всю биологию в целом. Цитология перешла с уровня морфологических описаний на новый качественный уровень, позволяющий изучать клеточные структуры на молекулярном уровне в тесной связи с методами биохимии и молекулярной биологии.

Это послужило основой для углубленного изучения клетки как таковой, для изучения ее общих свойств и функционирования уже с позиций этих наук, что и дало основание для появления некоей синтетической науки о клетке, а именно **биологии клетки** или, как чаще называют, **клеточной биологии**.

В этой науке плодотворно сочетаются как морфологические, так и молекулярно-биологические подходы; это позволяет в настоящее время считать, что термины **цитология и биология клетки** совпадают, т.к. их предметом изучения является клетка, имеющая свои собственные закономерности организации и функционирования.

Дисциплина «Цитология» относится к фундаментальным разделам биологии, т.к. она исследует и описывает единственную единицу всего живого на Земле — клетку. Познание клетки имеет важнейшее значение для развития множества других биологических наук, таких как физиология, генетика, молекулярная биология и др., т.к. дает им как бы субстрат, материал для изучения отдельных свойств именно клеток: все функциональные отправления организмов имеют клеточную основу. Огромное значение современная цитология, или биология клетки, имеет для медицины, как на это указал в свое время Р. Вирхов, так как любые заболевания человеческого организма своей основой имеют патологию конкретных клеток или их групп, что важно для понимания развития болезни, для ее диагностики и для выбора методов лечения и профилактики заболевания. Длительное и пристальное изучение клетки как таковой привело к формулированию важного теоретического обобщения, формулированию так называемой клеточной теории, имеющей огромное общebiологическое значение.

# Глава 1

## Клеточная теория

**Клеточная теория** — это обобщенные представления о строении клеток как единиц живого, об их размножении и роли в формировании многоклеточных организмов.

Появлению и формулированию отдельных положений клеточной теории предшествовал довольно длительный (более трехсот лет) период накопления наблюдений над строением различных одноклеточных и многоклеточных организмов растений и животных. Этот период был связан с развитием и совершенствованием различных оптических методов исследований и расширением их применения.

Роберт Гук (1665) первым наблюдал с помощью увеличительных линз подразделение тканей пробки на «ячейки», или «клетки», которые представляли собой только внешние целлюлозные оболочки («ячейки») растительных клеток, но отнюдь не их содержимое. Его описания послужили толчком для появления систематических исследований анатомии растений (Мальпиги, 1671; Грю, 1671), которые подтвердили наблюдения Роберта Гука и показали, что разнообразные части растений состоят из тесно расположенных «пузырьков», или «мешочков». Позднее А. Левенгук (1680) открыл мир одноклеточных организмов и впервые увидел клетки животных (эритроциты). Позднее клетки животных были описаны Ф. Фонтана (1781); но эти и другие многочисленные исследования не привели в то время к пониманию универсальности клеточного строения, к четким представлениям о том, что же являет собой клетка. Прогресс в изучении микроанатомии и клетки связан с развитием микроскопирования в XIX в. К этому времени изменились представления о строении клеток: главным в организации клетки стала считаться не клеточная стенка, а собственно ее содержимое, *протоплазма* (Пуркиня, 1830). В протоплазме был открыт постоянный компонент клетки — *ядро* (Браун, 1833). Все эти многочисленные наблюдения позволили Т. Шванну в 1838 г. сделать ряд обобщений. Он показал, что клетки растений и животных принципиально сходны между собой (гомологичны). «Заслуга Т. Шванна заключалась не в том, что он открыл клетки как таковые, а в том, что он научил исследователей понимать их значение» (Вальдейер, 1909).

Именно Т. Шванн в 1838 г. ввел термин «клеточная теория», которым подчеркивал общность как строения клеток, так и их функциональное значение — способность их к росту, развитию и дифференцировке (специализации).

Дальнейшее развитие этих представлений получило в работах Р. Вирхова (1858), который заложил основы целлюлярной клеточной патологии и тем самым указал в медицине истинный путь исследований. После этого клеточная теория стала

исходной базой для развития многих положений как в медицине, так и в биологии. Поэтому мы вправе называть клеточную теорию теорией Шванна–Вирхова.

Создание клеточной теории стало важнейшим событием в естествознании, одним из решающих доказательств единства всей живой природы. Клеточная теория оказала значительное влияние на развитие биологии, послужила главным фундаментом для развития таких дисциплин, как эмбриология, гистология и физиология. Она дала основы для понимания жизни, для объяснения родственной взаимосвязи организмов, для понимания индивидуального развития.

Основные положения клеточной теории сохранили свое значение и на сегодняшний день, хотя более чем за 150 лет были получены новые сведения о структуре, жизнедеятельности и развитии клеток.

### **В настоящее время клеточная теория постулирует:**

1. Клетка — элементарная единица живого: вне клетки нет жизни.
2. Клетка — единая система, состоящая из множества закономерно связанных друг с другом элементов, представляющих определенное целостное образование, состоящее из сопряженных функциональных единиц — органелл или органоидов.
3. Клетки сходны — гомологичны — по строению и по основным свойствам.
4. Клетки увеличиваются в числе путем деления исходной клетки после удвоения ее генетического материала (ДНК): клетка от клетки.
5. Многоклеточный организм представляет собой новую систему, сложный ансамбль из множества клеток, объединенных и интегрированных в системы тканей и органов, связанных друг с другом с помощью химических факторов, гуморальных и нервных (молекулярная регуляция).
6. Клетки многоклеточных организмов тотипотентны, т.е. обладают равными генетическими потенциями всех клеток данного организма, равнозначны по генетической информации, но отличаются друг от друга разной экспрессией (работой) различных генов, что приводит к их морфологическому и функциональному разнообразию — к дифференцировке.

## **1. Клетка — элементарная единица живого**

Представление о клетке как о самостоятельной жизнедеятельной единице было дано еще в работах Т. Шванна. Р. Вирхов также считал, что каждая клетка несет в себе полную характеристику жизни: «Клетка есть последний морфологический элемент всех живых тел, и мы не имеем права искать настоящей жизнедеятельности вне ее» (1858).

Современная наука полностью доказала это положение. В популярной литературе клетку часто называют «атомом жизни», «квантом жизни», подчеркивая тем самым, что клетка — это наименьшая единица живого, вне которой нет жизни.

Такая общая характеристика клетки должна в свою очередь опираться на определение живого — что такое живое, что такое жизнь. Очень трудно дать окончательное определение живого, жизни.

По Вирхову «жизнь есть деятельность клетки, особенностью первой есть особенность и последней»<sup>1</sup>. Б.М. Медников (1982) пишет: «Можно сформулировать определение жизни следующей фразой: жизнь — это активное, идущее с затратой энергии поддержание и воспроизведение специфической структуры»<sup>2</sup>.

М.В. Волькенштейн (1965) дает следующее определение жизни: «Живые организмы представляют собой открытые (т.е. обменивающиеся с окружающей средой веществом и энергией), саморегулирующиеся и самовоспроизводящиеся системы, важнейшими функционирующими веществами которых являются белки и нуклеиновые кислоты»<sup>3</sup>.

Живому свойствен ряд совокупных признаков, таких, как способность к воспроизведению (репродукции), использование и трансформация энергии, метаболизм, чувствительность, изменчивость. И такую совокупность этих признаков можно обнаружить только на клеточном уровне. Нет меньшей единицы живого, чем клетка. Мы можем выделить из клетки отдельные ее компоненты или даже молекулы и убедиться, что многие из них обладают специфическими функциональными особенностями. Так, выделенные актомиозиновые фибриллы могут сокращаться в ответ на добавление АТФ; вне клетки прекрасно «работают» многие ферменты, участвующие в синтезе или распаде сложных биоорганических молекул; выделенные рибосомы в присутствии необходимых факторов могут синтезировать белок, разработаны неклеточные системы ферментативного синтеза нуклеиновых кислот и т.д. Можно ли считать все эти клеточные компоненты, структуры, ферменты, молекулы живыми? Можно ли считать живым актомиозиновый комплекс? Думается, что нет, хотя бы потому, что он обладает лишь частью набора свойств живого. То же относится и к остальным примерам. Только клетка как таковая является наименьшей единицей, обладающей всеми вместе взятыми свойствами, отвечающими определению «живое».

Что же такое клетка, какое ей можно дать общее определение? Из школьного курса известно, что разнообразные клетки имеют совершенно несходную морфологию, их внешний вид и величины значительно расходятся. Действительно, что общего между звездчатой формой некоторых нервных клеток, шаровидной формой лейкоцита и трубкообразной формой клетки эндотелия? Такое же разнообразие форм встречается и среди микроорганизмов. Поэтому мы должны находить общность живых объектов не в их внешней форме, а в общности их внутренней организации.

Среди живых организмов встречаются два типа организации клеток.

К наиболее простому типу строения можно отнести клетки бактерий, цианофиций и архей, к более высокоорганизованному — клетки всех остальных живых существ, начиная от низших растений и кончая человеком.

Принято называть клетки бактерий, археобактерий и цианофиций **прокариотическими** (доядерными клетками), а клетки всех остальных представителей

<sup>1</sup> Р. Вирхов «О механическом понимании жизни». — Харьков, 1867.

<sup>2</sup> Б.М. Медников «Аксиомы биологии». — М.: Знание, 1982.

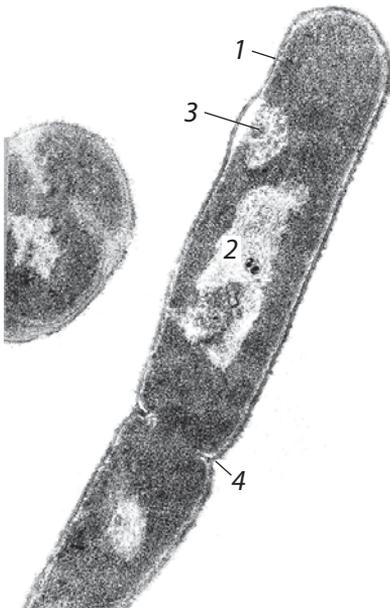
<sup>3</sup> М.В. Волькенштейн «Молекулы и жизнь» — М.: Наука, 1965.

живого — **эукариотическими** (собственно ядерными), потому что у последних обязательной структурой служит клеточное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой.

Содержимое прокариотической клетки одето плазматической мембраной, играющей роль активного барьера между собственно цитоплазмой клетки и внешней средой (рис. 1.1, 1.2). Обычно снаружи от плазматической мембраны расположена клеточная стенка или оболочка — продукт клеточной активности. У прокариотических клеток нет морфологически выраженного ядра, но присутствует в виде так называемого **нуклеоида** зона, заполненная ДНК.

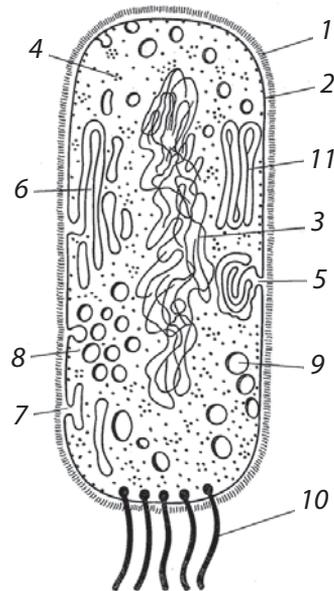
В основном веществе (или матриксе) цитоплазмы прокариотических клеток располагаются многочисленные рибосомы, цитоплазматические же мембраны обычно выражены не так сильно, как у эукариотических клеток, хотя некоторые виды бактерий (например, фототрофные пурпурные бактерии) богаты внутриклеточными мембранными системами. Очень сильно цитоплазматические мембраны развиты у сине-зеленых водорослей. Обычно все внутриклеточные мембранные системы прокариот развиваются за счет плазматической мембраны.

Но не только присутствие морфологически выраженного ядра является отличительным признаком эукариотических клеток. У клеток высшего типа (эукариотических) кроме ядра в цитоплазме существует целый набор специальных



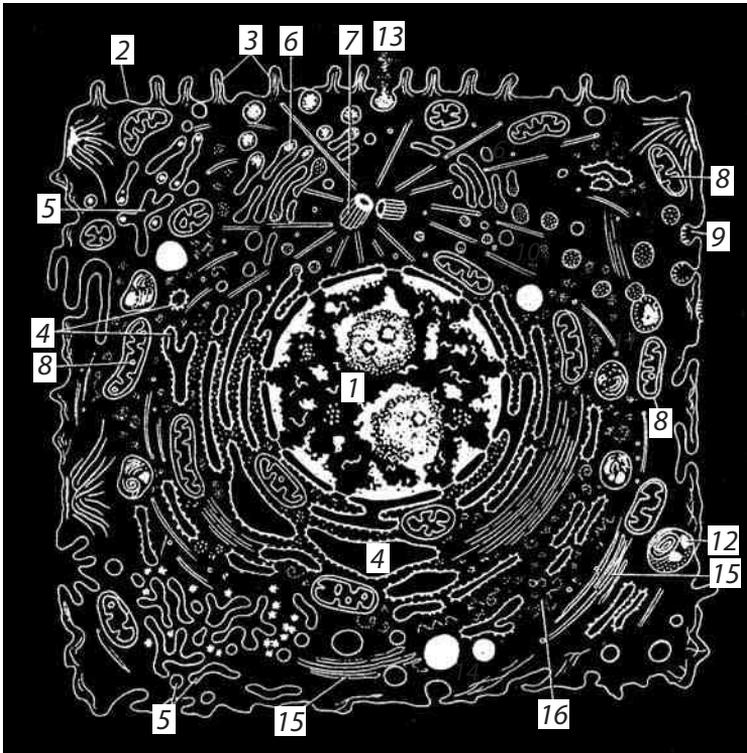
**Рис. 1.1.** Ультратонкий срез пропионовой бактерии:

1 — клеточная стенка; 2 — зона нуклеоида; 3 — мезосома; 4 — образование септы при делении клетки (фото Л.И. Воробьевой)



**Рис. 1.2.** Комбинированная схема прокариотической клетки:

1 — клеточная стенка; 2 — плазматическая мембрана; 3 — ДНК нуклеоида; 4 — полирибосомы цитоплазмы; 5 — мезосомы; 6 — ламеллярные структуры; 7 — впячивания плазмолеммы; 8 — скопление хроматофоров; 9 — вакуоли с включениями; 10 — бактериальные жгутики; 11 — пластинчатые тилакоиды



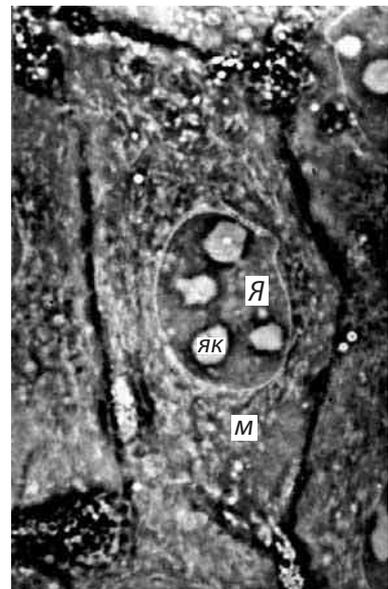
**Рис. 1.3.** Комбинированная схема строения клетки животных:

1 — ядро с хроматином и ядрышком; 2 — плазматическая мембрана; 3 — микроворсинки; 4 — гранулярный эндоплазматический ретикулум; 5 — гладкий ретикулум; 6 — аппарат Гольджи; 7 — клеточный центр; 8 — митохондрии; 9 — эндосома; 10 — первичные лизосомы; 11 — вторичные лизосомы; 12 — телолизома; 13 — секреторные вакуоли, экзосомы; 14 — жировые включения; 15 — фибриллы цитоскелета; 16 — рибосомы

обязательных структур, **органелл**, выполняющих отдельные специфические функции (рис. 1.3, 1.4). К числу органелл относят мембранные структуры: систему эндоплазматической сети (ретикулума), аппарат Гольджи, лизосомы, митохондрии, пластиды (для клеток растений). Кроме того, для эукариотических клеток характерно наличие немембранных структур, таких как микротрубочки, микрофиламенты, центриоли (для клеток животных) и др.

Эукариотические клетки обычно намного крупнее прокариотических. Так, палочковидные бактерии имеют длину до 5 мкм, а толщину около 1 мкм, в то время как эукариотические, клетки в поперечнике могут достигать десятков мкм.

Несмотря на четкие морфологические отличия прокариотических, и эукариотические клетки имеют много общего, что и позволяет отнести их к одной, клеточной, системе организации живого. И те и другие одеты плазматической мембраной, обладающей сходной



**Рис. 1.4.** Прижизненная фотография клетки культуры в фазово-контрастном микроскопе:

Я — ядро; як — ядрышко; м — митохондрии

функцией активного переноса веществ из клетки и внутрь ее; синтез белка у них происходит на рибосомах; сходны и другие процессы, такие, как синтез РНК и репликация ДНК, похожи и биоэнергетические процессы. Исходя из вышесказанного, клетке можно дать общее определение.

**Клетка** — это ограниченная активной мембраной, упорядоченная структурированная система биополимеров (белков, нуклеиновых кислот) и их макромолекулярных комплексов, участвующих в единой совокупности метаболических и энергетических процессов, осуществляющих поддержание и воспроизведение всей системы в целом.

Короче: клетка — самоподдерживающаяся и самовоспроизводящаяся система биополимеров. Это определение дает описание основного свойства «живого» — воспроизведение подобного себе из неподобного себе.

У многоклеточных организмов часть клеток утрачивает свойство размножаться, но они остаются клетками до тех пор, пока способны вести синтетические процессы, регулировать транспорт веществ между клеткой и средой, использовать для этих процессов энергию. Есть примеры безъядерных клеток (эритроциты и тромбоциты млекопитающих, некоторые мышечные клетки моллюсков), это скорее не собственно клетки, а их остатки — одетые мембраной участки цитоплазмы с ограниченными функциональными потенциями.

Одно время первый постулат клеточной теории подвергался многочисленным нападкам и критике. Некоторые авторы указывали, что в многоклеточных организмах, особенно у животных, кроме клеток существуют и межклеточные, промежуточные вещества, которые тоже, казалось, обладали свойствами живого. Однако было показано, что межклеточные вещества (основное вещество и волокна соединительной ткани) представляют собой не самостоятельные образования, а продукты активности отдельных групп клеток.

Другие возражения касались того, что часто у животных кроме отдельных клеток встречаются так называемые *симпласты* и *синцитии* (*соклетия*). По морфологическому описанию — это крупные цитоплазматические образования со множеством ядер, не разделенные на отдельные клеточные территории. Примерами таких симпластов могут быть мышечные волокна позвоночных. Однако если проследить за развитием таких «неклеточных» форм, то легко убедиться в том, что они возникают вторично за счет слияния отдельных клеток или же в результате деления одних ядер без деления цитоплазмы, т.е. без цитотомии.

## 2. Клетка — единая система сопряженных функциональных единиц

В начале нашего изложения в согласии с клеточной теорией мы обсуждали первый ее постулат: клетка — наименьшая единица живого. Однако мы знаем о сложности строения этой «единицы», которая содержит в себе множество типов внутриклеточных структур, выполняющих разнообразные функции. При этом каждый компонент «специализирован» на выполнении одной собственной группы

функций, и другие компоненты не могут работать «по совместительству», не могут принять на себя основные функции других внутриклеточных структур. Важно отметить, что каждая из функций является обязательной, без выполнения которой клетка не может существовать. Все это в значительной степени напоминает многоклеточный организм, который также представляет собой особую живую систему, обеспечивающую свое собственное существование и воспроизведение. Все тело организма может быть подразделено на ряд подсистем или систем, обеспечивающих целый ряд функций организма: пищеварительная, выделительная, мышечная, нервная, половая система и др. И эти функции выполняются отдельными или рядом органов: кишечник, почки, мозг и т.д.

И в данном примере эти системы в основном монофункциональны и незаменимы. В общей системе организма как целого, все они играют главные, а не подчиненные, роли. Жизнь организма становится невозможной при выключении любой из этих систем.

Формально любую клетку можно «разложить» на ряд как бы независимых структурных и функциональных компонентов, выполняющих свои специфические функции. Так, эукариотическую клетку принято разделять на **ядро** и **цитоплазму**. В цитоплазме, в свою очередь, выделяют *гиалоплазму*, или *основную плазму клетки* (цитозоль — растворимый компонент цитоплазмы по терминологии биохимиков), а также целый ряд структур — *органелл*, выполняющих свои отдельные специфические функции. Это мембранные органеллы: одномембранные (вакуолярная система, включающая в себя эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, эндо- и экзоцитозные вакуоли, лизосомы, пероксисомы) и двумембранные (митохондрии и пластиды). К немембранным органеллам нужно отнести рибосомы и систему цитоскелетных фибрилл. Кроме того, вся поверхность клетки покрыта цитоплазматической мембраной, тесно функционально связанной как с вакуолярной системой, с элементами цитоскелета, так и с гиалоплазмой (рис. 1.5).

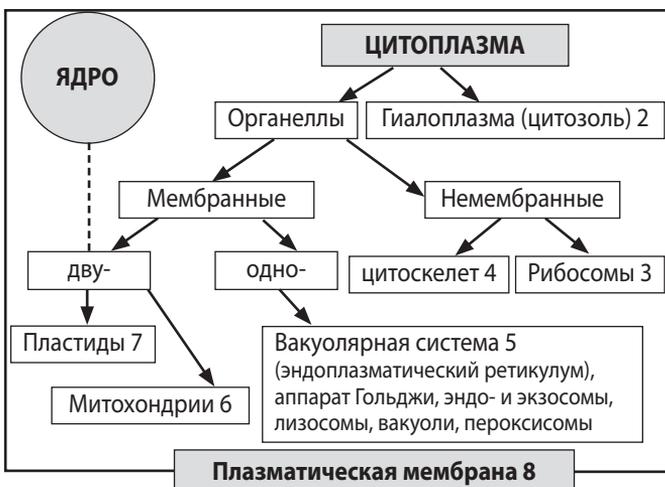


Рис. 1.5. Функциональные системы эукариотной клетки

Но каждая из этих морфологических «отдельностей» представляет собой новую систему или подсистему функционирования. Так, **клеточное ядро** является системой хранения, воспроизведения и реализации генетической информации, заключенной в составе ДНК хромосом. **Гиалоплазма** — система основного промежуточного обмена; **рибосомы** — элементарные клеточные машины синтеза белка; **цитоскелет** — опорно-двигательная система клетки и **вакуолярная система** — система синтеза и внутриклеточного транспорта белковых биополимеров и генезиса многих клеточных мембран; **митохондрии** — органеллы энергообеспечения клетки за счет синтеза АТФ; **плазматическая мембрана** — барьерно-рецепторно-транспортная система клетки.

Аналоги этих систем есть и у прокариот: это — плазматическая мембрана, которая кроме пограничной роли участвует в процессах синтеза АТФ и фотосинтеза, цитозоль, рибосомы и даже элементы цитоскелета.

Важно подчеркнуть, что все эти подсистемы клетки образуют некое сопряженное единство, находятся во взаимозависимости. Так, нарушение функций ядра сразу сказывается на синтезе клеточных белков, нарушение работы митохондрий прекращает все синтетические и обменные процессы в клетке, разрушение элементов цитоскелета прекращает внутриклеточный транспорт и т.д. Как в часовом механизме повреждение любой его части приводит к остановке всей системы в целом.

### 3. Гомологичность клеток

Термин «гомологичность» означает сходство по коренным свойствам и отличие по второстепенным. Например, руки человека, крыло птицы, передняя нога лошади гомологичны, сходны не только по плану строения, но и по своему происхождению. Подобно этому можно говорить, что разные клетки организмов растительного или животного происхождения сходны, гомологичны.

Это обобщение, сделанное еще Т. Шванном, нашло свое подтверждение и развитие в современной цитологии, использующей новые достижения техники, такие, как электронный микроскоп. Гомологичность строения клеток наблюдается внутри каждого из типов клеток: прокариотическом и эукариотическом. Хорошо известно разнообразие клеток как бактериальных, так и высших организмов. Такое одновременное сходство строения и разнообразие форм определяются тем, что клеточные функции можно грубо подразделить на две группы: обязательные и факультативные. Обязательные функции, направленные на поддержание жизнеспособности самих клеток, осуществляются специальными внутриклеточными структурами.

Так, у всех прокариотических клеток плазматическая мембрана не только ограничивает собственно цитоплазму, но и функционирует как структура, обеспечивающая активный транспорт веществ и клеточных продуктов, как система окислительного фосфорилирования, как источник образования клеточных бактериальных стенок. ДНК нуклеоида бактерий и сине-зеленых водорослей

обеспечивает генетические свойства клеток и т.д. Рибосомы цитоплазмы — единственные аппараты синтеза полипептидных цепей — также обязательный компонент цитоплазмы прокариотической клетки. Разнообразие же прокариотических клеток — это результат генетической неоднородности отдельных бактериальных одноклеточных организмов. Прокариотические клетки могут отличаться друг от друга толщиной и устройством клеточной стенки, складчатостью плазматической мембраны, количеством и структурой цитоплазматических выростов этой мембраны, количеством и свойствами внутриклеточных вакуолей и мембранных скоплений и др. Но «общий план» строения прокариотических клеток остается постоянным.

Та же картина наблюдается и для эукариотических клеток. При изучении клеток растений и животных бросается в глаза разительное сходство не только в микроскопическом строении этих клеток, но и в деталях строения их отдельных компонентов. У эукариот так же, как у прокариот, клетки отделены друг от друга или от внешней среды активной плазматической мембраной, которая может принимать участие в выделении веществ из клетки и построении внеклеточных структур, что особенно выражено у растений. У всех эукариотических клеток от низших грибов до позвоночных всегда имеется ядро, принципиально сходное по строению у разных организмов. Строение и функции внутриклеточных структур также в принципе определяется гомологичностью общеклеточных функций, связанных с поддержанием самой живой системы (синтез нуклеиновых кислот и белков, биоэнергетика клетки и т.д.).

Одновременно мы видим и разнообразие клеток даже в пределах одного многоклеточного организма. Так, по форме мало похожи друг на друга такие клетки, как мышечная или нервная. Современная цитология показывает, что различие клеток связано со специализацией их функций, с развитием особых функциональных клеточных аппаратов. Например, если рассматривать мышечную клетку, то в ней кроме общеклеточных структур (мембранные системы ретикулума, аппарат Гольджи, рибосомы и др.) встречаются в большом количестве фибриллярные компоненты, обеспечивающие специальную функциональную нагрузку, характерную для этой клетки.

В нервной клетке кроме общеклеточных компонентов можно отметить специфические черты: наличие длинных и разветвленных клеточных отростков, оканчивающихся специальными структурами передачи нервного импульса; своеобразную композицию в цитоплазме из элементов эндоплазматической сети (тигроид), большое количество микротрубочек в клеточных отростках. Вся совокупность этих отличительных черт нервной клетки связана с ее специализацией — передачей нервного импульса. Однако и микротрубочки и микрофиламенты можно обнаружить практически в любых эукариотических клетках, хотя они будут и не так обильны. Например, филаменты, сходные по химизму с актиновыми фибриллами мышечных клеток, имеются в цитоплазме фибробластов. В ней же обнаруживаются и микротрубочки. Следовательно, и микрофиламенты и микротрубочки представляют собой обязательные общеклеточные структуры. Сейчас известно, что микрофиламенты клеток представлены актином, что указывает

на их общеклеточное значение — обеспечивать подвижность клеток. В мышечных клетках эта функция стала главной, поэтому так сильно в них выражен сократительный аппарат.

Структурное разнообразие клеток многоклеточного организма можно объяснить отличием их специальных функций, осуществляющихся данной клеткой как бы на фоне общих, обязательных клеточных функций.

Другими словами, гомологичность в строении клеток определяется сходством общеклеточных функций, направленных на поддержание *жизни самих клеток и на их размножение*. Разнообразие же в строении клеток многоклеточных — результат функциональной специализации, дифференцировки.

## 4. Клетка от клетки

Формулировка положения «Всякая клетка от клетки» (*Omnis cellula e cellula*) связана с именем знаменитого ученого Р. Вирхова. Т. Шванн в своих обобщениях подчеркивал одинаковость принципа развития клеток как у животных, так и у растений. Это представление базировалось на выводах М. Шлейдена о том, что клетки могут образовываться из зернистой массы в недрах клеток заново (теория цитобласты). Р. Вирхов как противник идеи о самозарождении жизни настаивал на «преемственном размножении клеток»: «Всякую развитую ткань можно производить только от одного простого начала — от клетки». Сегодня сформулированное Р. Вирховым афористическое определение можно считать биологическим законом. **Размножение клеток прокариотических и эукариотических происходит только путем деления исходной клетки, которому предшествует воспроизведение ее генетического материала (редупликация ДНК).**

У эукариотических клеток единственно полноценным способом деления является *митоз* (или *мейоз* при образовании половых клеток). При этом образуется специальный аппарат клеточного деления — клеточное веретено, с помощью которого равномерно и точно по двум дочерним клеткам распределяются хромосомы, до этого удвоившиеся в числе. Этот тип деления наблюдается у всех эукариотических, как растительных, так и животных клеток.

Прокариотические клетки, делящиеся так называемым бинарным образом, также используют специальный аппарат разделения клеток, значительно напоминающий митотический способ деления эукариот (см. ниже).

Современная наука отвергает иные пути образования клеток и увеличение их числа. Появившиеся одно время описания образования клеток из «неклеточного живого вещества» оказались в лучшем случае результатом методических недостатков или даже ошибок, а в худшем — плодом научной недобросовестности.

Одно время считали, что клетки могут размножаться прямым делением, путем так называемого *амитоза*. Однако прямое разделение клеточного ядра, а затем и цитоплазмы, наблюдается только у некоторых инфузорий. При этом амитотически делится только макронуклеус, в то время как генеративные микронуклеусы делятся исключительно путем митоза, вслед за которым наступает разделение

клетки — цитотомия. Часто появление двух- или многоядерных клеток также считали результатом amitotического деления ядер. Однако появление многоядерных клеток является или результатом слияния друг с другом нескольких клеток (гигантские многоядерные клетки тел воспаления, остеокласты и др.) или результатом нарушения самого процесса цитотомии, либо являются признаками клеточной патологии, как в случае апоптоза — программированной клеточной гибели, когда происходит фрагментация ядра.

## 5. Клетки и многоклеточный организм

Роль отдельных клеток в многоклеточном организме подвергалась неоднократно обсуждению и критике и претерпела наибольшие изменения. Т. Шванн представлял себе многогранную деятельность организма как сумму жизнедеятельности отдельных клеток. Это представление было в свое время расширено Р. Вирховым, который подчеркивал, что функционирование различных клеток многоклеточного организма находится во взаимной зависимости друг от друга. Вирхов писал: «...всякое тело, сколько-нибудь значительного объема, представляет устройство, подобное общественному, где множество отдельных существований поставлено в зависимость друг от друга, но так, однако же, что каждое из них имеет свою собственную деятельность, и если побуждение к этой деятельности оно и получает от других частей, зато самую работу свою оно совершает собственными силами» (Вирхов, 1859).

Действительно, какую бы сторону деятельности целого организма мы ни брали, будь то реакция на раздражение или движение, иммунные реакции, выделение и многое другое, каждая из них осуществляется специализированными клетками. Клетка — это единица функционирования в многоклеточном организме. Но клетки объединены в функциональные системы, в ткани и органы, которые находятся во взаимной связи друг с другом. Поэтому нет смысла в сложных организмах искать главные органы или главные клетки. Многоклеточные организмы представляют собой сложные ансамбли клеток, объединенные в целостные интегрированные системы тканей и органов, подчиненные и связанные межклеточными, гуморальными и нервными формами регуляции. Вот почему мы говорим об организме как о целом. Специализация частей многоклеточного единого организма, расчлененность его функций дают ему большие возможности приспособления для размножения отдельных индивидуумов, для сохранения вида.

В конечном итоге можно сказать, что клетка в многоклеточном организме — это единица функционирования и развития. Кроме того, первоосновой всех нормальных и патологических реакций целостного организма является клетка. Действительно, все многочисленные свойства и функции организма выполняются клетками. Когда в организм попадают чужеродные белки, например бактериальные, то развивается иммунологическая реакция. При этом в крови появляются белки-антитела, которые связываются с чужими белками и их инактивируют. Эти

антитела — продукты синтетической активности определенных клеток, плазмацитов. Но, чтобы плазмациты начали вырабатывать специфические антитела, необходима работа и взаимодействие целого ряда специализированных клеток — лимфоцитов и макрофагов. Другой пример, простейший рефлекс — слюноотделение в ответ на предъявление пищи. Здесь проявляется очень сложная цепь клеточных функций: зрительные анализаторы (клетки) передают сигнал в кору головного мозга, где активируется целый ряд клеток, передающих сигналы на нейроны, которые посылают сигналы к разным клеткам слюнной железы, где одни вырабатывают белковый секрет, другие выделяют слизистый секрет, третьи, мышечные, сокращаясь, выдавливают секрет в протоки, а затем — в полость рта. Такие цепи последовательных функциональных актов отдельных групп клеток можно проследить на множестве примеров функциональных отправлений организма.

Жизнь нового организма начинается с зиготы — клетки, получившейся в результате слияния женской половой клетки (ооцита) со спермием. При делении зиготы возникает клеточное потомство, которое также делится, увеличивается в числе и приобретает новые свойства, специализируется, дифференцируется. Рост организма, увеличение его массы есть результат размножения клеток и результат выработки ими разнообразных продуктов (например, вещества кости или хряща).

И наконец, именно поражение клеток или изменение их свойств — основа для развития всех без исключения заболеваний. Данное положение было впервые сформулировано Р. Вирховым (1858) в его знаменитой книге «Клеточная патология». Классическим примером клеточной обусловленности развития болезни может служить сахарный диабет, широко распространенное заболевание современности. Его причина — недостаточность функционирования лишь одной группы клеток, так называемых  $\beta$ -клеток островков Лангерганса в поджелудочной железе. Эти клетки вырабатывают гормон инсулин, участвующий в регуляции сахарного обмена организма.

Все эти примеры показывают важность изучения структуры, свойств и функций клеток для самых различных биологических дисциплин и для медицины.

## 6. Тотипотентность клеток многоклеточных организмов

Как же возникают разнообразные типы клеток в многоклеточных организмах? Известно, что организм человека, развившийся всего из одной исходной клетки, зиготы, содержит более 200 различных типов клеток. Каким образом возникает это разнообразие, сегодня до конца не ясно, так как еще мало конкретных данных, касающихся путей появления тех или иных клеточных типов.

Современная биология на базе представлений эмбриологии, молекулярной биологии и генетики считает, что индивидуальное развитие от одной клетки до многоклеточного зрелого организма — результат последовательного, избирательного включения работы разных генных участков хромосом в различных клетках.

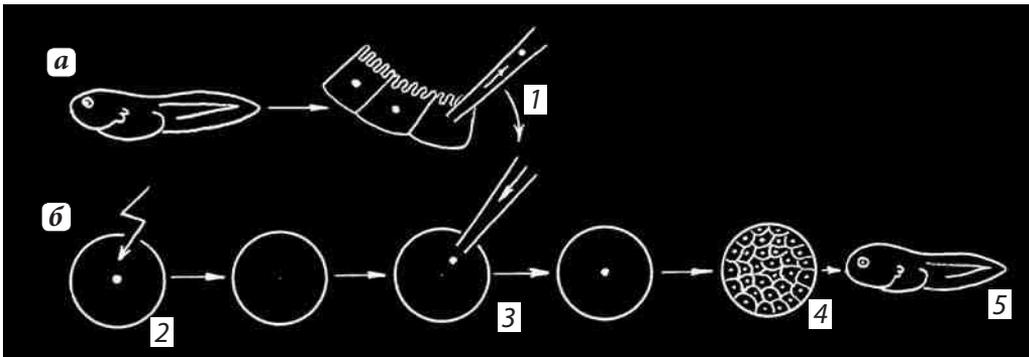
Это приводит к появлению клеток со специфическими для них структурами и особыми функциями, т.е. к процессу, называемому **дифференцировкой**.

Дифференцировка — это результат избирательной активности разных генов в клетках по мере развития многоклеточного организма. Другими словами, дифференцировка — это результат дифференциальной активности генов. Следовательно, можно утверждать, что любая клетка многоклеточного организма обладает одинаковым полным фондом генетического материала, всеми возможными потенциями для проявления этого материала, т.е. **тотипотентна**, но в разных клетках одни и те же гены могут находиться или в активном или в репрессированном состоянии. Эти представления базируются на большом экспериментальном материале. Стало возможным вырастить зрелое растение из одной его соматической клетки. Многочисленные опыты на лягушках показали, что ядра дифференцированных клеток сохраняют все те потенции, которые есть у ядра в зиготе.

Было найдено, что если после оплодотворения яйцеклетки лягушки у возникшей зиготы микрохирургически удалить ядро, а на место его имплантировать ядро из другой зиготы, то произойдет полное развитие нормальной лягушки. Если же в этом эксперименте ядро зиготы заменить на ядро из специализированной (дифференцированной) клетки взрослого животного, то развитие эмбриона пройдет нормальным путем, вплоть до появления взрослой лягушки (рис. 1.6).

Аналогичным путем можно в безъядерную зиготу млекопитающих ввести ядро из ткани взрослого животного и получить клонированную особь, имеющую идентичную генетическую информацию с животным-донором. Так была получена (клонирована) овечка Долли.

Из этого вытекает, что клетки многоклеточных организмов обладают полным набором генетической информации, свойственной для данного организма, в этом отношении они равнозначны. Но одновременно клетки отличаются по объему проявления этой информации, что и создает возможность появления специализированных клеток. Однако в последнее время появились данные о том, что



**Рис. 1.6.** Тотипотентность ядер клеток организма. Ядро, выделенное из клетки кишечника головастика *Xenopus laevis* (а), пересажено в яйцеклетку, лишенную ядра путем облучения (б). В результате яйцеклетка дробится и развивается нормальный головастик (пример так называемого «клонирования» животных):

1 — выделение ядра из соматической клетки; 2 — облучение ооцита; 3 — пересадка ядра; 4 — дробящаяся бластула; 5 — развивающийся головастик

плазматиты в результате специфической дифференцировки при иммунном ответе претерпевают молекулярные перестройки в области генов, ответственных за синтез антител, и тем самым генетически отличаются от остальных клеток.

Общим же законом для многоклеточных растительных и животных организмов является то, что несмотря на структурные и функциональные различия клеток данного организма в генетическом отношении они однородны, тождественны и тотипотентны.

Подводя итог рассмотрению современного состояния клеточной теории, нужно сказать, что именно клетка — единица развития многоклеточных организмов, единица их строения, единица функционирования и единица патологических изменений.

Для того, чтобы понять не только значение структурных особенностей клетки, но и главное — разобраться в функциональных отправлениях ее отдельных компонентов и всей клетки в целом, чтобы сочетать изучение морфологии клетки с главнейшими биохимическими и генетическими особенностями ее устройства и работы, чтобы изучать клетку именно с позиций современной клеточной биологии, необходимо хотя бы вкратце вспомнить основные молекулярно-биологические закономерности, еще раз кратко обратиться к содержанию центральной догмы молекулярной биологии (см. главу 2).

## Глава 2

# Центральная догма клеточной биологии

Клетка как таковая обладает огромным числом разнообразных функций, как мы уже говорили, часть из них — общеклеточные, часть — специальные, характерные для особых клеточных типов. Главными рабочими механизмами выполнения этих функций являются белки или их комплексы с другими биологическими макромолекулами, такими, как нуклеиновые кислоты, липиды и полисахариды. Так, известно, что процессы транспорта в клетке разнообразных веществ, начиная с ионов, заканчивая макромолекулами, определяются работой специальных белков или липопротеиновых комплексов в составе плазматической и иных клеточных мембран. Практически все процессы синтеза, распада, перестройки разных белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов происходит в результате активности специфических для каждой отдельной реакции белковых ферментов. Синтезы отдельных биологических мономеров, нуклеотидов, аминокислот, жирных кислот, сахаров и др. также осуществляются огромным числом специфических ферментов — белков. Сокращение, приводящее к подвижности клеток или к перемещению веществ и структур внутри клеток, осуществляется также специальными сократительными белками. Многие реакции клеток в ответ на воздействие внешних факторов (вирусов, гормонов, чужеродных белков и др.) начинаются с взаимодействия этих факторов со специальными клеточными белками-рецепторами.

Белки — это основные компоненты практически всех клеточных структур. Множество химических реакций внутри клетки определяется множеством ферментов, каждый из которых ведет одну или несколько отдельных реакций. Структура каждого отдельно взятого белка строго специфична, что выражается в специфичности их первичной структуры — в последовательности аминокислот вдоль полипептидной, белковой цепи. Причем специфичность этой аминокислотной последовательности безошибочно повторена во всех молекулах данного клеточного белка.

Такая правильность в воспроизведении однозначной последовательности аминокислот в белковой цепи детерминируется структурой ДНК того генного участка, который в конечном счете отвечает за структуру и синтез данного белка. Эти представления служат основным постулатом молекулярной биологии, ее «догмой». Информация о будущей молекуле белка передается в места его синтеза (в рибосомы) посредником — информационной РНК (иРНК), нуклеотидный состав которой отражает состав и последовательность нуклеотидов генного

участка ДНК. В рибосоме строится полипептидная цепь, последовательность аминокислот в которой определяется последовательностью нуклеотидов в иРНК, последовательностью их триплетов. Тем самым **центральная догма молекулярной биологии** подчеркивает однонаправленность передачи информации: только от ДНК к белку, с помощью промежуточного звена, иРНК (ДНК → иРНК → белок). Для некоторых РНК-содержащих вирусов цепь передачи информации может идти по схеме РНК → иРНК → белок. Это не меняет сути дела, так как детерминирующим, определяющим звеном здесь является также нуклеиновая кислота. Обратные пути детерминации от белка к нуклеиновой кислоте, к ДНК или РНК неизвестны.

Для того чтобы в дальнейшем перейти к изучению структур клетки, связанных со всеми этапами синтеза белков, нам необходимо кратко остановиться на основных процессах и компонентах, определяющих это явление.

В настоящее время на основании современных представлений о биосинтезе белков можно дать следующую общую принципиальную схему этого сложного и многоступенчатого процесса (рис. 2.1).

Главная, «командная», роль в определении специфической структуры белков принадлежит дезоксирибонуклеиновой кислоте — ДНК. Молекула ДНК представляет собой чрезвычайно длинную линейную структуру, состоящую из двух взаимозакрученных полимерных цепей. Составными элементами — **моно-**

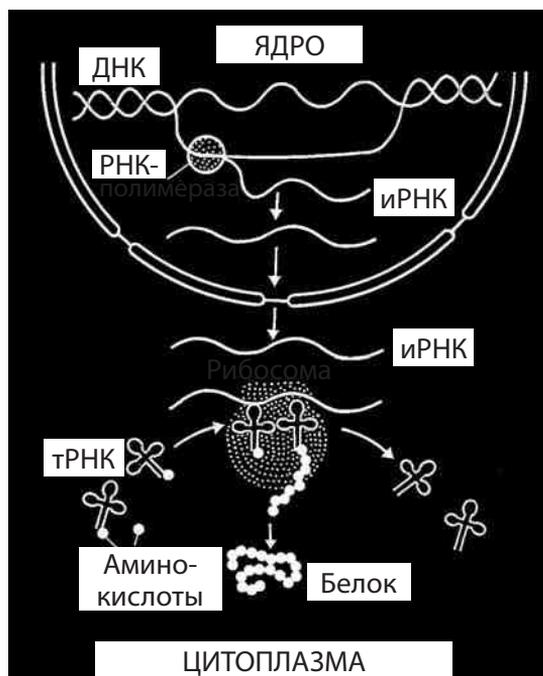


Рис. 2.1. Общая принципиальная схема биосинтеза белка

мерами — этих цепей являются четыре сорта дезоксирибонуклеотидов, чередование или последовательность которых вдоль цепи уникальная и специфична для каждой молекулы ДНК и каждого ее участка. Различные достаточно длинные участки молекулы ДНК ответственны за синтез разных белков. Тем самым одна молекула ДНК может определить синтез большого числа функционально и химически различных белков клетки. За синтез каждого одного типа белков ответствен лишь определенный участок молекулы ДНК. Такой участок молекулы ДНК, связанный с синтезом одного какого-либо белка в клетке, часто обозначают термином «цистрон». В настоящее время понятие цистрон рассматривают как эквивалентное понятие ген. В уникальной структуре гена — в определенном последовательном расположении его

нуклеотидов вдоль цепи — заключена вся информация о структуре одного соответствующего белка.

Из общей схемы белкового синтеза видно (см. рис. 2.1), что начальным пунктом, с которого начинается поток информации для биосинтеза белков в клетке, является ДНК. Следовательно, именно ДНК содержит ту первичную запись информации, которая должна сохраняться и воспроизводиться от клетки к клетке, из поколения в поколение.

Кратко касаясь вопроса о месте хранения генетической информации, т.е. о локализации ДНК в клетке, можно сказать следующее. Уже давно известно, что, в отличие от всех прочих компонентов белоксинтезирующего аппарата, ДНК имеет особую, весьма ограниченную локализацию: местом ее нахождения в клетках высших (эукариотических) организмов будет *клеточное ядро*. У низших (прокариотических) организмов, не имеющих оформленного клеточного ядра, ДНК также отменшена от остальной части протоплазмы в виде одного или нескольких компактных *нуклеоидных* образований. В полном соответствии с этим ядро эукариот или нуклеоид прокариот издавна рассматривается как вместилище генов, как уникальный клеточный органоид, контролирующей реализацию наследственных признаков организмов и их передачу в поколениях.

Основной принцип, лежащий в основе макромолекулярной структуры ДНК, — это так называемый *принцип комплементарности* (рис. 2.2). Как уже упоминалось, молекула ДНК состоит из двух взаимозакрученных цепей. Эти цепи связаны друг с другом посредством взаимодействия их противоположащих нуклеотидов. При этом по структурным соображениям существование такой двутяжной структуры оказывается возможным только в том случае, если противоположащие нуклеотиды обеих цепей будут стерически комплементарны, т.е. будут своей пространственной структурой дополнять друг друга. Такими взаимодополняющими — комплементарными — парами дезоксирибонуклеотидов являются пара А–Т (аденин–тимин) и пара Г–Ц (гуанин–цитозин).

Следовательно, согласно этому принципу комплементарности, если в одной цепи молекулы ДНК мы имеем некую последовательность четырех сортов нуклеотидов, то во второй цепи последовательность нуклеотидов будет однозначно детерминирована, так что каждому А первой цепи будет соответствовать Т во второй цепи, каждому Т первой цепи — А во второй

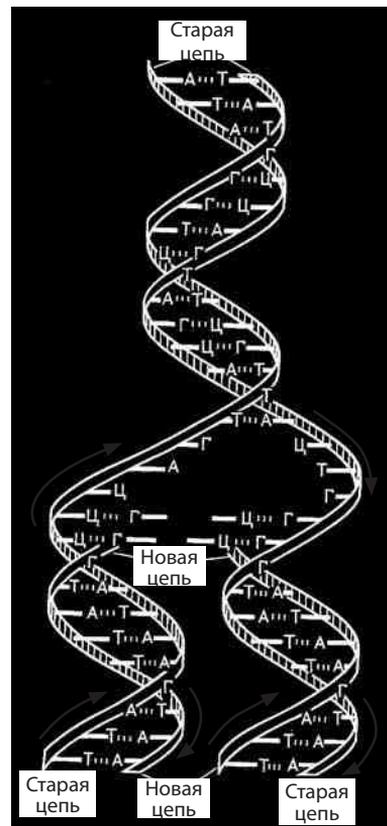


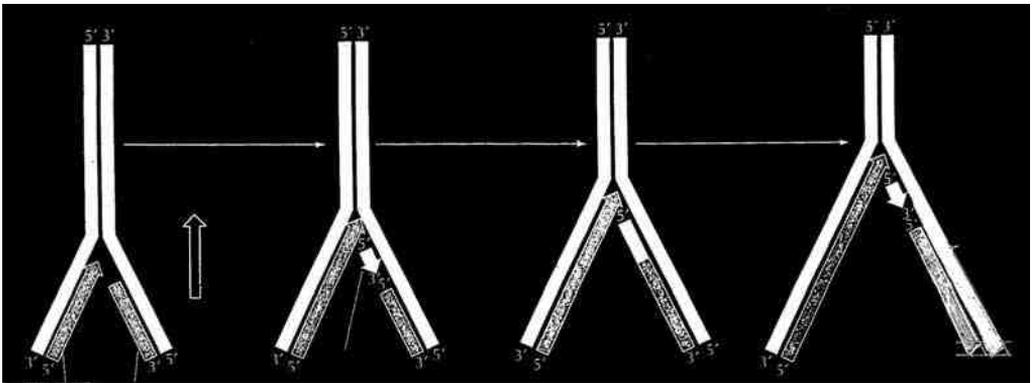
Рис. 2.2. Принцип комплементарности и схема репликации ДНК

цепи, каждому Г первой цепи — Ц во второй цепи и каждому Ц первой цепи — Г во второй цепи.

Видно, что указанный структурный принцип, лежащий в основе двутяжного строения молекулы ДНК, позволяет легко понять точное воспроизведение исходной структуры, т.е. точное воспроизведение информации, записанной в цепях молекулы в виде определенной последовательности из 4 сортов нуклеотидов. Действительно, синтез новых молекул ДНК (репликация) в клетке происходит только на базе уже имеющихся молекул ДНК. При этом две цепи исходной молекулы ДНК начинают с одного из концов расходиться, и на каждом из разошедшихся одностяжных участков начинает собираться из присутствующих в среде свободных нуклеотидов вторая цепь в точном соответствии с принципом комплементарности.

Расхождение двух цепей ДНК происходит за счет работы специального фермента — хеликазы. Эти места расхождения цепей ДНК получили название **точек начала репликации**. В этом случае 2 разошедшиеся цепи ДНК образуют **вилку репликации** (рис. 2.3), где на каждой из одностяжных цепей ДНК начинает собираться из присутствующих в среде свободных дезоксирибонуклеотидов вторая цепь в полном соответствии с принципом комплементарности. Процесс репликации осложняется еще и тем, что 2 цепи в спиральной молекуле ДНК являются не только комплементарными, но и **антипараллельными** по чередованию нуклеотидов. Это определяет то, что в вилке репликации наращивание дочерних цепей на каждой из одностяжных нитей происходит в противоположных направлениях. Такая ситуация связана с тем, что свободные дезоксинуклеотиды могут наращиваться только с 3'-конца растущей цепи (см. рис. 2.3).

Процесс расхождения двух цепочек исходной молекулы ДНК продолжается, и соответственно обе цепи дополняются комплементарными цепями. В результате, как видно на схеме, вместо одной возникает две молекулы ДНК, в точности идентичные исходной. В каждой получившейся «дочерней» молекуле ДНК одна цепь, как видно, целиком происходит от исходной, а другая является заново синтезированной.



**Рис. 2.3.** В вилке репликации синтез новых комплементарных цепей идет в противоположном направлении. На одной из цепей (лидирующей) синтез идет непрерывно (а), а на другой (отстающей) цепь ДНК синтезируется в виде небольших компонентов (б), которые затем соединяются друг с другом

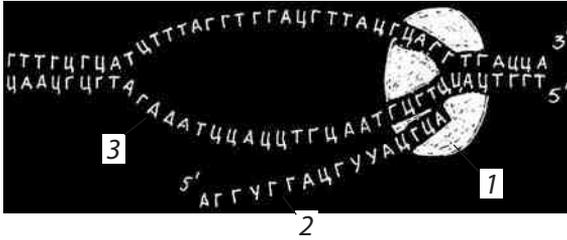
Главное, что еще раз необходимо подчеркнуть, это то, что потенциальная способность к точному воспроизведению заложена в самой двутяжной комплементарной структуре ДНК как таковой, и открытие этого, безусловно, составляет одно из главных достижений биологии.

Однако проблема воспроизведения (редупликации) ДНК не исчерпывается констатацией потенциальной способности ее структуры к точному воспроизведению своей нуклеотидной последовательности. Дело в том, что ДНК сама по себе вовсе не является самовоспроизводящей молекулой. Для осуществления процесса синтеза — воспроизведения ДНК по описанной выше схеме необходима деятельность специального ферментативного комплекса, носящего название ДНК-полимеразы. Именно этот фермент осуществляет последовательно идущий от одного конца молекулы ДНК к другому процесс расхождения двух цепей с одновременной полимеризацией на них свободных нуклеотидов по комплементарному принципу. Таким образом, ДНК, подобно матрице, лишь задает порядок расположения нуклеотидов в синтезирующихся цепях, а сам процесс ведет белок.

ДНК-полимераза как бы активно ползет вдоль двутяжной молекулы ДНК от одного ее конца к другому, оставляя позади себя раздвоенный редуплицированный «хвост».

Однако ДНК и отдельные ее функциональные участки, несущие информацию о структуре белков, сами непосредственного участия в процессе создания белковых молекул не принимают. Первым этапом на пути к реализации этой информации, записанной в цепях ДНК, является так называемый процесс *транскрипции*, или *переписывания*. В этом процессе на цепи ДНК, как на матрице, происходит синтез химически родственного полимера — рибонуклеиновой кислоты (РНК). Молекула РНК представляет собой одну цепь, мономерами которой являются четыре сорта рибонуклеотидов, которые рассматриваются как небольшая модификация четырех сортов дезоксирибонуклеотидов ДНК. Последовательность расположения четырех сортов рибонуклеотидов в образующейся цепи РНК в точности повторяет последовательность расположения соответствующих дезоксирибонуклеотидов одной из двух цепей ДНК. Таким путем нуклеотидная последовательность генов копируется в виде молекул РНК, т.е. информация, записанная в структуре данного гена, целиком переписывается на РНК. С каждого гена может сниматься большое, теоретически неограниченное количество таких «копий» — молекул РНК. Эти молекулы, переписанные во многих экземплярах как «копии» генов и стало быть несущие ту же информацию, что и гены, расходятся по клетке. Они уже непосредственно входят в связь с белоксинтезирующими частицами клетки и принимают «личное» участие в процессах создания белковых молекул. Другими словами, они переносят информацию от места, где она хранится, в места ее реализации. Соответственно эти РНК обозначают как информационные или матричные РНК, сокращенно мРНК (или иРНК).

Выяснено, что цепь информационной РНК синтезируется, прямо используя соответствующий участок ДНК в качестве матрицы. Синтезируемая цепь мРНК при этом точно копирует по своей нуклеотидной последовательности одну из двух цепей ДНК (принимая, что урацилу (У) в РНК соответствует его производное



**Рис. 2.4.** Комплементарный синтез РНК (2) на одной из цепей ДНК (3):  
1 — РНК-полимераза

тимин (Т) в ДНК). Это происходит на основе того же структурного принципа комплементарности, который определяет редупликацию ДНК (рис. 2.4). Оказалось, что когда происходит синтез мРНК на ДНК в клетке, то в качестве матрицы для образования цепи мРНК используется лишь одна цепь ДНК. Тогда каждому Г этой цепи ДНК будет соответствовать Ц в строящейся цепи РНК, каждому Ц цепи ДНК — Г в цепи РНК, каждому Т цепи ДНК — А в цепи РНК и каждому А цепи ДНК — У в цепи РНК. В итоге получающаяся цепь РНК будет строго комплементарна к матричной цепи ДНК и, следовательно, идентичная по последовательности нуклеотидов (принимая Т = У) второй цепи ДНК. Таким образом происходит «переписывание» информации с ДНК на РНК, т.е. транскрипция (см. рис. 2.4). «Переписанные» сочетания нуклеотидов цепи РНК уже непосредственно определяют расстановку соответствующих, кодируемых ими аминокислот в цепи белка.

Здесь, как и при рассмотрении редупликации ДНК, в качестве одного из наиболее существенных моментов процесса транскрипции необходимо указать на его ферментативный характер. ДНК, являющаяся матрицей в этом процессе, целиком определяет расположение нуклеотидов в синтезирующейся цепи мРНК, всю специфичность образуемой РНК, но сам ход процесса осуществляется особым белком — ферментом. Этот фермент называется **РНК-полимеразой**. Его молекула имеет сложную организацию, позволяющую ему активно продвигаться вдоль молекулы ДНК, одновременно синтезируя цепочку РНК, комплементарную к одной из цепей ДНК. Молекула ДНК, служащая матрицей, при этом не расходуется и не изменяется, сохраняясь в прежнем виде и будучи всегда готова для такого переписывания с нее неограниченного количества «копий» — мРНК. Поток этих мРНК от ДНК к рибосомам и составляет тот поток информации, который обеспечивает программирование белоксинтезирующего аппарата клетки, всей совокупности ее рибосом.

Таким образом, рассмотренная часть схемы описывает поток информации, идущий от ДНК в виде молекул мРНК к внутриклеточным частицам, синтезирующим белки. Теперь мы обратимся к потоку иного рода — к потоку того материала, из которого должен создаваться белок.

Элементарными единицами — **мономерами** — белковой молекулы являются аминокислоты, которых имеется 20 различных сортов. Для создания (синтеза) белковой молекулы свободные аминокислоты, присутствующие в клетке, должны быть вовлечены в соответствующий поток, поступающий в белоксинтезирующую

частицу, и уже там расставлены в цепочку определенным уникальным образом, диктуемым информационной РНК. Такое вовлечение аминокислот — строительного материала для создания белка — осуществляется через присоединение свободных аминокислот к особым молекулам РНК относительно небольшого размера. Эти РНК, служащие для присоединения к ним свободных аминокислот, не будут информационными, а несут иную — адапторную — функцию, смысл которой будет виден дальше. Аминокислоты присоединяются к одному из концов небольших цепочек трансферных РНК (тРНК), по одной аминокислоте на одну молекулу РНК.

Для каждой аминокислоты в клетке существуют свои специфические, присоединяющие только этот сорт аминокислоты молекулы адапторных РНК (см. текст). В таком навешенном на РНК виде аминокислоты и поступают в белоксинтезирующие частицы — рибосомы.

Рибосомы представляют собой ультрамикроскопические биохимические «машины» молекулярных размеров, где из поступающих аминокислотных остатков, согласно плану, заключенному в информационной РНК, собираются специфические белки. Хотя на данной схеме (рис. 2.5) изображена лишь одна частица, каждая клетка содержит тысячи рибосом. Количество рибосом определяет общую интенсивность белкового синтеза в клетке. Диаметр одной рибосомной частицы около 20 нм. По своей химической природе рибосома — рибонуклеопротеид; она состоит из особой рибосомной РНК (это третий известный нам класс РНК в дополнение к информационным и адапторным РНК) и молекул структурного рибосомного белка. Вместе это сочетание нескольких десятков макромолекул образует идеально организованную и надежную «машину», обладающую свойством прочитывать информацию, заключенную в цепи мРНК, и реализовать ее в виде готовой белковой молекулы специфического строения.

Поскольку существование процесса состоит в том, что линейная расстановка 20 сортов аминокислот в цепи белка однозначно детерминирована расположением четырех сортов нуклеотидов в цепи химически совсем иного полимера — нуклеиновой кислоты (мРНК), то этот процесс, происходящий в рибосоме, принято обозначать термином «**трансляция**», или «**перевод**» — перевод как бы с 4-буквенного алфавита цепей нуклеиновых кислот на 20-буквенный алфавит белковых (полипептидных) цепей. Как

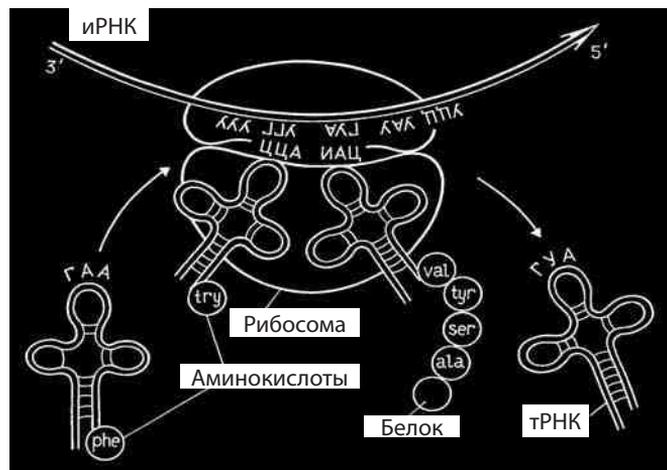


Рис. 2.5. Схема функционирующей рибосомы

видно, в процессе трансляции участвуют все три известных класса РНК: информационная РНК, являющаяся объектом трансляции, рибосомная РНК, играющая роль организатора белоксинтезирующей рибонуклеопротеидной частицы — рибосомы, и адапторные РНК, осуществляющие функцию переводчика.

Процесс синтеза белка начинается при образовании соединений аминокислот с молекулами адапторных РНК, или тРНК. Реакцию между аминокислотой и молекулой тРНК ведет фермент, обозначаемый как аминокцил-тРНК-синтетаза. Для каждого из 20 сортов аминокислот существуют свои особые ферменты, осуществляющие реакцию с участием только данной аминокислоты. Таким образом, существует не менее 20 ферментов (аминоацил-тРНК-синтетаза), каждый из которых специфичен для одного сорта аминокислоты. Каждый из этих ферментов может вести реакцию не с любой молекулой тРНК, а лишь с теми, которые несут строго определенное сочетание нуклеотидов в своей цепи. Таким образом, благодаря существованию набора столь специфических ферментов, различающих, с одной стороны, природу аминокислоты и, с другой — нуклеотидную последовательность тРНК, каждый из 20 сортов аминокислот оказывается «приписанным» только определенным тРНК с данным характерным нуклеотидным сочетанием.

Схематически некоторые моменты процесса биосинтеза белка, насколько мы их представляем на сегодняшний день, даны на рис. 2.5.

Здесь прежде всего видно, что молекула информационной РНК соединена с рибосомой или, как говорят, рибосома «запрограммирована» информационной РНК. В каждый данный момент непосредственно в самой рибосоме находятся лишь относительно короткий отрезок цепи мРНК. Но именно этот отрезок при участии рибосомы может взаимодействовать с молекулами адапторных РНК. И здесь снова главную роль играет уже дважды разбиравшийся выше принцип комплементарности. Дело в том, что на каждой определенной молекуле тРНК есть участок, где тройки-триплеты нуклеотидов комплементарны к соответствующим триплетам на мРНК. Следовательно, каждому триплету в цепи мРНК соответствует строго определенная тРНК, связанная с соответствующей аминокислотой.

Далее на схеме (см. рис. 2.5) видно, что в рибосоме помимо рассмотренной только что молекулы тРНК с навешенной аминокислотой находится еще одна молекула тРНК. Но, в отличие от рассмотренной выше молекулы тРНК, эта молекула тРНК своим концом присоединена к концу находящейся в процессе синтеза белковой (полипептидной) цепочки. Такое положение отражает динамику событий, происходящих в рибосоме в процессе синтеза белковой молекулы. Эту динамику можно представить себе следующим образом. Начнем с некоего промежуточного момента, отраженного на схеме и характеризующегося наличием уже начавшей строиться белковой цепочки, присоединенной к ней тРНК и только что вошедшей в рибосому и связанной с триплетом новой молекулы тРНК с соответствующей ей аминокислотой. По-видимому, сам акт присоединения молекулы тРНК к расположенному в данном месте рибосомы триплету мРНК приводит к такой взаимной ориентации и тесному контакту между аминокислотным остатком и строящейся цепью белка, что между ними возникает ковалентная связь. Связь возникает таким образом, что конец строящейся белковой цепи, на схеме присоединенный

к тРНК, переносится от этой тРНК на аминокислотный остаток поступившей аминоацил-тРНК. В результате «правая» тРНК, сыграв роль «донора», окажется свободной, а белковая цепь — переброшенной на «акцептор» — «левую» (поступившую) аминоацил-тРНК, в итоге белковая цепь окажется удлиненной на одну аминокислоту и присоединенной к «левой» тРНК. Вслед за этим происходит переброска «левой» тРНК вместе со связанным с ней триплетом нуклеотидов мРНК «вправо», тогда прежняя «донорная» молекула тРНК окажется вытесненной отсюда и уйдет из рибосом, на ее месте появится новая тРНК со строящейся цепью белка, удлиненной на один аминокислотный остаток, а цепь мРНК будет продвинута относительно рибосомы на один триплет вправо. В результате продвижения цепи мРНК на один триплет вправо в рибосоме появится следующий вакантный триплет (УУУ), и к нему немедленно по комплементарному принципу присоединится соответствующая тРНК с аминокислотой (фенилаланил-тРНК). Это опять вызовет образование ковалентной (пептидной) связи между строящейся цепью белка и фенилаланиновым остатком и вслед за этим продвижение цепи мРНК на один триплет вправо со всеми вытекающими отсюда последствиями и т.д. Таким путем осуществляется последовательно, триплет за триплетом, протягивание цепи информационной РНК через рибосому, в результате чего цепь иРНК «прочитывается» рибосомой целиком, от начала до конца. Одновременно и сопряженно с этим происходит последовательное, аминокислота за аминокислотой, наращивание белковой цепочки. Соответственно в рибосому одна за другой поступают молекулы тРНК с аминокислотами и выходят молекулы тРНК без аминокислот. Оказываясь в растворе вне рибосомы, свободные молекулы тРНК снова соединяются с аминокислотами и опять несут их в рибосому, сами же, таким образом, циклично обращаясь без разрушения и изменения.

## Глава 3

# Методы современной клеточной биологии — цитологии

Цитология возникла как ветвь микроанатомии, и поэтому одним из основных методов, который используют цитологи, — это метод световой микроскопии. В настоящее время этот метод нашел целый ряд дополнений и модификаций, что значительно расширило круг задач и вопросов, решаемых цитологией. Революционным моментом в развитии современной цитологии и биологии вообще было применение электронной микроскопии, открывшей необычайно широкие перспективы. С введением электронной микроскопии в ряде случаев уже трудно провести границу между собственно цитологией и биохимией, они объединяются на уровне макромолекулярного изучения объектов (например, микротрубочек, мембран, микрофиламентов и т.д.). Все же главным методическим приемом в цитологии остается визуальное наблюдение объекта. При этом исследователь не просто изучает и описывает морфологию объекта, он может видеть степень его сложности, локализовать отдельные детали, получить сведения о химизме той или иной части клетки, визуальным и достаточно точно оценить ее метаболические свойства, выяснить строение этой части на макромолекулярном уровне. Это создает своеобразие цитологии как науки, использующей главным образом методы изучения клетки непосредственно глазом, вооруженным увеличивающими оптическими системами. Кроме того, в цитологии применяются многочисленные приемы препаративной и аналитической биохимии, методы биофизики.

### 1. Световая микроскопия

Световой микроскоп, главный прибор биологии (и цитологии в том числе), представляет собой оптическую систему, состоящую из конденсатора, объектива и окуляра, который используется для рассматривания объекта. Пучок света от источника освещения собирается в конденсаторе и направляется на объект (рис. 3.1). Пройдя через объект, лучи света попадают в систему линз объектива; они строят первичное изображение, которое увеличивается с помощью линз окуляра. Главная оптическая часть микроскопа, определяющая его основные возможности, — объектив. В современных микроскопах объективы сменные, что позволяет изучать клетки при разных увеличениях. Главной характеристикой микроскопа как оптической системы является разрешающая способность. Изображения, даваемые объективом, можно увеличить во много раз, применяя сильный окуляр или,

например, путем проекции на экран (до  $10^5$  раз). Вычислено, что разрешающая способность объектива, т.е. минимальное расстояние между двумя точками, которые видны раздельно, будет равна

$$d = 0,61 \lambda / (n \sin \alpha),$$

где  $\lambda$  — длина волны света, используемого для освещения объекта;  $n$  — коэффициент преломления среды;  $\alpha$  — угол между оптической осью объектива и наиболее отклоняющимся лучом, попадающим в объектив. Разрешение микроскопа зависит от длины волны — чем она меньше, тем меньшего размера деталь мы можем увидеть, и от нумерической апертуры объектива ( $n \sin \alpha$ ) — чем она выше, тем выше разрешение. Обычно в световых микроскопах используются источники освещения в видимой области спектра (400–700 нм), поэтому максимальное разрешение микроскопа в этом случае может быть не выше 200–350 нм (0,2–0,35 мкм). Если использовать ультрафиолетовый свет (260–280 нм), то можно повысить разрешение до 130–140 нм (0,13–0,14 мкм). Это будет пределом теоретического разрешения светового микроскопа, определяемого волновой природой света. Таким образом, все, что может дать световой микроскоп как вспомогательный прибор к нашему глазу, — это повысить разрешающую способность его примерно в 1000 раз (невооруженный глаз человека имеет разрешающую способность около 0,1 мм, что равно 100 мкм). Это и есть «полезное» увеличение микроскопа, выше которого мы будем только увеличивать контуры изображения, не открывая в нем новых деталей. Следовательно, при использовании видимой области света 0,2–0,3 мкм — конечный предел разрешения светового микроскопа.

Если же необработанные живые или мертвые клетки рассматривать в проходящем свете, то в них различают только крупные детали из-за того, что они обладают иным коэффициентом преломления и поглощения световых лучей, чем окружающая среда. Большая же часть клеточных компонентов мало отличается по этим свойствам как от среды (воды или тканевых растворов), так и друг от друга и поэтому мало заметны и не контрастны. Для их изучения приходится изменять освещенность (теряя при этом в четкости изображения) или применять особые методы и приборы. Один из таких приемов — метод **фазово-контрастной микроскопии**, широко использующийся для наблюдений за живыми клетками. Он основан на том, что отдельные участки прозрачной в

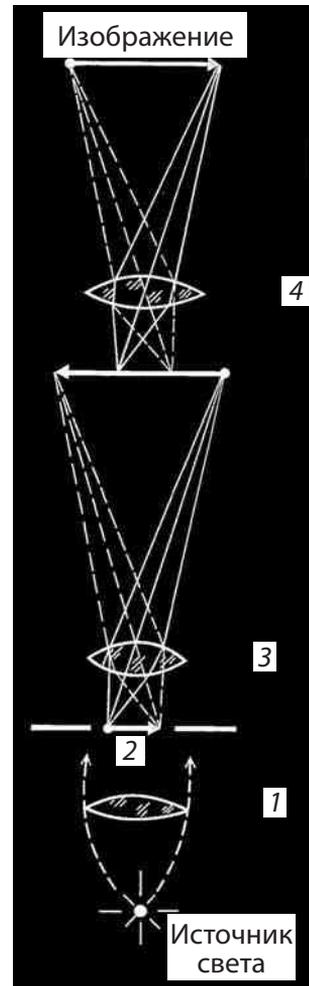
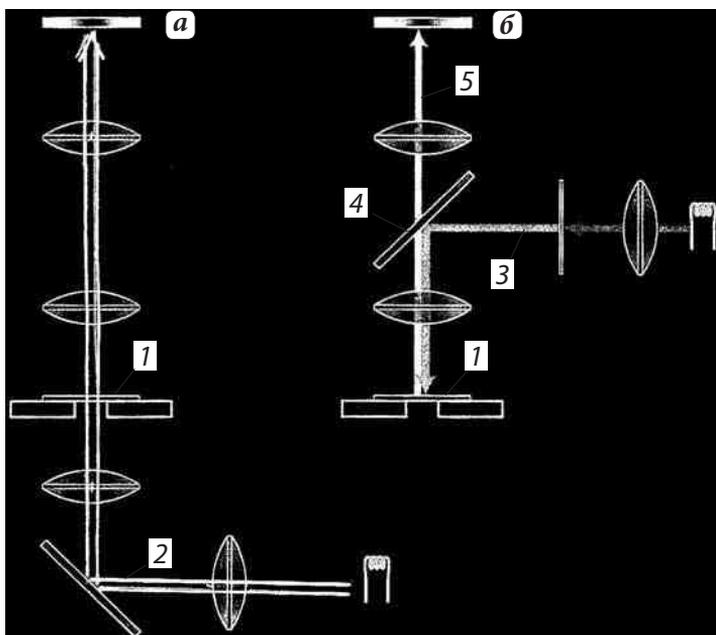


Рис. 3.1. Ход лучей и общая конструкция светового микроскопа:

1 — конденсорная линза; 2 — объект; 3 — объективная линза; 4 — окуляр



**Рис. 3.2.** Сравнение потоков света в просвечивающем (а) и флуоресцентном микроскопе (б):

1 — объект; 2 — поток света в обычном микроскопе; 3 — поток ультрафиолетового света во флуоресцентном микроскопе; 4 — зеркало или призма; 5 — поток флуоресцентного света, возбужденного в объекте

общем клетки хоть мало, но все же отличаются друг от друга по плотности и по светопреломлению. Проходя через них, свет изменяет свою фазу, однако такое изменение фазы световой волны наш глаз не улавливает, так как он чувствителен только к изменению интенсивности света. Последняя зависит от величины амплитуды световой волны. В фазово-контрастном микроскопе в объектив вмонтирована специальная пластинка, проходя через которую луч света испытывает дополнительный сдвиг фазы колебаний. При построении изображения взаимодействуют уже лучи, находящиеся в одной фазе либо в противофазе, но обладающие разной амплитудой; тем самым создается светло-темное контрастное изображение объекта.

При изучении живых клеток и тканей широко используют флуоресцирующие красители и **метод флуоресцентной микроскопии**. Суть его заключается в том, что целый ряд веществ обладает способностью светиться (флуоресцировать, люминесцировать) при поглощении ими световой энергии. Спектр флуоресценции всегда смещен в сторону больших длин волн по отношению к возбуждающему флуоресценцию излучению. Этот принцип используется в флуоресцентной микроскопии: рассматривание флуоресцирующих объектов в зоне коротких длин волн. Обычно в таких микроскопах применяются фильтры, дающие освещение в сине-фиолетовой области. Существуют ультрафиолетовые люминесцентные микроскопы (рис. 3.2).

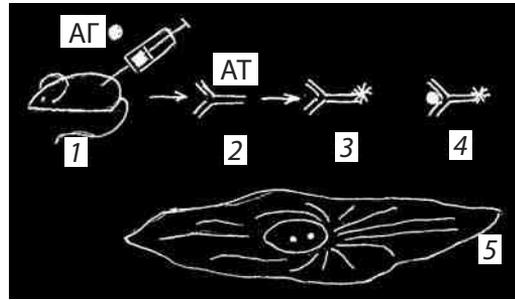
Метод флуоресцентной микроскопии можно применять, добавляя живым клеткам **флуорохромы** (флуоресцирующие вещества). Этот способ сходен с витальным окрашиванием в том смысле, что здесь также используют очень низкие концентрации красителя ( $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ ). Многие флуорохромы избирательно связываются с определенными структурами клетки, вызывая их вторичную

люминесценцию. Так, например, флуорохром акридиновый оранжевый избирательно связывается с нуклеиновыми кислотами. Причем, связываясь в мономерной форме с ДНК, он флуоресцирует зеленым цветом, а в димерной форме с РНК светится красным цветом. Наблюдая за живыми клетками, окрашенными акридиновым оранжевым, видно, что их ядра имеют зеленый цвет свечения, а цитоплазма и ядрышки светятся красным цветом. Тем самым в живой клетке с помощью этого метода можно видеть локализацию (а в некоторых случаях рассчитывать количество) тех или иных химических веществ. Например флуорохромы DAPI и Hoechst избирательно и количественно связываются с ДНК. Существуют флуорохромы, избирательно связывающиеся с липидами, слизью, кератином и др.

В живые клетки можно инъецировать также меченые флуорохромами антитела. Так, например, введенные в клетку связанные с флуорохромом антитела к белку тубулину соединяются с микротрубочками, которые теперь можно наблюдать в живых клетках с помощью флуоресцентного микроскопа (рис. 3.3).

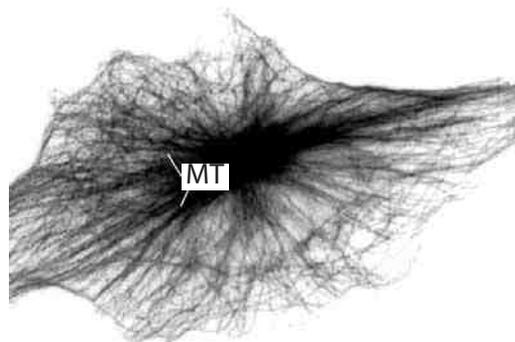
Метод флуоресцентной микроскопии широко используется для локализации в живых или фиксированных клетках и тканях специфических белковых молекул. Этот т.н. **метод иммунофлуоресценции** (рис. 3.4).

Принцип его заключается в том, что к антителам против какого-то белка (например, тубулина) химическим путем пришивают флуорохром, который метит только один выбранный белок-антитело. На препарат наносят такие меченые флуорохромом антитела, которые будут связываться только со своим антигеном (в данном случае с тубулином). В флуоресцентном микроскопе эти места связывания будут хорошо видны как светящиеся области, в которых локализован данный белок (см. рис. 3.3). Сходную процедуру можно проделать и с живыми клетками, если с помощью микроманипулятора инъецировать в них меченые антитела. В этом случае в живых клетках можно наблюдать не только за



**Рис. 3.3.** Схема метода иммунофлуоресценции (метод Кунца):

1 — инъекция антигена (например, тубулина) мышью; 2 — получение из сыворотки крови антител к тубулину; 3 — связывание выделенных антител с флуорохромом (например, с ФИТЦ); 4 — образование флуоресцентного комплекса антиген-антитела; 5 — фибробласт, тубулины которого связываются с мечеными флуорохромом антителами, выявляя тем самым расположение микротрубочек



**Рис. 3.4.** Микротрубочки фибробласта, окрашенные антителами к тубулину (фото А.В. Буракова): МТ — микротрубочки цитоплазмы

локализацией меченого комплекса «антиген–антитело», но и за его перемещением в клетке.

С помощью флуоресцентной микроскопии также можно локализовать в клетках молекулы нуклеиновых кислот или их фрагменты. Для этого используется т.н. метод гибридизации флуоресцирующих молекул нуклеиновых кислот- FISH (*fluorescence in situ hybridization*). В этом случае на клетки с денатурированной ДНК в составе ядер или хромосом наносят меченные флуорохромами одонитчатые молекулы нуклеиновых кислот, которые в процессе ренатурации связываются только с комплементарными последовательностями ДНК на препарате и таким образом четко выделяют их среди других молекул ДНК в ядрах.

## 2. Витальное (прижизненное) изучение клеток

Световой микроскоп позволяет видеть живые клетки. Для кратковременного наблюдения клетки помещают просто в жидкую среду на предметное стекло; если нужно длительное наблюдение за клетками, то используют специальные камеры. Это или плоские флаконы с отверстиями, закрытыми тонкими стеклами, или же разборные плоские камеры.

Клетки крови или другие свободные клетки многоклеточных можно изучать в капле плазмы или в специальных синтетических средах.

Для изучения клеток органов и тканей животных используют **метод клеточных культур**. Вырезанный кусочек ткани слегка обрабатывают раствором фермента трипсина или хелатона — версена, что приводит к его диссоциации, к полному разобщению клеток друг от друга. Затем такую взвесь отмытых клеток помещают в сосуд с питательной средой, где они опускаются на дно, прикрепляются к стеклу и начинают размножаться, образуя сначала колонии, а затем сплошной клеточный пласт. Так растут однослойные клеточные культуры, очень удобные для прижизненных наблюдений. Лучшее для получения первичных культур из тканей животных использовать эмбриональный материал; культуры из клеток взрослых организмов растут очень плохо.

При культивировании клеток вне организма кроме смены среды важно поддерживать и необходимую температуру (около 20 °С для хладнокровных и около 37 °С для теплокровных). Обязательным условием культивирования клеток является соблюдение стерильности. Существует целый ряд длительно культивируемых клеток; это специальные клеточные штаммы, приспособившиеся десятилетиями к росту вне организма. Большею частью это клетки опухолевого происхождения или значительно измененные клетки, приобретшие свойства опухолевых клеток.

Сейчас метод культивирования клеток вне организма широко используют не только для цитологических, но и для генетических, вирусологических и биохимических исследований.

Наблюдения за живыми клетками обычно регистрируются в виде фотографий, сделанных с помощью специальных фотонасадок к микроскопу. Живые клетки

можно снимать и на кинолентку. В ряде случаев такая микрокиносъемка дает очень важную информацию. Применяя ускоренную или замедленную киносъемку (цейтраферная киносъемка), можно подробно видеть протекание таких важных процессов, как деление клеток, фагоцитоз, течение цитоплазмы, биение ресничек и т.д.

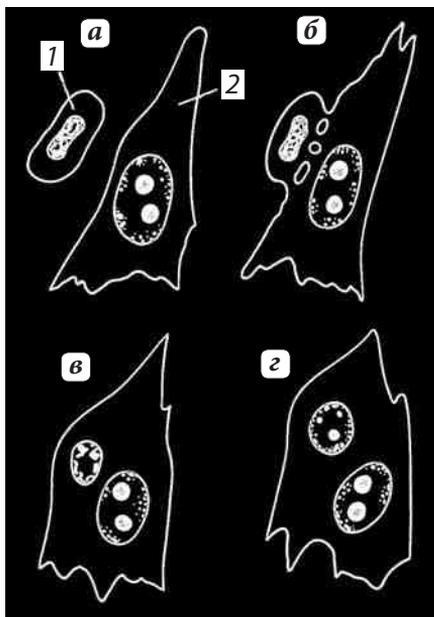
Теперь с развитием компьютерных технологий с помощью специальных фотокамер возможно получать изображение клеток прямо на мониторе компьютера, записывать их в памяти компьютера, всячески обрабатывать и получать отпечатки на принтерах цветных или черно-белых. Так же возможно использовать такую компьютерную видеотехнику для цейтраферной съемки подвижных объектов.

При исследовании живых клеток используют методы *микрохирургии*, оперативного воздействия на клетки. С помощью прибора — микроманипулятора клетки разрезают, извлекают из них части, вводят вещества (микроинъекция) и т.д. Микроманипулятор совмещают с обычным микроскопом, в который наблюдают за ходом операции. Микрохирургическими инструментами служат стеклянные крючки, иглы, капилляры, которые имеют микроскопические размеры и изготавливаются на специальных приспособлениях — «микрокузницах». При микроманипуляциях клетки помещают в специальные камеры, в которые вводят также инструменты. Так, с помощью микроманипулятора можно пересаживать ядра от одной клетки к другой.

С помощью таких микрохирургических инструментов можно поворачивать в клетках митотические веретена, оттаскивать отдельные хромосомы, вводить в живую клетку *меченые антитела* или разные белковые молекулы. Кроме механического воздействия на клетки в микрохирургии в последнее время широко применяют микропучки ультрафиолетового света или лазерные микропучки. Это дает возможность практически моментально инактивировать отдельные участки живой клетки. Так, можно инактивировать одно из ядрышек и следить за судьбой второго, интактного. В этом случае показано, что второе ядрышко принимает на себя дополнительную нагрузку и «работает за двоих». С помощью микропучков удастся поразить часть митотической хромосомы или участок веретена деления.

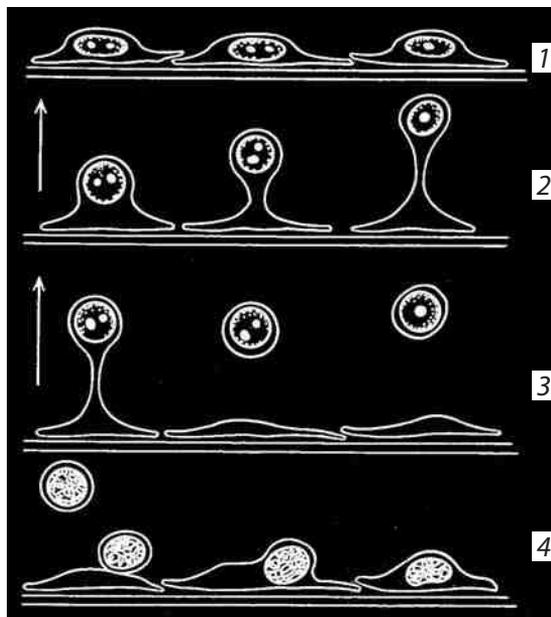
При изучении живых клеток пытаются их окрашивать с помощью так называемых витальных красителей. Это красители кислой (трипановый синий, литиевый кармин) или основной (нейтральный красный, метиленовый синий) природы, применяемые при очень большом разведении (1:200 000), следовательно, влияние красителя на жизнедеятельность клетки минимальное. При окрашивании живых клеток краситель собирается в цитоплазме в виде гранул, а в поврежденных или мертвых клетках происходит диффузное окрашивание цитоплазмы и ядра.

Большой вклад в биологию клетки вносят методы *клеточной инженерии*. Было найдено, что различные живые клетки могут сливаться друг с другом, если специальными способами обработать их плазматические мембраны. Так можно слить эритроцит курицы и лимфоцит человека. При этом получается двуядерная клетка, гетерокарион, в котором происходит активация ядра куриного эритроцита



**Рис. 3.5.** Образование гетерокариона из ядерного эритроцита курицы (1) и фибробласта человека (2):

**а** — две отдельные клетки; **б** — слияние их плазматических мембран и объединение клеточного содержимого; **в, г** — этапы активации ядра эритроцита



**Рис. 3.6.** Получение кариопластов и цитопластов:

1 — клетки культуры, обработанные цитохалазином; 2 — центрифугирование клеток; 3 — отделение участка цитоплазмы с ядром (кариопласт), оставшийся участок — цитопласт; 4 — реконструкция клеток из разнородных кариопластов и цитопластов. Стрелки указывают направление центробежных сил

(рис. 3.5). Если гетерокарион образуется из близкородственных клеток (например, мышцы и хомячки), то при вступлении их в митоз хромосомы могут объединиться в одну метафазную пластинку. После разделения такой клетки получится истинно гибридная клетка. Другие приемы позволяют конструировать клетки из разных по происхождению ядер и цитоплазмы (рис. 3.6). Так, разрушив актиновый компонент цитоскелета и подвергнув клетки центрифугированию можно клетку разделить на две части: ядро с узким ободком цитоплазмы — кариопласт и на оставшуюся часть цитоплазмы — цитопласт. Затем, используя разные кариопласты и цитопласты, можно создавать разные комбинации реконструированных клеток.

Методы клеточной инженерии широко применяют не только в экспериментальной биологии, но и в биотехнологических целях. Например, при получении моноклональных антител используют клеточные гибриды между лимфоцитами иммунизированных животных и интенсивно размножающимися клетками миеломы. Полученные первичные дикарионы образуют истинные гибридные клетки, которые интенсивно размножаются за счет генома опухолевых миеломных клеток, и одновременно выделяют большое количество антител, за счет работы генома иммунизированных лимфоцитов. Этот прием позволяет получать большое число гибридных клеток, вырабатывающих большие количества необходимых антител.

### 3. Изучение фиксированных клеток

Несмотря на важность и достаточную простоту витальных наблюдений, большая часть сведений о структуре и свойствах клеток получена на фиксированном материале. Если клетку повредить, она начинает претерпевать ряд изменений, а после смерти клетки в ней активируются аутолитические ферменты, что приводит к грубым изменениям клеточной структуры. Следовательно, задачи фиксации — это убить клетку, прекратить активность внутриклеточных ферментов, предотвратить распад клеточных компонентов, а также избежать потери структур и веществ, препятствовать появлению структур, отсутствующих в живой клетке (артефактные структуры). К сожалению, еще не найден такой химический фиксатор, который бы удовлетворял всем этим требованиям.

Часто для фиксации используют альдегиды и их смеси с другими веществами. В качестве фиксаторов применяют также спирты, вызывающие необратимую денатурацию белков, осаждение нуклеиновых кислот и полисахаридов. Осаждающим действием обладают также сулемовые фиксаторы и фиксаторы с пикриновой кислотой. Фиксаторы, содержащие четырехокись осмия ( $\text{OsO}_4$ ), хорошо сохраняют липиды.

После фиксации объекты в дальнейшем можно подвергать дополнительной обработке. Одной из главных таких обработок является окрашивание клеток. Именно дополнительное окрашивание клеток позволило выявить в них массу деталей.

Стекла с фиксированными мазками одноклеточных организмов или с клетками культуры ткани можно непосредственно помещать в красители. Но для окрашивания клеток в составе органов необходимо получить их срезы. Изучают такие срезы и отдельных клеток.

Для этого после фиксации кусочки органов обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации, спирт замещают ксилолом, а ксилол — парафином или другим заливочным материалом. Таким образом, фиксированная ткань, минуя высушивание на воздухе, оказывается заключенной в твердую массу парафина, которую можно нарезать.

Срезы толщиной до 5–10 мкм получают на специальном приборе — микро-томе. Такие срезы приклеивают на предметное стекло: парафин растворяется в ксилоле, ксилол удаляется спиртами, которые замещаются водой. Теперь срезы можно окрашивать водными растворами красителей. Для изготовления постоянных препаратов окрашенные срезы снова обезвоживаются и заливаются в канадский бальзам под покровным стеклом, эти препараты можно длительно хранить.

Широко используется метод приготовления срезов на замораживающем микро-томе без предварительной фиксации и обработки. Такой метод позволяет сохранять активность ферментов для дальнейшего выявления их гистохимическими методами или для применения иммунохимических способов определения различных белков.

Для окраски фиксированных тканей и клеток применяют различные натуральные и главным образом синтетические красители. Синтетические

красители подразделяют на кислые и основные. Основные красители представляют собой соли красящих оснований, содержащие в составе аминогруппы, которые и определяют их щелочность. Такие красители образуют солевые связи с кислотными группами в структурах клетки. Следовательно, участки клеток, богатые кислотными группами, свяжутся с основными красителями, будут, как их называют, базофильными. Структуры клеток с основными (щелочными) свойствами связываются с кислотными красителями и называются ацидо- или оксифильными.

Ряд красочных приемов, направленных на выявление специфических химических веществ, получил название *гистохимических* и *цитохимических*. Методов цитохимического анализа очень много.

Существует целый ряд специфических красочных приемов, прямо выявляющих те или иные вещества. Это собственно гистохимические (цитохимические) реакции. Основные требования, предъявляемые к такого рода реакциям, следующие: специфичность связывания красителя, неизменность локализации вещества.

Примером такого рода цитохимических реакций может быть широко применяемая реакция на ДНК, реакция Фельгена. Суть ее в том, что после специфического кислотного гидролиза только на ДНК в результате отщепления пуринов на дезоксирибозе образуются альдегидные группы. Эти группы могут взаимодействовать со специфическим индикатором, реактивом Шиффа (обесцвеченное основание фуксина), давая красное окрашивание в местах локализации ДНК. Связывание красителя в этом случае строго количественное, что позволяет не только обнаружить и указать места, где есть ДНК, но и измерить ее количество. Используя этот же принцип выявления альдегидных групп, можно в клетках видеть расположение полисахаридов после гидролиза их периодной кислотой (так называемая PAS-реакция).

Также специфически можно определить локализацию белков реакциями на отдельные аминокислоты (тирозин, триптофан, аргинин и др.). Липиды и жиры обнаруживают в клетках специальными красителями (судан черный), хорошо растворяющимися и аккумулирующимися в жировых включениях.

Целая группа цитохимических реакций связана с обнаружением ферментов. Общий принцип этих реакций в том, что в микроскоп видны не сами белковые ферменты, а места их локализации, которые обнаруживаются по продуктам их специфической ферментативной активности. Например, фосфатазы обнаруживаются по отложениям конечного продукта реакции — сульфата свинца; гидролазы выявляются по конечному продукту их реакции с солями тетразолия, которые образуют окрашенный осадок формазана, и т.п.

Количество конечного продукта цитохимической реакции можно определить с помощью *метода цитофотометрии*. Основу его составляет определение количества химических веществ по поглощению ими света определенной длины волны, можно узнать его количество.

На клетках и срезах различных тканей после соответствующих методов фиксации широко применяют иммунохимические реакции с использованием

специфических флуоресцирующих антител как на флуоресцентных, так и на конфокальных микроскопах (см. выше).

Для выяснения локализации мест синтеза биополимеров, для определения путей переноса веществ в клетке, для наблюдения за миграцией или свойствами отдельных клеток широко используют **метод радиоавтографии** — регистрации веществ, меченных изотопами (рис. 3.7). При радиоавтографическом исследовании клеткам

или животным вводится предшественник одного из макромолекулярных соединений (например, аминокислота или нуклеотид), один из атомов которого замещен радиоактивным изотопом. Например, вместо  $^{12}\text{C}$  введен атом  $^{14}\text{C}$ , вместо водорода — тритий  $^3\text{H}$  и др. В процессе синтеза в биополимер включится и меченая молекула предшественника. Регистрировать ее место в клетке можно с помощью фотоэмульсии. Если клетки в пласте или на срезе покрыть фотоэмульсией, то через некоторое время в результате распада изотопа — частицы, разлетающиеся хаотично в разных направлениях, попадут в зону чувствительного фотослоя и активируют в нем зерна бромистого серебра. Чем больше будет время экспозиции, т.е. контакта такой меченой клетки с фотоэмульсией, тем больше зерен  $\text{AgBr}$  будет засвечено. После экспозиции надо проявить препарат, при этом происходит восстановление серебра только в засвеченных гранулах, при фотофиксации препарата гипосульфитом незасвеченные гранулы  $\text{AgBr}$  растворяются. В результате из массы гранул, которые покрывали объект, останутся только те, которые были активированы  $\beta$ -излучением. Просматривая в микроскоп такие препараты, поверх которых нанесен слой фотоэмульсии, исследователь находит места локализации зерен серебра, которые располагаются напротив мест, где содержится меченое вещество.

Радиоавтографически нельзя изучать растворимые в воде соединения, так как в процессе обработки клеток водными растворами (фиксация, проявление и т.д.) они могут потеряться. Другое ограничение метода — достаточно высокая концентрация данных веществ, так как при низкой концентрации радиоактивного вещества время экспозиции увеличивается, при этом растет опасность появления фона засвеченных гранул  $\text{AgBr}$  за счет космического излучения.

Метод радиоавтографии — один из основных методов, позволяющих изучать динамику синтетических процессов, сравнить их интенсивность в разных клетках на одном и том же препарате. Например, с помощью этого метода при

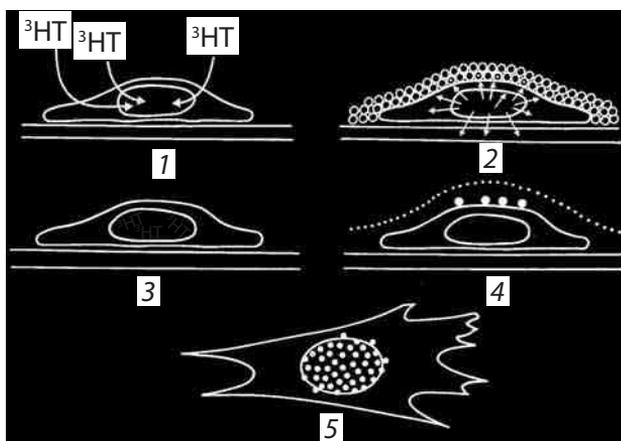


Рис. 3.7. Схема метода радиоавтографии:

1 — введение меченого  $^3\text{H}$ -тимидина; 2 — включение его в ДНК ядра; 3 — клетка покрыта фотоэмульсией, гранулы которой засвечиваются  $\beta$ -частицами; 4 — гранулы серебра над местами расположения изотопа в клетке; 5 — то же, вид сверху

использовании меченых предшественников РНК было показано, что вся РНК синтезируется только в интерфазном ядре, а наличие цитоплазматической РНК — результат миграции синтезированных молекул из ядра.

Метод радиоавтографии используется также для определения расположения определенных типов нуклеиновых кислот или отдельных нуклеотидных последовательностей в составе клеточных ядер или хромосом — **метод молекулярной гибридизации**. Для этого раствор с меченой нуклеиновой кислотой (например, с рибосомной РНК) или с ее фрагментом (например, с сателлитной ДНК) наносят на препарат, предварительно обработанный так, чтобы денатурированной ДНК (разорвать водородные связи в нативной ДНК) в составе хромосом или ядер, что достигается щелочной или температурной обработкой образца. В процессе ренатурации ДНК происходит образование молекулярного гибрида между меченой нуклеиновой кислотой из раствора и комплементарным ему участком ДНК в препарате. Место такой гибридизации определяется радиоавтографически. Этот метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот позволяет с большой точностью локализовать на хромосоме места с данной нуклеотидной последовательностью или даже расположение определенных генов.

Обычные методы световой микроскопии трудно использовать для воспроизведения трехмерной картины изучаемого объекта из-за небольшой глубины резкости микроскопа. Обычно клетки рассматриваются как оптические разрезы на данной глубине фокуса. Для того чтобы получить полную трехмерную реконструкцию объекта используют специальный **конфокальный сканирующий световой микроскоп**. С помощью этого прибора получают серии последовательных оптических срезов, взятых с различной глубины и изображения которых накапливаются в компьютере, и по специальной программе реконструируется трехмерное, объемное, изображение объекта. Обычно используют объекты, окрашенные флуорохромами.

## 4. Электронная микроскопия

Рассматривая характеристики светового микроскопа, можно убедиться, что единственным путем увеличения разрешения оптической системы будет использование источника освещения, испускающего волны с наименьшей длиной. Таким источником может быть раскаленная вольфрамовая нить, которая в электрическом поле выбрасывает поток электронов, последний можно фокусировать, пропуская через магнитное поле. Это послужило основой для создания электронного микроскопа, в котором уже сейчас достигнуто разрешение в  $1 \text{ \AA}$  (0,1 нм). По типу конструкции электронные микроскопы делятся на 2 класса: просвечивающие (*трансмиссионные*) и сканирующие (*растровые*). По принципу конструкции электронный микроскоп очень сходен с оптическим: в нем есть источник освещения (катод электронной пушки), конденсорная система (конденсорная магнитная линза), объектив (объективная магнитная линза), окуляр (проекционные магнитные линзы), только вместо

сетчатки глаза электроны попадают на люминесцирующий экран, либо на фотопластинку (рис. 3.8), либо на детектор, как в сканирующем микроскопе.

Основная часть трансмиссионного и сканирующего микроскопа представляет собой полый цилиндр (колонка микроскопа), из которого откачан воздух для того, чтобы не было взаимодействия электронов с молекулами газов и окисления вольфрамовой нити накаливания в катоде электронной пушки. Между катодом и анодом подается высокое напряжение (от 50 до 200–5000 кВ), что служит причиной ускорения электронов. В центре анода есть отверстие, проходя через которое электроны формируют пучок, идущий вниз по колонке микроскопа. Линзы электронного микроскопа представляют собой электромагниты, поле которых может изменять путь электронов (как стеклянные линзы изменяют путь фотонов). В конденсорной линзе пучок электронов фокусируется и попадает на объект, с которым электроны взаимодействуют, отклоняются, рассеиваются, поглощаются или проходят без изменения. В просвечивающем электронном микроскопе электроны, прошедшие через объект, фокусируются объективной линзой, которая формирует увеличенное первичное изображение объекта. Так же как в световом микроскопе, объективная линза определяет его основные показатели. Первичное изображение увеличивается проекционной линзой и проецируется на экран, покрытый люминесцентным слоем, светящимся при попадании на него электронов. Вместо светящегося экрана изображение можно поместить на фотопластинку и получить снимок.

Напряжение, которое используется для ускорения электронов в большинстве просвечивающих (трансмиссионных) электронных микроскопов, достигает 50–150 кВ. При напряжении в 50 кВ электрон обладает длиной волны в  $0,05 \text{ \AA}$ , и в этом случае теоретически можно было бы получить разрешение в  $0,025 \text{ \AA}$  ( $d \sim 0,5 \lambda$ ). Однако в современных конструкциях электронных микроскопов достигается разрешение около  $1 \text{ \AA}$  из-за недостаточной стабильности напряжения, стабильности тока линз, неоднородности металла магнитных линз и других несовершенств прибора (теоретически возможно еще повысить разрешение электронного

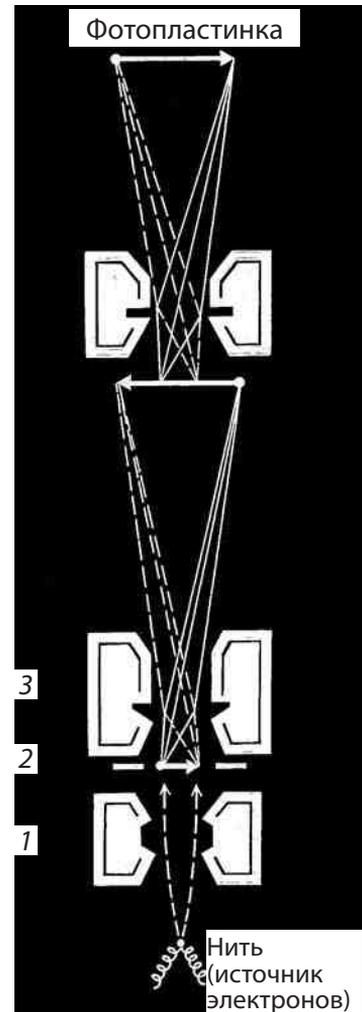


Рис. 3.8. Ход электронного пучка и общая конструкция электронного микроскопа:

- 1 — конденсорная малая линза;
- 2 — объект;
- 3 — объективная линза;
- 4 — проекционная линза

микроскопа в 100 раз). Но и достигнутое разрешение огромно (вспомним, что величина О-Н связи в молекуле воды равна 0,99 Å): оно сейчас уже в  $10^6$  раз выше разрешающей способности глаза!

На экранах и фотопластинках электронных микроскопов можно получить увеличение до 50 000 раз, в дальнейшем при фотопечати можно получить еще 10-кратное увеличение, так что конечное увеличение, при котором максимально реализуется разрешение, может достигать  $10^6$  раз (например, если 1 мм увеличить в  $10^6$  раз, то он достигнет длины в 1 км).

В настоящее время электронно-микроскопическое изображение с флуоресцирующего экрана с помощью цифровой телекамеры передается прямо в компьютер, где на экране монитора его можно обрабатывать различным образом (изменять увеличение, контрастность изображения, применять денситометрию, плани- и морфометрию отдельных компонентов). Используя принтер, можно получить отпечатки полученных изображений.

Максимальное разрешение электронного микроскопа (ЭМ) реализуется сейчас только при исследовании металлов или кристаллических решеток. На биологических объектах такого разрешения получить пока не удастся из-за низкой контрастности объекта. Биологические объекты для исследования в ЭМ помещаются на медные сеточки, покрытые тонкими пленками — подложками (формвар, коллодий, углерод), состоящими в основном из углерода. Биологические объекты также в основном содержат углерод и, следовательно, мало по плотности будут отличаться от фона, будут мало контрастны. Показано, что минимальная толщина биологического объекта с плотностью около  $1 \text{ г/см}^3$ , выявляемого при ускоряющем напряжении в электронном микроскопе 50 кВ, равна 50 Å. Вирусы, расположенные на поддерживающей пленке, будут видны в этом случае в виде бесструктурных пятен, а молекулы нуклеиновых кислот (толщина ДНК равна 20 Å) вообще не видны из-за низкого контраста. Контраст биологических объектов можно повысить, используя тяжелые металлы или их соли.

Одним из широко распространенных методов контрастирования биологических объектов является **оттенение металлами**. В этом случае в специальных вакуумных установках производится термическое испарение металла. При этом используют тяжелые металлы, такие как платина, палладий и их сплавы. Атомы металла разлетаются от места испарения по прямым траекториям. Встречаясь с объектом, они осаждаются на нем в виде слоя; его толщина будет больше в местах, перпендикулярных направлению полета частиц металла. Этот метод широко применяют не только для контрастирования вирусов, рибосом, но и для достаточно тонких молекул нуклеиновых кислот.

При **негативном контрастировании** объектов растворами солей тяжелых металлов применяют молибденовокислый аммоний, уранилацетат, фосфорновольфрамовую кислоту (ФВК). Если водные растворы таких веществ смешать с биологическими объектами, а затем их нанести на пленки-подложки и высушить, то объекты (например, вирусы или белковые комплексы) окажутся как бы погруженными в тонкий слой аморфного вещества высокой плотности. В электронном микроскопе они выглядят как светлые объекты на темном фоне (как фотонегатив).

Преимущества метода в том, что растворенные соли могут проникать в глубь объекта и выявлять дополнительные его детали. Негативное контрастирование широко применяют при изучении вирусов, ферментных комплексов мембран. Для позитивного контрастирования нуклеиновых кислот используют растворы уранилацетата в спирте или в ацетоне. Уранилацетат, контрастируя нуклеиновые кислоты, хорошо прокрашивает центральные полости сферических вирусов, значительно повышает контраст рибосом и позволяет видеть тонкие нити выделенных нуклеиновых кислот.

При изучении объектов в электронном микроскопе возникает еще одно осложнение — это их толщина. Дело в том, что при прохождении пучка электронов через объект часть электронов поглощается, что приводит к нагреванию объекта и к его деформации. Поэтому необходимо иметь тонкие объекты (не выше 0,1 мкм). Тем самым изучать в трансмиссионных микроскопах внутреннее строение целых клеток плохо и неудобно. Выход из этого положения аналогичен тому, что было найдено для световой микроскопии, — делать срезы очень малой толщины, *ультратонкие срезы* (0,05–0,10 мкм).

Процедура их изготовления в принципе сходна с той, что используется в световой микроскопии. Клетки и ткани для этого сначала фиксируют. В качестве фиксаторов используются буферные растворы глутарового альдегида или четырехоксида осмия. Наиболее часто применяется двойная фиксация: сначала глутаровый альдегид, а затем осмий, который как тяжелый металл контрастирует клеточные структуры. Затем, после обезвоживания, ткани пропитываются эпоксидными смолами или другими пластиками в жидкой, мономерной форме. При полимеризации таких пластмасс пропитанный ими объект оказывается заключенным в твердые блоки, которые уже можно резать на ультратонкие срезы. Оказалось, что идеально острой и без зазубрин режущей поверхностью обладают сколы стекла. Но стеклянные ножи очень недолговечны, их используют только один раз. Применяют алмазные ножи: это специальным образом заточенные мелкие алмазы, они служат в течение нескольких лет.

Проблема изготовления сверхтонкого среза была решена за счет термической подачи объекта. Блок с заключенным в пластмассу объектом крепится на металлическом стержне, который нагревается и тем самым продвигает объект вперед на определенную величину за известное время. И если эту термическую подачу согласовать с ритмическими циклами резания, то можно получить серии срезов заданной толщины. Это достигается при использовании специальных приборов — *ультрамикротомов*.

Площадь получаемых ультратонких срезов обычно очень мала (0,1–1 мм<sup>2</sup>), поэтому все операции при ультрамикротомировании идут под микроскопическим контролем. Срезы, смонтированные на сетках с подложкой, необходимо дополнительно контрастировать — «окрашивать» с помощью солей тяжелых металлов. В этом случае используют также соли свинца и урана, которые связываясь с внутриклеточными структурами на срезе, позитивно их контрастируют. Техника изготовления ультратонких срезов открыла огромные возможности для применения электронной микроскопии буквально во всех областях биологии и медицины.

Метод ультратонких срезов в просвечивающей электронной микроскопии позволил изучать не только ультраструктуру клеток, но и применить на этом уровне такие методы, как автордиография, гистохимия, иммунохимия.

Все большее применение получают методы приготовления ультратонких срезов без фиксации и заливки клеток в твердые пластмассы. При использовании методов криоультрамикротомии, т.е. получения срезов с замороженных тканей, моментально охлажденных до температуры жидкого азота ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). При этом происходит практически одновременное торможение всех метаболических процессов, а вода из жидкой фазы переходит в твердую, но не кристаллическую, ее молекулярная структура беспорядочна (стекловидное состояние). Такие твердые блоки при температуре жидкого азота можно резать на ультратонкие срезы (нож при этом также охлажден). Полученные срезы используют для выявления в них активности ферментов, для проведения на них иммунохимических реакций, для ферментативного переваривания и т.п.

Изучение срезов, полученных на криоультратомах, показало, что общая структура и композиция клеточных компонентов в данном случае мало отличаются от того, что видно при использовании химической фиксации и обычных приемов получения ультратонких срезов. Следовательно, те структуры, которые имеют одинаковую композицию при разных методах обработки материала, по-видимому, близки к своему прижизненному строению, не являются артефактными.

В пользу этого говорят данные по исследованию клеток с помощью иных приемов электронной микроскопии.

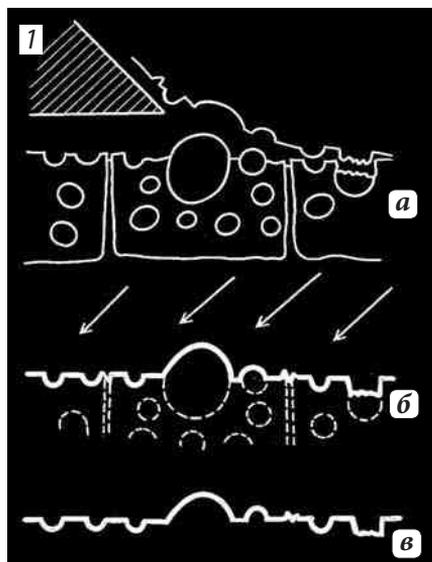


Рис. 3.9. Схема метода замораживания — скалывания:

**а** — скалывание замороженного объекта; **б** — напыление слоя металла и углерода на поверхность скола; **в** — растворение объекта и получение реплики с поверхности скола объекта; **1** — нож

Для изучения структуры различных мембранных компонентов клетки используют метод **замораживания — скалывания**. Он заключается в том, что объект сначала быстро замораживают жидким азотом, а затем при той же температуре переносят в специальную вакуумную установку. Там замороженный объект механическим способом скалывается охлажденным ножом. При этом обнажаются внутренние зоны замороженных клеток. В вакууме часть воды, перешедшей в стекловидную форму, возгоняется («травление»), а поверхность скола последовательно покрывается тонким слоем испаренного углерода, а затем металла. Таким образом, с замороженного и сохраняющего прижизненную структуру материала получают реплику с его скола (рис. 3.9). Оказалось, что и в этом случае общая организация клетки и ее компонентов сходна с тем, что мы видим при химической фиксации или при криотомии. Этот

метод позволил увидеть, что как на поверхности, так и в толщине клеточных мембран располагаются глобулы интегральных белков, что мембраны не однородны по своей структуре (рис. 3.10).

**Метод сканирующей (растровой) электронной микроскопии** позволяет изучать трехмерную картину поверхности клетки. При сканирующей электронной микроскопии тонкий пучок электронов (зонд) пробегает по поверхности объекта и полученная информация передается на электронно-лучевую трубку (рис. 3.11). Изображение может быть получено в отраженных или вторичных электронах. При этом методе фиксированный и специальным образом высушенный объект покрывается тонким слоем испаренного металла (чаще всего золота), отражаясь от которого электроны попадают в приемное устройство, передающее сигнал на электронно-лучевую трубку. Благодаря огромной глубине фокуса сканирующего микроскопа, которая значительно больше, чем у просвечивающего, получается почти трехмерное изображение исследуемой поверхности (рис. 3.12). Разрешающая способность этого типа приборов несколько ниже, чем у просвечивающих электронных микроскопов, но уже сейчас выпускаются приборы с разрешением 3–5 нм.

С помощью растровой электронной микроскопии можно получить информацию о химическом составе в тех или иных участках клеток. Так, метод рентгеноспектрального микроанализа основан на идентификации и количественной оценке содержания химических элементов по спектрам характеристического рентгеновского излучения, возникающего при взаимодействии первичных электронов с атомами объекта. Для получения такой информации, конечно, объекты не следует покрывать слоем металла, как при обычном методе сканирующей электронной микроскопии. Более того,



Рис. 3.10. Фрагмент клетки печени со сколотыми митохондриями

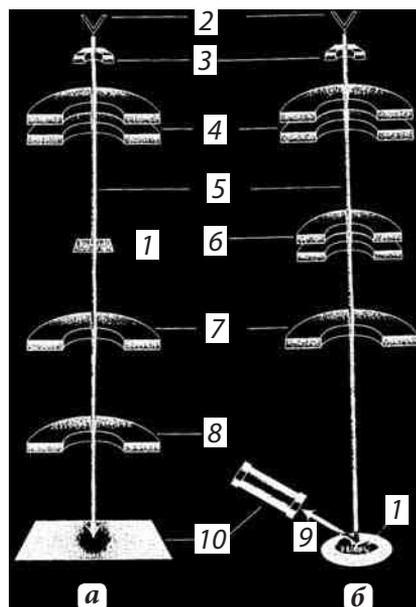
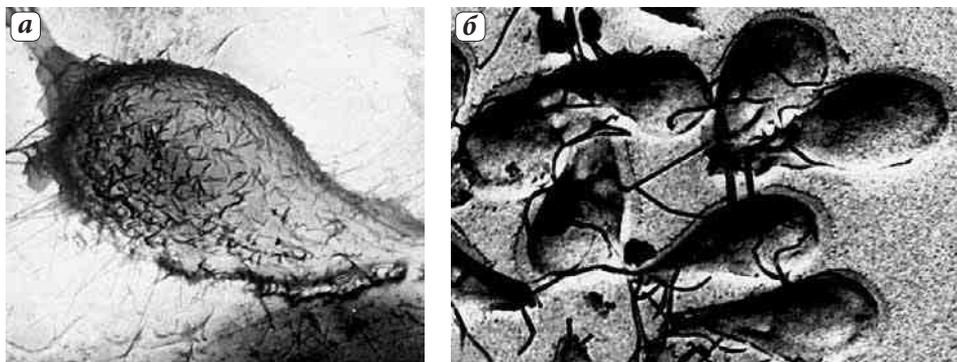


Рис. 3.11. Сравнение хода электронного пучка в просвечивающем (а) и сканирующем (б) электронном микроскопе:

1 — объект; 2 — катод; 3 — анод; 4 — конденсорная линза; 5 — пучки электронов; 6 — дефлектор луча; 7 — объективная линза; 8 — проекционная линза; 9 — отраженные лучи; 10 — детектор



**Рис. 3.12.** Сканирующая электронная микроскопия:

**а** — поверхность клетки в культуре ткани (фото Ю.А. Ровенского); **б** — жгутиконосец *Giardia intestinalis* из культуры вне организма (по М.М. Соловьеву и Ю.С. Ченцову)

объект нужно подготовить так, чтобы не было потери или дополнительного внесения элементов. Для этого используют быстро замороженные и высушенные в вакууме объекты.

## 5. Фракционирование клеток

В цитологии широко применяют различные методы биохимии, как аналитические, так и препаративные. В последнем случае можно получить в виде отдельных фракций разнообразные компоненты и изучать их химический состав, ультраструктуру и свойства. Так, в настоящее время в виде чистых фракций получают практически любые клеточные органеллы и структуры: ядра, ядрышки, хроматин, ядерные оболочки, плазматическую мембрану, вакуоли эндоплазматического ретикулума, его рибосомы, рибосомы гиалоплазмы, аппарат Гольджи, митохондрии, их мембраны, пластиды, пероксисомы, микротрубочки и т.д., и т.п. В последнее время получены чистые фракции центриолей и ядерных пор.

Получение клеточных фракций начинается с общего разрушения клетки, с ее гомогенизации. Затем из гомогенатов уже можно выделять фракции. Один из основных способов выделения клеточных структур — дифференциальное (разделительное) центрифугирование. При центрифугировании раньше всего и при небольших (1–3 тыс. g) ускорениях оседают ядра и неразрушенные клетки, при 15–30 тыс. g оседают крупные частицы, макросомы, состоящие из митохондрий, мелких пластид, пероксисом, лизосом и др., при 50 тыс. g оседают микросомы, фрагменты вакуолярной системы клетки. При повторном дробном центрифугировании этих смешанных подфракций можно получить чистые фракции.

Прежде чем анализировать выделенные фракции биохимическими способами, необходимо проверить их на чистоту с помощью электронного микроскопа.

Получение отдельных клеточных компонентов дает возможность изучать их биохимию и функциональные особенности. Так можно создать **бесклеточную систему** для рибосом, которые будут синтезировать белок по заданной экспериментатором информационной РНК, выделенные митохондрии в подобранных условиях могут осуществлять синтез АТФ, на выделенном хроматине при участии соответствующих ферментов может происходить синтез РНК и т. д.

В последнее время применяют бесклеточные системы для воссоздания клеточных надмолекулярных структур. Так, в экстрактах цитоплазмы яиц земноводных или яиц морских ежей, очищенных от гранул желтка, можно получить ядра с ядерной оболочкой из введенной в эту бесклеточную систему чужеродной ДНК. Такая ДНК связывается с белками-гистонами, которые есть в избытке в таком экстракте, при этом образуется хроматин (дезоксирибонуклеопротеид), который покрывается двойной мембранной оболочкой, несущей даже ядерные поры. Такие модельные системы помогают изучать тонкие, интимные процессы, например транспорт макромолекул из цитоплазмы в ядро и наоборот. В цитоплазматических экстрактах яиц земноводных и иглокожих такие ядра могут периодически делиться путем митоза. Эти модели внесли огромный вклад в расшифровку природы регуляции клеточного цикла.

# Часть II

## СТРОЕНИЕ И ХИМИЯ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА

### Глава 4

## Морфология ядерных структур

### 1. Роль ядерных структур в жизнедеятельности клетки

Когда мы рассматриваем клетку как единую систему функциональных единиц, то каждая из них представляет, в свою очередь, новую систему или морфофункциональную подсистему. Так, ядро среди других структур клетки — многокомпонентная система хранения, воспроизведения и реализации генетической информации, состоящая из хромосом (интерфазный хроматин), продуктов их активности, ядерной оболочки, ядерного белкового матрикса и дополнительных (но обязательных) компонентов.

Понимание роли ядра в жизнедеятельности клетки было получено не сразу. Клеточное ядро как обязательная структура было описано в работах ботаника Р. Брауна (1833) еще до полного формулирования клеточной теории Т. Шванна. Вначале ядру приписывалась роль некоего центра, вокруг которого конденсируется «зернистая масса», что и приводит к образованию клетки (теория «цитобластемы» М. Шлейдена). Однако уже в 1858 г. Р. Вирхов, противник самозарождения живого и клетки в том числе, выдвинул тезис о том, что «ядро в клетке играет роль чрезвычайно важную, ... и притом не столь важную для отправления, для специальной работы клетки, сколько для сохранения и размножения ее как живого элемента». Первая часть этого тезиса в дальнейшем получила полное подтверждение, т. к. теперь точно знаем, что все «специальные работы клетки» определяются белками, свойства которых генетически детерминированы ядерными хромосомными компонентами. Вторая часть утверждения Вирхова имеет огромное значение до сего дня: ядро является структурой хранения и воспроизведения генетической информации.

Приведенный в главе 2 краткий обзор основных процессов, связанных с синтезом белка, в принципе одинаковых у всех форм живого, указывает на особое

значение клеточного ядра. Ядро осуществляет две группы общих функций: одну, связанную собственно с хранением генетической информации, другую — с ее реализацией, с обеспечением синтеза белка.

В первую группу входят процессы, связанные с поддержанием наследственной информации в виде неизменной структуры ДНК. Эти процессы связаны с наличием так называемых репарационных ферментов, ликвидирующих спонтанные повреждения молекулы ДНК (разрыв одной из цепей ДНК, часть радиационных повреждений), что сохраняет строение молекул ДНК практически неизменным в ряду поколений клеток или организмов. Далее, в ядре происходит воспроизведение или редупликация и разъединение (сегрегация) молекул ДНК, что дает возможность двум клеткам получить совершенно одинаковые и в качественном и количественном смысле объемы генетической информации. В ядре эукариот происходят процессы изменения и рекомбинации генетического материала, что наблюдается во время мейоза (кроссинговер). Наконец, ядра непосредственно участвуют в процессах распределения молекул ДНК при делении клеток.

Другой группой клеточных процессов, обеспечивающихся активностью ядра, является создание собственного аппарата белкового синтеза. Это не только синтез, транскрипция на молекулах ДНК разных информационных РНК, но также транскрипция всех видов трансферных РНК и рибосомных РНК. В ядрах эукариотических клеток происходит «созревание» (процессинг, сплайсинг) первичных транскриптов. В ядре эукариот происходит также образование субъединиц рибосом путем комплексования синтезированных в ядрышке рибосомных РНК с рибосомными белками, которые синтезируются в цитоплазме и переносятся в ядро. Таким образом, ядро представляет собой не только вместилище генетического материала, но и место, где этот материал воспроизводится и функционирует. Поэтому выпадение или нарушение любой из перечисленных выше функций губительно для клетки в целом. Так, нарушение репарационных процессов будет приводить к изменению первичной структуры ДНК и автоматически к изменению структуры белков, что непременно скажется на их специфической активности, которая может просто исчезнуть или измениться так, что не будет обеспечивать клеточные функции, в результате чего клетка погибает. Нарушения редупликации ДНК приведут к остановке размножения клеток или к появлению клеток с неполноценным набором генетической информации, что тоже губительно для клеток. К такому же результату приведет нарушение процессов распределения генетического материала (молекул ДНК) при делении клеток. Выпадение в результате поражения ядра или в случае нарушений каких-либо регуляторных процессов синтеза любой формы РНК автоматически приведет к остановке синтеза белка в клетке, или к грубым его нарушениям.

Все это указывает на ведущее значение ядерных структур в процессах, связанных с синтезом нуклеиновых кислот и белков — основных функционеров в жизнедеятельности клетки.

Однако необходимо еще раз подчеркнуть, что функционирование ядра как системы хранения и реализации генетической информации сопряжено,

неразрывно связано с другими функциональными системами клетки, которые обеспечивают работу ядра специальными белками, потоком предшественников, энергией и пр.

## 2. Ядерные компоненты прокариот

Как уже говорилось, клетки царства прокариотических, или «доядерных», организмов не имеют обособленного клеточного ядра. Однако у всех прокариотических клеток есть аналог ядра эукариот, который носит название **нуклеоид**, или

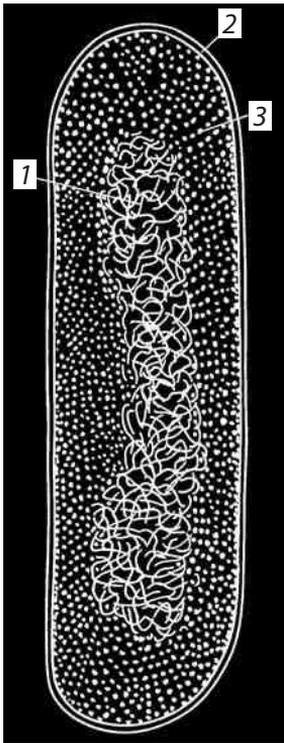


Рис. 4.1. Бактериальный нуклеоид на срезе клетки *Propionibacterium shermanii*:

1 — нуклеоид; 2 — плазматическая мембрана; 3 — рибосомы

**нуклеоплазма**. Нуклеоид прокариот можно отнести к собственно ядерным структурам из-за того, что он содержит ДНК. Нуклеоид достаточно четко выявляется в световом микроскопе после специфической окраски на ДНК по методу Фельгена или при окраске флуорохромами. Его можно наблюдать и с помощью фазово-контрастного устройства у крупных бактерий или синезеленых водорослей, как темное и более контрастное образование в срединной части клетки. На ультратонких срезах зона нуклеоида представлена тонкими рыхлыми сетями фибрилл толщиной 2–7 нм (рис. 4.1). Эта зона **нуклеоида**, или **нуклеоплазмы**, на ультратонких срезах свободна от других структур и выглядит более светлой по сравнению с окружающей цитоплазмой, заполненной рибосомами, различными гранулами и мембранами. Иногда на срезах можно наблюдать контакты фибрилл нуклеоида с плазматической мембраной, с ее выростами.

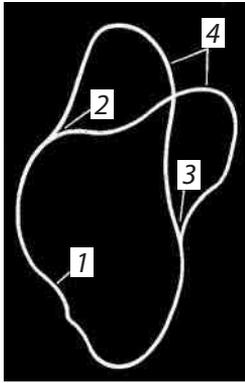
Нуклеоиды бактерий можно выделить, их состав и структура изучены довольно подробно, они на 80% состоят из ДНК, кроме которой обнаруживаются различные белки (20%) и РНК.

Количество ДНК в прокариотических клетках значительно меньше, чем в клетках эукариот. Например, бактерия *E. coli* содержит  $5 \cdot 10^{-3}$  пг<sup>1</sup>, или  $4,2 \cdot 10^6$  п.н. ДНК, которая кодирует около 2000 генов, в то время как в ядре клетки человека содержится около 6 пг ( $7 \cdot 10^9$  п.н. ДНК,

что соответствует огромному ( $10^5$ ) числу генов.

С помощью метода аденоавторграфии меченых молекул ДНК в световом микроскопе было обнаружено, что бактериальные ДНК представляют собой замкнутые циклы (рис. 4.2). У *E. coli* периметр такого кольца составляет около

<sup>1</sup> Единицы измерения ДНК: пг —  $1 \cdot 10^{-12}$  г; Да —  $1,67 \cdot 10^{-24}$  г; 1 нуклеотидная пара (н.п.) —  $1 \cdot 10^3$  Д, величина н.п. ~0,34 нм.



**Рис. 4.2.** Репликация хромосомы *E. coli*:

1 — исходная ДНК кольцевой хромосомы;  
2, 3 — вилки репликации; 4 — вновь синтезированные участки

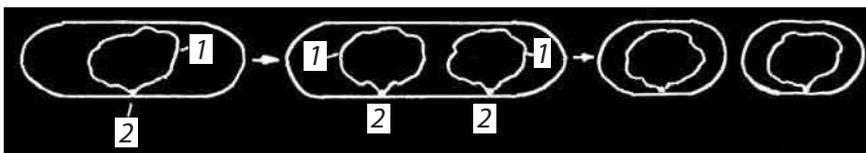
1,6 м и считается, что на клетку приходится одна гигантская циклическая молекула ДНК, одна бактериальная хромосома или генофор с молекулярной массой  $4 \cdot 10^9$  Д. Самая маленькая бактериальная хромосома обнаружена в клетках микоплазмы — 0,25 м (для сравнения, длина ДНК на одну хромосому эукариотической дрожжевой клетки составляет около 4,6 м, а у человека — 40 м (!) в 1 хромосоме).

У ряда бактерий, например у *B. subtilis*, имеется от 2 до 9 одинаковых молекул ДНК и соответственно несколько нуклеоидов. В других случаях (*Azotobacter vinelandii*) около 40 хромосом организованы в один нуклеоид.

С помощью автордиографической методики было также обнаружено, что репликация такой кольцевой хромосомы у *E. coli* начинается на одной исходной (*origin*) точке репликации, образуются две репликационные вилки, которые по мере синтеза ДНК движутся вдоль молекулы до терминальной, конечной точки (рис. 4.3). Тем самым вся такая гигантская молекула ДНК представляет единицу репликации — **репликон**. Скорость репликации у бактерий составляет около 30 мкм/мин, что согласуется со временем удвоения клеток, равным около 40 мин.

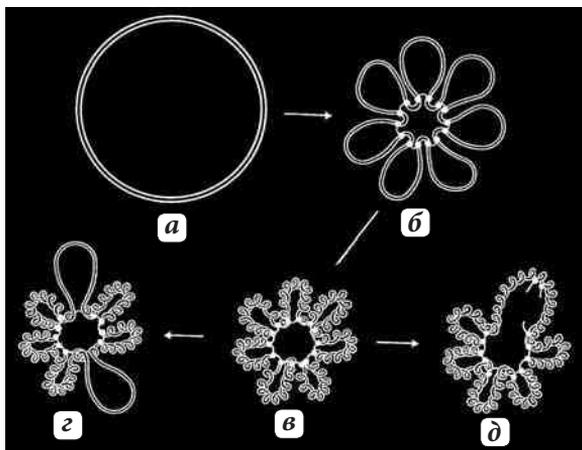
Бактериальные хромосомы всегда связаны с плазматической мембраной через специфические мембранные белки, которые взаимодействуют с ДНК в зоне старта ее синтеза. В процессе клеточного деления существенных изменений в компактности нуклеоплазмы не наблюдается, в отличие от эукариотических хромосом.

Такие кольцевые молекулы ДНК бактерий были получены при полном удалении белков (депротеинизация). Если же изучать выделенные целые нуклеоиды бактерий, то они представляют собой тела, состоящие из многочисленных



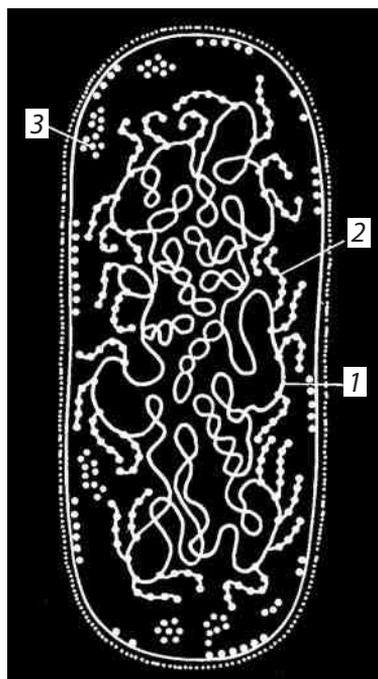
**Рис. 4.3.** Хромосома бактериальной клетки связана с плазматической мембраной в точке начала репликации в течение всего клеточного цикла:

1 — ДНК хромосомы (нуклеоида); 2 — точки начала репликации



**Рис. 4.4.** Модель конденсации бактериальной хромосомы:

**а** — кольцевая хромосома; **б** — боковые шивки образуют петлевые домены; **в** — сверхспирализация доменов, **г** и **д** — различные формы деконденсации нуклеоида



**Рис. 4.5.** Схема организации нуклеоида бактериальной клетки:

**1** — петлевые домены ДНК; **2** — рибосомы на вновь синтезированных молекулах иРНК; **3** — рибосомы цитоплазмы

суперспирализованных петель ДНК, отходящих от плотной центральной области (рис. 4.4). В одну такую петлю, или домен, входит до 10–15 мкм ДНК, или около 40 000 н.п., а всего таких петель — около 120.

Обработка выделенных нуклеоидов РНК-азой и протеолитическими ферментами приводит к разрушению центральной области нуклеоидов, а короткая обработка ДНК-азой — к снятию сверхспирализации петель, и декомпактизации всего нуклеоида. Таким образом, было показано, что компактизация нуклеоида связана с наличием связей, содержащих РНК и не-

которые белки. Тем самым гигантская кольцевая молекула — хромосома с помощью РНК и белков многократно складывается, образуя многочисленные петли, ДНК которых подвергается сверхспирализации, что приводит к значительной компактизации всего комплекса, который и представляет собой нуклеоид. Степень компактизации ДНК в нуклеоиде бактерий достигает 1000 крат, а концентрация ДНК доходит до 10 мг/мл (!).

Необходимо подчеркнуть, что часть ДНК нуклеоида связана с небольшим числом специальных основных белков, отличных от гистонов эукариот. Одна молекула одного из таких белков (Н-NS) приходится на 400 н.п. ДНК.

С петлями ДНК нуклеоида связано большое число молекул различных синтезируемых РНК и рибосом, которые обнаруживаются по периферии нуклеоплазмы.

Одна из моделей организации нуклеоида предполагает, что центральная его часть представлена неактивной и сверхспирализованной ДНК, тогда как по его периферии расположены деспирализованные петли, на которых происходит синтез различных РНК (рис. 4.5).

Отличительная черта ядерных структур прокариот в том, что у них синтез РНК и синтез белка может происходить одновременно: рибосомы связываются с еще не до конца синтезированными молекулами иРНК и производят на них синтез белка. Таким образом возникает тройственный синтетический комплекс: ДНК — синтезирующая цепь РНК — рибосомы с синтезируемой полипептидной цепочкой (рис. 4.6). Такая ситуация возможна лишь в том случае, когда образующаяся молекула иРНК не подвергается дальнейшей модификации типа процессинга, характерного для эукариотических клеток (см. ниже). У прокариотов, таким образом, процессы транскрипции и трансляции не разобщены территориально, в то время как у эукариотических клеток эти процессы протекают в двух разных компартментах, разделенных специальной ядерной оболочкой.

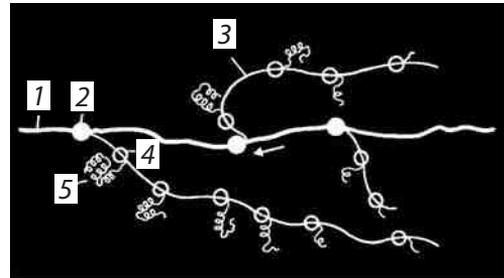


Рис. 4.6. Одновременная транскрипция иРНК и синтеза белка на участке бактериального нуклеоида:

1 — ДНК; 2 — РНК-полимераза; 3 — иРНК; 4 — рибосома; 5 — полипептид

Отличается поведение ядерного материала прокариотов от такового эукариот при делении клетки и в течение клеточного цикла.

**Клеточный цикл** — это время существования клетки от деления до деления. Как уже указывалось, деление всех типов клеток происходит только после удвоения ДНК. У бактерий часто сам процесс разделения тела клетки, цитотомия, не связана с окончанием синтеза ДНК, т.к. до наступления клеточного деления может начаться второй или даже третий раунд репликации ДНК. В результате такого непрерывного синтеза ДНК в быстро растущих культурах на каждую разделившуюся клетку приходится одна кольцевая хромосома на промежуточных стадиях ее дальнейшего удвоения, т.е. каждая дочерняя клетка сразу после деления уже содержит частично реплицированный геном.

При делении бактериальных клеток не происходит особой конденсации ДНК в составе нуклеоида. По мере роста клетки в длину зона нуклеоида после синтеза ДНК увеличивается, а затем делится с помощью специального механизма. Обособление и разъединение двух дочерних хромосом связано с расхождением мест прикрепления хромосом к плазматической мембране (см. ниже).

### 3. Ядро эукариотических клеток

Сам термин «ядро» впервые был применен Брауном в 1833 г. для обозначения шаровидных постоянных структур в клетках растений. Позднее такую же структуру описали во всех клетках высших организмов.

Однако ядра как таковые не всегда видны в клетках. Это зависит от стадии развития клетки и от стадии клеточного цикла (см. ниже). Ядра выявляются чаще

всего в виде шаровидных образований в т.н. **интерфазе** (или по старой терминологии в «**покоящихся**» клетках). На самом деле эти «покоящиеся», или интерфазные, ядра находятся в самом активном состоянии, т.к. именно в интерфазе происходят все процессы, связанные с генетической ролью ДНК: редупликации ДНК, транскрипции всех видов РНК, образование субъединиц рибосом, синтез огромного числа белков.

Когда клетка переходит к делению, все синтетические процессы в ядре прекращаются (это на самом деле и есть «покоящееся» состояние хромосом), а само ядро перестраивается и наступают фазы клеточного деления — митоз или кариокинез. Именно в это время происходит морфологическое выявление хромосом, их расхождение и деление тела клетки (цитокинез). Таким образом, в жизни клеток существует 2 состояния: интерфаза — временной промежуток между клеточными делениями и собственно фаза выявления митотических хромосом. Обычно интерфаза — наиболее долговременное состояние клеток.

Ядерный аппарат эукариотических клеток имеет ряд отличий от прокариотических. Во-первых, ДНК-содержащий компонент отделен от цитоплазмы специальной оболочкой — **ядерной оболочкой**; во-вторых, количество ДНК в ядрах эукариот в тысячи раз больше, чем в составе нуклеоидов бактерий; в-третьих, ДНК эукариот представляет собой сложный нуклеопротеидный комплекс, образующий специальную структуру — **хроматин**, из которого и состоят эукариотические хромосомы. Далее — в состав ядер эукариот входят несколько физически не связанных хромосом, каждая из которых содержит одну линейную гигантскую молекулу ДНК. Каждая хромосомная ДНК представляет собой полирепликонную структуру, т.е. содержит множеств автономно реплицирующихся участков. Синтез и образование транскриптов эукариотических клеток сопровождается процессами вторичной их перестройки, «созревания», включающих как фрагментацию (процессинг), так и сращивание отдельных фрагментов ДНК (сплайсинг). Наконец, в ядрах не происходит синтеза белков, т.е. в эукариотических клетках процессы синтеза ДНК и РНК разобщены от процесса синтеза белков.

Клеточное ядро, обычно одно на клетку (есть примеры многоядерных клеток), состоит из **ядерной оболочки**, отделяющей его от цитоплазмы, **хроматина** (материала интерфазных хромосом), **ядрышка** и других продуктов синтетической активности, **ядерного белкового остова (матрикса)** и **кариоплазмы (или ядерного сока)** (рис. 4.7). Эти основные компоненты встречаются практически во всех неделящихся клетках эукариотических одно- или многоклеточных организмов.

Главный компонент ядер, хроматин, является структурой, выполняющей генетическую функцию клетки, в хроматиновой ДНК заложена практически вся генетическая информация. Ядерная оболочка выполняет сложную барьерно-рецепторную, а также транспортную и каркасную функцию. Нехроматиновый ядерный белковый остов — **матрикс** — обеспечивает не только пространственное расположение хромосом в ядре, но и участвует в их функциональной активности. Одним из хромосомных участков, определяющих синтез рРНК и образование клеточных рибосом, является **ядрышко**. Кроме того, в ядре в связи с хроматином и матриксом обнаруживаются различные рибонуклеопротеидные структуры, содержащие разные

типы РНК. Между всеми этими компонентами заключена жидкая фаза клеточного ядра, кариоплазма, в которой протекают многие процессы, связанные как с ядерным метаболизмом, так и с внутриядерным транспортом белков и РНК.

При наблюдении многих живых клеток или же клеток после фиксации и окраски, внутри ядра выявляются зоны плотного вещества, которое хорошо воспринимает разные красители, особенно основные. Благодаря такой способности хорошо окрашиваться этот компонент ядра и получил название «хроматин» (Флемминг, 1880). Способность хроматина вос-

принимать основные (щелочные) красители указывает на его кислотные свойства, которые определяются тем, что в состав хроматина входит ДНК в комплексе с белками. Такими же свойствами окрашиваемости и содержанием ДНК обладают и хромосомы, которые можно наблюдать во время митотического деления клеток.

В отличие от прокариотических клеток, ДНК-содержащий материал хроматина эукариот, может пребывать в двух альтернативных состояниях: деконденсированном в интерфазе и в максимально уплотненном — во время митоза, в составе митотических хромосом.

В неделящихся (интерфазных) клетках хроматин, выявляемый в обычный микроскоп, может равномерно заполнять объем ядра или же располагаться отдельными сгустками (хромоцентры). Часто он особенно четко выявляется на периферии ядра (пристеночный, маргинальный, примембранный хроматин) или образует внутри ядра переплетения довольно толстых (около 0,3 мкм) и длинных тяжей, образующих подобие внутриядерной сети (рис. 4.8).

Хроматин интерфазных ядер представляет собой несущие ДНК тельца (хромосомы), которые теряют в это время свою компактную форму, разрыхляются, деконденсируются. Степень такой деконденсации хромосом может быть различной в ядрах разных клеток. Когда хромосома или ее участок полностью деконденсирован, тогда эти зоны называют *диффузным хроматином* (рис. 4.9).

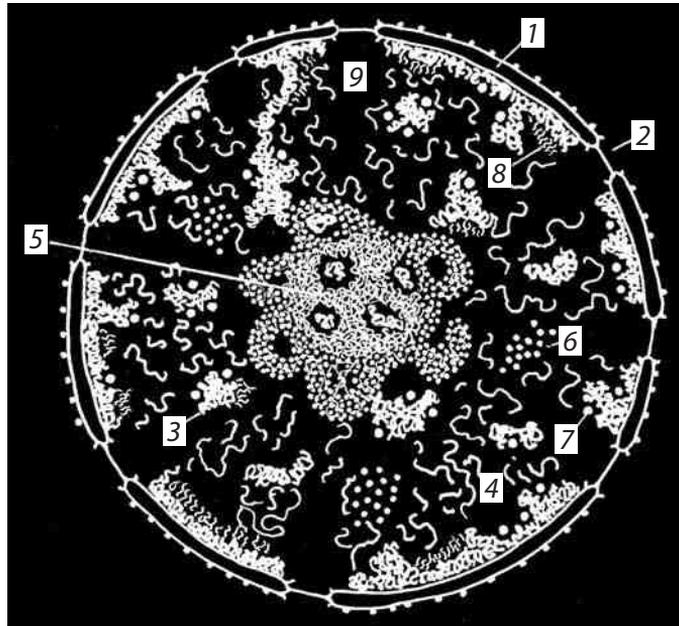


Рис. 4.7. Схема строения клеточного ядра:

1 — ядерная оболочка (две мембраны, внутренняя и внешняя, и перинуклеарное пространство); 2 — ядерная пора; 3 — конденсированный хроматин; 4 — диффузный хроматин; 5 — ядрышко (гранулярный и фибриллярный компоненты, в центральных светлых зонах находится рДНК); 6 — интерхроматиновые гранулы (РНП); 7 — перихроматиновые гранулы (РНП); 8 — перихроматиновые фибриллы (РНП); 9 — кариоплазма, ядерный сок

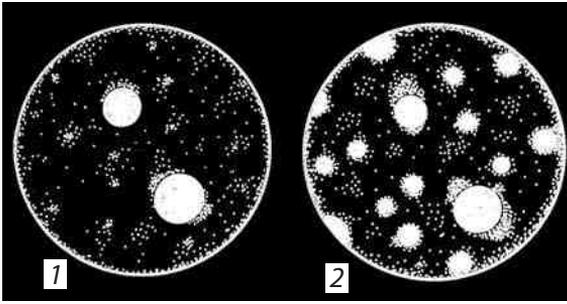


Рис. 4.8. Структурные типы ядер:

1 — диффузный; 2 — хромоцентрический

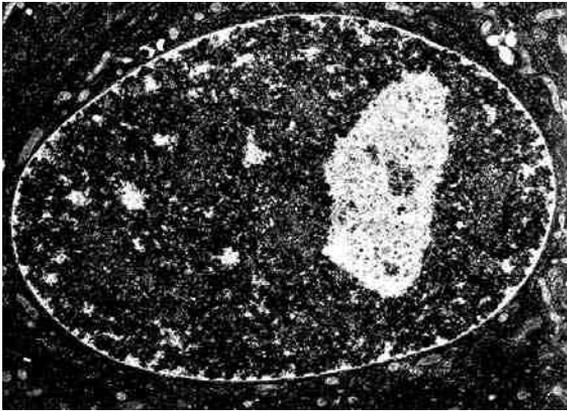


Рис. 4.9. Ультраструктура интерфазных ядер

Ядро диффузного типа: клетка культуры ткани почек

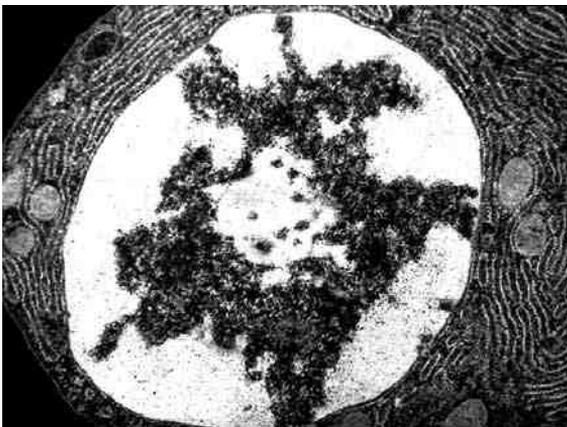
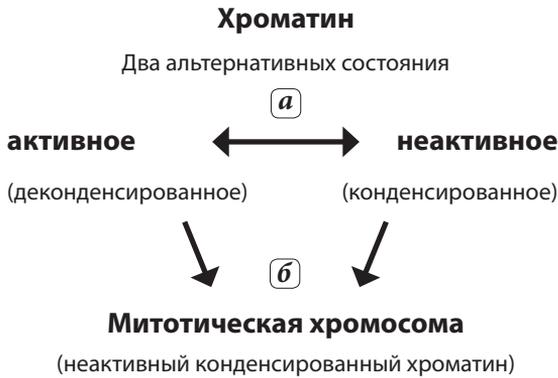


Рис. 4.10. Ядро с конденсированным хроматином тимоицита мыши

При неполном разрушении хромосом в интерфазном ядре видны участки **конденсированного хроматина** (иногда называемого гетерохроматином). Показано многочисленными работами, что степень деконденсации хромосомного материала, хроматина, в интерфазе может отражать функциональную нагрузку этой структуры. Чем более диффузен хроматин интерфазного ядра, тем выше в нем синтетические процессы. Так, в клетках лимфоцитов хроматин образует значительные скопления по периферии клеточного ядра (рис. 4.10). При стимуляции этих клеток к синтезу ДНК по мере включения предшественника ДНК  $^3\text{H}$ -тимидина происходит постепенная деконденсация хроматина. Таким же образом меняется структура хроматина при синтезе РНК. Падение синтеза ДНК и РНК в клетках обычно сопровождается увеличением зон конденсированного хроматина. Так, в эритроцитах низших позвоночных практически весь хроматин ядер находится в конденсированном состоянии, и в этих ядрах не происходит синтеза ни РНК, ни ДНК. Если же ядра этих клеток стимулировать к синтезу РНК, например, в гетерокарионах (см. ниже), то они переходят в диффузное состояние.

Максимально конденсирован хроматин во время митотического деления клеток, когда он обнаруживается в виде телец — **хромосом**. В этот период



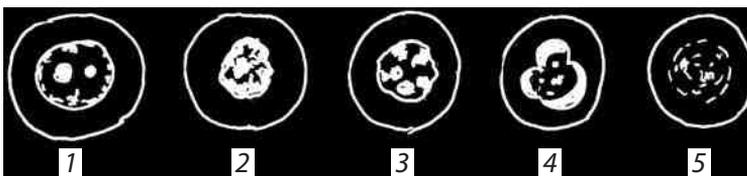
**Рис. 4.11.** Альтернативные структурно-функциональные состояния эукариотических хромосом:

**а** — интерфазный хроматин; **б** — митотические хромосомы;

хромосомы не несут никаких синтетических нагрузок, в них не происходит включения предшественников ДНК и РНК.

Исходя из этого, можно считать, что хромосомы клеток могут находиться в двух структурно-функциональных состояниях: в *рабочем*, частично или полностью деконденсированном, когда с их участием в интерфазном ядре происходят процессы транскрипции и редупликации, и в *неактивном* — в состоянии метаболического покоя при максимальной их конденсации, когда они выполняют функцию распределения и переноса генетического материала в дочерние клетки (рис. 4.11).

При патологических изменениях клеток интерфазные ядра и, в первую очередь, хроматин резко меняют свое состояние. Обратимые изменения клеток (временное изменение гомеостаза из-за нарушения проницаемости мембран, изменение тоничности окружающей среды и т.п.) приводят к изменениям морфологии ядер. При кратковременном падении тоничности среды ядра набухают, то же самое происходит и с ядрышками, тогда как в гипертонических условиях ядра резко конденсируются. Сходные изменения структуры ядер происходят и при других изменениях в клетках, например, при кислородном голодании. Конденсация хроматина — **карипикноз** — можно наблюдать и в погибших некротических клетках. У последних ядра часто претерпевают т.н. **кариолизис** — растворение ядра вследствие контакта хроматина с гидролазами лизосом. Другой формой необратимого изменения ядер является **кариорексис** — фрагментация ядер на отдельные глыбки хроматина. Однако последнюю форму патологии трудно отличить от апоптотических телец, которые возникают при фрагментации ядер и клеток в ходе программируемой клеточной гибели (рис. 4.12).



**Рис. 4.12.** Патологические формы интерфазных ядер:

1 — нормальное ядро; 2 — кариопикноз; 3 — кариорексис; 4 — кариоапоптоз; 5 — кариолизис

## 4. Эухроматин и гетерохроматин

Многими исследователями было отмечено, что степень структуризации, конденсации хроматина в интерфазных ядрах может быть выражена в разной мере. Так в интенсивно делящихся и в мало специализированных клетках ядра имеют *диффузную* структуру, в них кроме узкого периферического ободка конденсированного хроматина встречается небольшое число мелких хромоцентров, основная же часть ядра занята диффузным, деконденсированным хроматином. Но в клетках высокоспециализированных или в клетках, заканчивающих свой жизненный цикл, хроматин представлен в виде массивного периферического слоя и крупных хромоцентров, блоков конденсированного хроматина. Такую структуру имеют, например, ядра нормобластов (одна из стадий дифференцировки эритроцитов), ядра зрелых лейкоцитов. Эти два примера могут иллюстрировать общее правило: чем больше в ядре доля конденсированного хроматина, тем меньше метаболическая активность ядра. При естественной или экспериментальной инактивации ядер происходит прогрессивная конденсация хроматина и, наоборот, при активации ядер увеличивается доля диффузного хроматина.

Однако при метаболической активации не всякие участки конденсированного хроматина могут переходить в диффузную форму. Еще в начале 30-х годов было замечено Э. Гейтцем, что в интерфазных ядрах существуют постоянные участки конденсированного хроматина, наличие которого не зависит от степени дифференцированности ткани или от функциональной активности клеток. Такие участки получили название *гетерохроматина*, в отличие от остальной массы хроматина — *эухроматина (собственно хроматина)*. По этим представлениям, гетерохроматин — компактные участки хромосом, которые в профазе появляются раньше других частей в составе митотических хромосом, и в телофазе не деконденсируются, переходя в интерфазное ядро в виде интенсивно красящихся плотных структур (хромоцентры). Первоначально понятие гетерохроматина имело сугубо морфологическое значение, потому что, изучая препараты окрашенных ядер, конечно нельзя знать, может ли данный участок конденсированного хроматина, *хромоцентр*, перейти в будущем в разрыхленное, эухроматическое состояние, или нет. В связи с этим в специальной цитологической литературе часто без всякого основания любой участок конденсированного хроматина стали называть гетерохроматином. Процесс же общей конденсации хроматина, например в ядрах лейкоцитов, называли *гетерохроматизацией* ядер. На самом же деле в составе ядерного хроматина только лишь некоторые участки практически никогда не теряют особого конденсированного состояния. Такими постоянно конденсированными зонами чаще всего являются центромерные и теломерные участки хромосом. Кроме них постоянно конденсированными могут быть также некоторые участки, входящие в состав плечей хромосом, — *вставочный*, или *интеркалярный, гетерохроматин*, который в ядрах также представлен в виде хромоцентров. Такие постоянно конденсированные участки хромосом в интерфазных ядрах сейчас принято называть *конститутивным (постоянным)* гетерохроматином. Здесь же необходимо отметить, что участки конститутивного гетерохроматина обладают целым рядом

особенностей, которые отличают его от остального хроматина. Конститутивный гетерохроматин генетически не активен, он не транскрибируется, реплицируется он позже всего остального хроматина, в его состав входит особая (сателлитная) ДНК, обогащенная высокоповторяющимися последовательностями нуклеотидов (см. ниже). Доля конститутивного хроматина может быть неодинаковой у разных объектов. Так у млекопитающих на него приходится 10–15% всего генома, а у некоторых амфибий — даже до 60%. Функциональное значение конститутивного гетерохроматина до конца не выяснено, предполагается, что он несет ряд важных функций, связанных со спариванием гомологов в мейозе, со структуризацией интерфазного ядра, с некоторыми регуляторными функциями.

Вся остальная основная масса хроматина ядра может менять степень своей компактизации в зависимости от функциональной активности, она относится к *эухроматину*. Эухроматические неактивные участки, которые временно находятся в конденсированном состоянии, стали называть *факультативным гетерохроматином*, подчеркивая необязательность такого его состояния. Хорошим примером факультативного гетерохроматина может служить X-хромосома в организме человека. В клетках мужской особи X-хромосома деконденсирована, она активна, транскрибируется и морфологически не выявляется из-за своего рыхлого, диффузного состояния. В клетках женского организма, где присутствуют две X-хромосомы, одна из них находится в активном, диффузном состоянии, а вторая — в неактивном, конденсированном, она временно гетерохроматизована. В этом состоянии она может существовать в течение всей жизни организма. Но потомки ее, попадая в клетки мужского организма следующего поколения, снова будут активированы.

В дифференцированных клетках всего лишь около 10% генов находится в активном состоянии, остальные гены инактивированы и, соответственно, находятся в составе конденсированного хроматина (факультативный гетерохроматин). Это обстоятельство объясняет, почему большая часть хроматина ядра структурирована. В табл. 1 даны сравнительные общие характеристики эухроматических и гетерохроматических районов интерфазных хромосом.

**Таблица 1.** Сравнительные общие характеристики эухроматических и гетерохроматических районов интерфазных хромосом

Свойства	Эухроматин		Гетерохроматин конститутивный
	Активный	Неактивный (факультативный гетерохроматин)	
Структура	диффузный	конденсированный	конденсированный
Синтез РНК	+	–	–
Синтез ДНК	+	+	+
Тип нуклеотидных последовательностей ДНК	уникальные, умеренные повторы	уникальные, умеренные повторы	поздняя репликация высокоповторяющаяся сателлитная ДНК
Локализация	плечи хромосом	плечи хромосом	центромера, теломера, интеркалярный гетерохроматин

## 5. Хромосомный цикл

Как известно, половые женские и мужские клетки несут одинарный набор хромосом и, следовательно, содержат в 2 раза меньше ДНК, чем все остальные клетки организма. Половые клетки (сперматозоиды и ооциты) с одинарным набором хромосом называют **гаплоидными**. Пloidность (от греч. *ploos* — кратность) обозначают буквой  $n$ , так, клетки с  $1n$  — гаплоидны, с  $2n$  — диплоидны, с  $3n$  — триплоидны и т.д. Соответственно количество ДНК на клетку ( $c$ ) зависит от ее ploидности: клетки с  $2n$  числом хромосом содержат  $2c$  количества ДНК. При оплодотворении происходит слияние двух клеток, каждая из которых несет  $1n$  набор хромосом, поэтому образуется исходная **диплоидная** ( $2n$ ,  $2c$ ) клетка, зигота.

В дальнейшем в результате деления диплоидной зиготы и последующего деления диплоидных клеток разовьется организм, клетки которого, кроме половых, будут диплоидными.

Однако мы знаем, что процессу деления клеток предшествует фаза синтеза, редупликации ДНК, что должно приводить к появлению клеток с  $4c$  количеством ДНК, у которых количество хромосом  $4n$ , т.е. в два раза больше, чем у исходной диплоидной клетки. И только после деления такой **тетраплоидной** ( $4c$ ) клетки снова возникнут две исходные диплоидные клетки.

В ядрах интерфазных клеток выявить тела отдельных хромосом из-за их деконденсации с помощью морфологических методов очень трудно. Собственно хромосомы как четкие, плотные, хорошо видимые в световой микроскоп тела выявляются только незадолго перед клеточным делением.

В самой же интерфазе хромосом как плотных тел не видно, так как они находятся в разрыхленном состоянии. В интерфазе происходит удвоение, редупликация хромосом. Этот период характеризуется синтезом ДНК, он называется **синтетическим**, или **S-периодом**. Как раз в это время в клетках обнаруживается количество ДНК большее, чем  $2c$ . После окончания S-периода количество ДНК в интерфазном ядре равно  $4c$ , ибо произошло полное удвоение хромосомного материала. Однако морфологически регистрировать удвоение числа хромосом на этой стадии не всегда удается. Собственно хромосомы как нитевидные плотные тела начинают обнаруживаться микроскопически в начале процесса деления клетки, а именно в **профазе** митотического деления клетки (рис. 4.13). Если попытаться подсчитать число хромосом в профазе, то их количество будет равно  $2n$ . Но

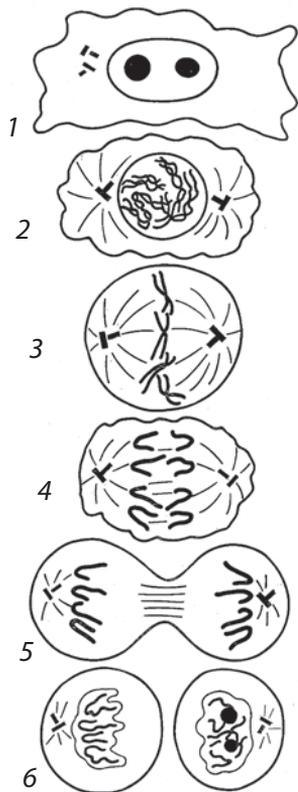


Рис. 4.13. Схема стадий митотического деления клетки:

1 — интерфаза; 2 — профазе; 3 — метафаза; 4 — анафаза; 5 — ранняя телофаза; 6 — поздняя телофаза, начало реконструкции ядер

это ложное впечатление, потому что в профазе каждая из хромосом двойная в результате их редупликации. На этой стадии пара хромосом тесно соприкасается друг с другом, взаимно спирализуясь одна относительно другой, поэтому трудно увидеть двойственность всей структуры в целом. Позднее хромосомы в каждой такой паре начинают обособливаться, раскручиваться. Такая двойственность хромосом в митозе наблюдается даже у живых клеток в конце профазы, когда видно, что общее число хромосом в такой начинающей делиться клетке равно  $4n$ . Следовательно, уже в начале профазы хромосомы состояли из двух сестринских хромосом, или, как их еще называют, *хроматид*.

И в профазе, и в следующем периоде деления клетки — в *метафазе* — сестринские хромосомы остаются связанными друг с другом в виде пары.

В метафазе происходит выстраивание хромосом в экваториальной плоскости клетки и окончательное их обособление. И в профазе и в метафазе клетки остаются тетраплоидными.

В *анафазе* идет расхождение хроматид каждой из хромосом к противоположным полюсам клетки, после чего начинает делиться тело исходной клетки. Затем в *телофазе* разошедшиеся диплоидные ( $2n$ ) наборы хромосом (хроматид) начинают деконденсироваться. Начинается процесс *цитотомии* — деления исходной клетки надвое. Отдельные хромосомы теряют свои четкие очертания и теперь уже внутри нового интерфазного диплоидного ядра с  $2c$  ДНК трудно узнать хромосомы, которые мы могли видеть во время митоза. Так заканчивается один хромосомный цикл и начинается следующий, в точности повторяющий стадии жизни клетки: интерфаза → синтез ДНК → профазы и следующие за ней фазы митоза → цитотомия → новый клеточный цикл и т.д.

## 6. Общая морфология митотических хромосом

Хромосомы всех эукариотических клеток построены по одному плану. Они включают три основных компонента: собственно тело хромосомы (плечо), теломерный, конечный участок, и центромеру. Наиболее просто устроены хромосомы дрожжевых клеток: палочковидное тело хромосомы на одном конце имеет теломеру, а на другом — центромеру. Хромосомы животных и растений также представляют собой палочковидные структуры разной длины с довольно постоянной толщиной, но обычно имеют два хромосомных плеча, соединенных в зоне *центромеры*. Эта зона называется *первичной перетяжкой*. Соответственно оба плеча хромосомы оканчиваются *теломерами* (рис. 4.14). Хромосомы с равными или почти равными плечами называют *метацентрическими*, с плечами неодинаковой длины — *субметацентрическими*. Палочковидные хромосомы с очень коротким, почти незаметным вторым плечом — *acrocentric*.

В области первичной перетяжки (центромеры) расположен *кинетохор* — пластинчатая структура, имеющая форму диска. К нему подходят пучки микротрубочек митотического веретена, идущие в направлении к центриолям. Эти пучки

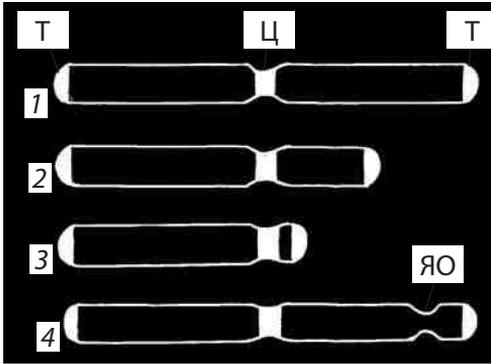


Рис. 4.14. Схема общей морфологии хромосом:

1 — метацентрические; 2 — субметацентрические; 3 — акроцентрические; 4 — спутничные (ядрышковые).

Т — теломеры; Ц — центромеры (первичные перетяжки); ЯО — ядрышковый организатор (вторичная перетяжка)

микротрубочек принимают участие в движении хромосом к полюсам клетки при митозе.

Обычно каждая хромосома имеет только одну центромеру (моноцентрические хромосомы), но могут встречаться хромосомы дицентрические и полицентрические, т.е. обладающие множественными кинетохорами, возникшие в результате хромосомных aberrаций (см. ниже).

В зоне первичной перетяжки присутствует особая, центромерная, сателлитная ДНК, отличающаяся высоким уровнем повторности нуклеотидных последовательностей.

Некоторые хромосомы имеют **вторичную перетяжку**. Последняя обычно расположена вблизи дистального конца хромосомы и отделяет маленький участок, **спутник**. Вторичные перетяжки называют, кроме того, **ядрышковыми организаторами**, так как именно на этих участках хромосом в интерфазе происходит образование ядрышка. Здесь же локализована ДНК, ответственная за синтез рРНК. В хромосомах человека ядрышковые организаторы расположены в коротких плечах вблизи центромер.

Плечи хромосом оканчиваются **теломерами**, конечными участками. Теломерные концы хромосом не способны соединиться с другими хромосомами или их фрагментами, в отличие от концов хромосом, лишенных теломерных участков (в результате разрывов), которые могут присоединяться к таким же разорванным концам других хромосом. В теломерах локализована особая теломерная ДНК, защищающая хромосому от укорачивания в процессе синтеза ДНК.

Число хромосом в диплоидном наборе константно для каждого вида эукариот. Так у человека хромосомный набор содержит 46 хромосом, из которых 44 относятся к т.н. аутосомам и 2 хромосомы (X и Y) — половые хромосомы. Любые изменения в числе аутосом или половых хромосом пагубно сказываются на жизнедеятельности организма.

Размеры хромосом человека находятся в пределах от 2,5 до 10 мкм. Самые большие хромосомы 1 и 2 (11 и 10,8 мкм), самые мелкие 21, 22 и Y-хромосома (2,3 и 2,8 мкм). Среди хромосом человека к метацентрическим относятся 1, 16, 19, 20 хромосомы, к акроцентрическим — 13, 14, 15, 22, большая же часть хромосом человека — субметацентрические.

В нормальном человеческом организме такое сочетание числа, размеров и морфологии хромосом в различных клетках является постоянным признаком.

**Совокупность числа, величины и морфологии хромосом называется кариотипом** данного вида. **Кариотип** — это как бы лицо вида. Даже у близких видов хромосомные наборы отличаются друг от друга или по числу хромосом, или по

величине хотя бы одной или нескольких хромосом, или по форме хромосом и по их структуре. **Структура кариотипа данного вида не зависит ни от типа клеток, ни от возраста организма.** Все клетки индивидуумов одного вида имеют идентичные наборы хромосом. Простой морфологический анализ может убедительно показать различия в кариотипах даже у близких видов. Следовательно, структура кариотипа может быть *таксономическим (систематическим)* признаком, который все чаще используют в систематике животных и растений.

Исследование кариотипа человека оказалось чрезвычайно важным методом при изучении наследственных генетических заболеваний. Однако простой морфологический анализ хромосомных наборов встретил ряд затруднений. При обычных методах окраски весь набор из 46 хромосом человека принято подразделять по их размерам на 7 групп (A, B, C, D, E, F, G). Если при этом легко отличить крупные (1, 2) хромосомы от мелких (19, 20), метацентрические от акроцентрических (13-я), то внутри групп трудно различить одну хромосому от другой. Так, в группе C 6-я и 7-я хромосомы схожи между собой так же, как и с X-хромосомой (рис. 4.15).

В последние годы в практику хромосомного анализа стали широко входить методы **дифференциального окрашивания хромосом**. Впервые метод был предложен Касперссоном, который показал, что при обработке препаратов митотических хромосом с помощью флуорохрома акрихиниприта во флуоресцентном микроскопе видна исчерченность по длине хромосом. В хромосомах были видны поперечные светящиеся полосы («бэнды») (Q-полосы, Q-окраска), расположение которых было характерно для каждой хромосомы.

Затем оказалось, что исчерченность тела хромосомы, ее способность дифференциально окрашиваться по длине, можно выявить с помощью нефлуоресцирующих красителей (например, смесь по Гимза: метилен-азур, метиленовый фиолетовый, метиленовый синий и эозин). Перед окраской препараты обрабатывают разными способами (короткая обработка трипсином, щелочными или кислыми растворами и др.). В зависимости от метода окраски можно выявить окрашивание

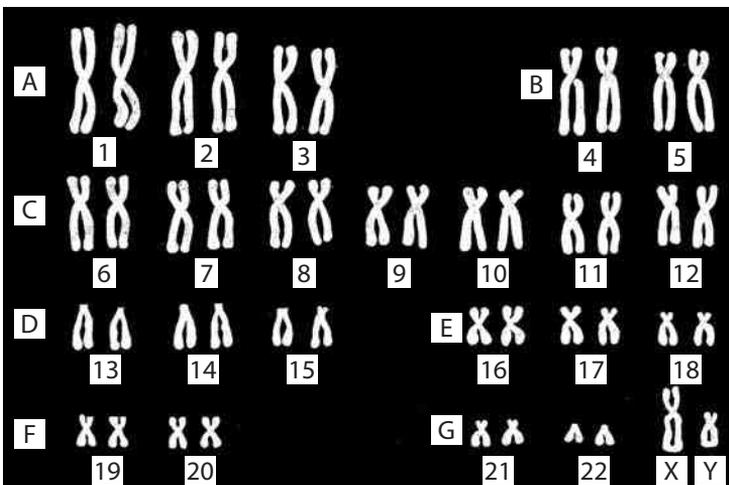


Рис. 4.15. Кариотип мужчины. Хромосомы обозначены согласно денверовской системе



Рис. 4.16. Хромосомы мужчины при дифференциальной окраске по Гимза

прицентромерных участков (С-полосы или перевязки) или различные полосы в плечах и теломерах хромосом (G-полосы). При этом расположение полос характерно для каждой хромосомы (рис. 4.16).

Дифференциальное окрашивание позволяет четко отличить хромосомы друг от друга (рис. 4.17). Этот прием цитологического анализа в сочетании с генетическими наблюдениями уже в настоящее время позволил составлять хромосомные

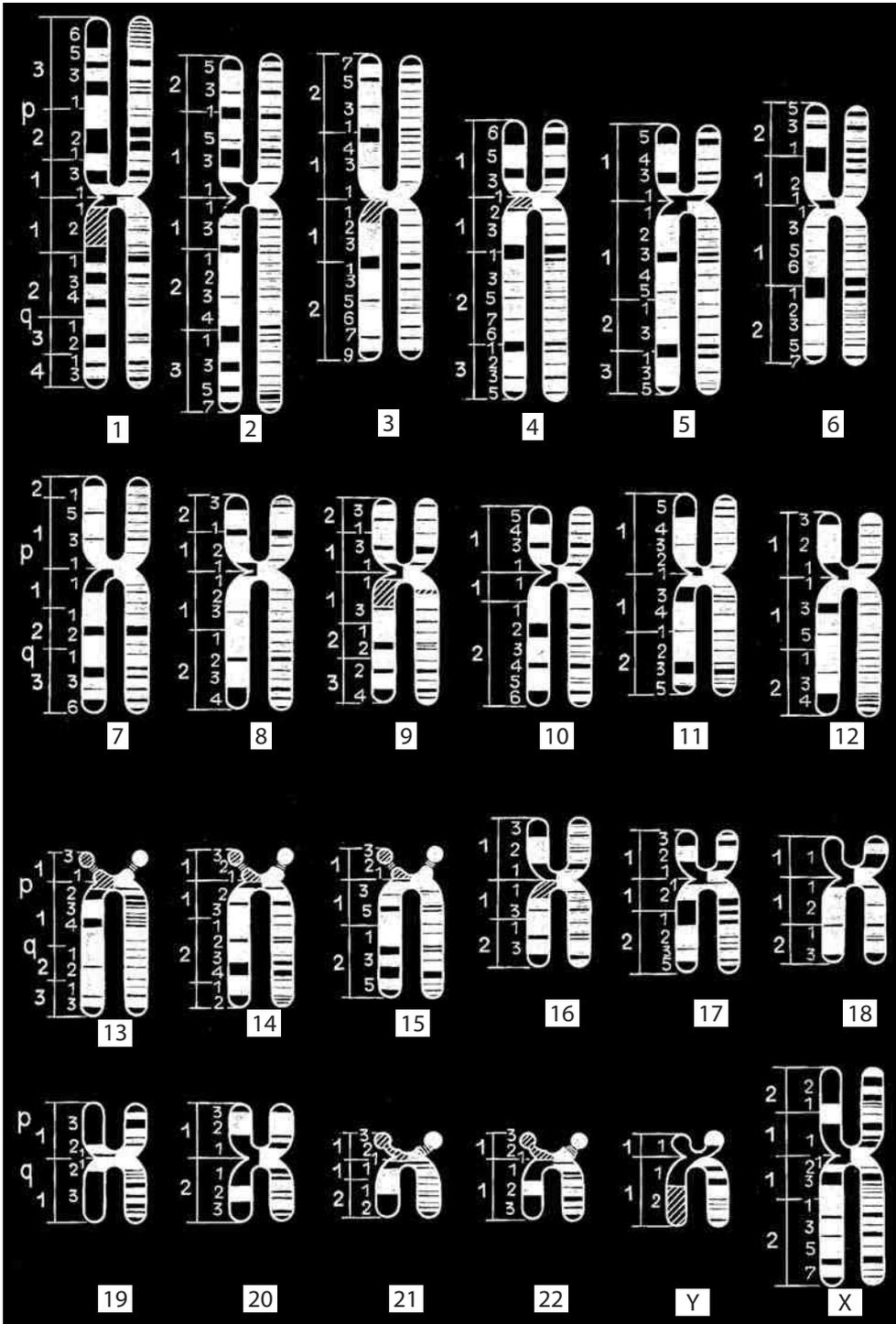
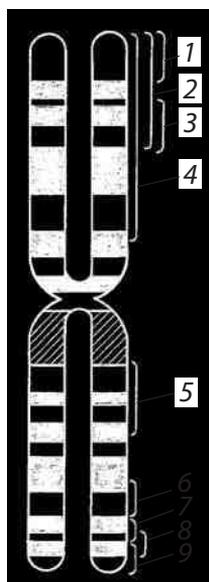


Рис. 4.17. Расположение дифференцированно окрашенных участков на хромосомах мужчины (гаплоидный набор)



**Рис. 4.18.** Генетическая карта хромосомы I человека. Отдельные гены локализованы в определенных сегментах хромосомы:

1 — группа крови Сцианна, группа крови Do, фосфопируватгидратаза, 2 — фосфоглюконат-дегидрогеназа, эритроцитарная группа крови резус (Rh), аденилаткиназа локус 2, 3 — фосфоглюкомутаза локус 1, 4 — уридин-монофосфаткиназа, эллиптоцитоз I,  $\alpha$ -амилаза слюны,  $\alpha$ -амилаза панкреатическая, группа крови Даффи и др., 5 — глюкозо-1-фосфатуридил-трансфераза, катаракта, 6 — пептидаза C, 7 — 5sРНК гены, 8 — фумаратгидратаза, 9 — гуанилаткиназа, место для аденовируса 12,  $\alpha$ -фукозидаза

карты человека, т.е. находить места расположения генов на определенных участках хромосом (рис. 4.18).

Несмотря на то, что молекулярные механизмы такой специфической окраски до сих пор еще не ясны, многие исследователи такую способность отдельных участков хромосом к окрашиванию связывают с их химическими различиями. Большое число наблюдений говорит о том, что избирательное окрашивание связано с локализацией так называемого гетерохроматина, ДНК которого обогащена А- и Т-основаниями.

## 7. Клеточный цикл эукариот

В отличие от клеточного цикла прокариот эукариотические клетки удваивают число своих хромосом в результате синтеза ДНК задолго до цитотомии, до разделения исходной клетки на две дочерние. И время протекания клеточного цикла у эукариот значительно больше времени клеточного цикла бактерий. Так, если для бактериальных клеток время от деления до деления клетки составляет 20–30 мин, то у одноклеточных эукариот, таких как инфузория туфелька клеточный цикл занимает уже 10–20 ч, время клеточного цикла у амёбы составляет около 1,5 сут. Около суток занимает клеточный цикл и у многоклеточных организмов.

Клетки многоклеточных организмов обладают разной способностью к делению. Если в раннем эмбриогенезе клетки животных организмов делятся часто, то во взрослом организме они большей частью теряют эту способность.

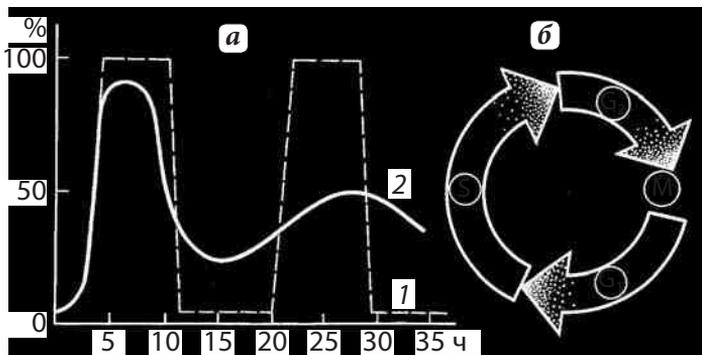
В организме высших позвоночных клетки различных тканей и органов имеют неодинаковую способность к делению. Здесь встречаются клетки, полностью

потерявшие свойство делиться: это большей частью специализированные, дифференцированные клетки (например, клетки центральной нервной системы, кардиомиоциты, клетки хрусталика глаза). В организме есть постоянно обновляющиеся ткани (различные эпителии, кровь, клетки рыхлой и плотной соединительных тканей). В этом случае в таких тканях существует часть клеток, которые постоянно делятся (например, клетки базального слоя покровного эпителия, клетки крипт кишечника, кроветворные клетки костного мозга и селезенки), заменяя отработавшие или погибающие клеточные типы. Многие клетки, не размножающиеся в обычных условиях, приобретают вновь это свойство при процессах репаративной регенерации органов и тканей (гепатоциты, сателлиты соматических мышц, гладкомышечные клетки).

Клетки многоклеточных животных и растений, так же как одноклеточные эукариотические организмы, вступают в процесс деления после ряда подготовительных процессов, важнейшим из которых является синтез ДНК.

Весь смысл клеточного деления заключается в равномерном распределении редуцированного генетического материала по двум новым клеткам. Следовательно, нужно ожидать, что от деления до деления где-то в течение жизни клетки должен существовать период синтеза ДНК. Это предположение было подтверждено в радиоавтографических экспериментах. Если размножающимся клеткам животных или растений дать на короткое время меченый предшественник ДНК, а затем его убрать (так называемое импульсное мечение), то он будет включаться только в те клетки, в которых во время эксперимента шел синтез ДНК. В гетерогенной популяции клеток, среди которых были как делящиеся, так и неделящиеся клетки, метка включалась только в часть интерфазных клеток. Это наблюдение показывало, что синтез ДНК происходит только в интерфазе, в которой существуют периоды, когда синтез ДНК не происходит; отсутствие метки в некоторых интерфазных клетках могло говорить, что в них синтез ДНК или еще не начинался, или уже закончился.

Это положение было доказано следующим образом. Если клеткам дать импульсную метку (например, меченый тритием предшественник ДНК, тимидин), а затем наблюдать за распределением метки среди клеток, взятых через определенные интервалы времени, то можно наблюдать следующую картину. Через некоторое время в образцах будут встречаться как меченые интерфазные клетки, так и немеченые клетки и делящиеся клетки, не содержащие метку. Делящиеся, но не содержащие метки — это те клетки, которые уже закончили синтез ДНК до начала эксперимента. Позднее в препаратах начинают появляться меченые делящиеся клетки. Это как раз те клетки, которые в момент введения меченого предшественника в интерфазе синтезировали ДНК, были в **синтетическом периоде (S-период)**. Через некоторое время снова появляются немеченые делящиеся клетки, те, которые в момент введения меченого предшественника в интерфазе еще не вступили в S-период. Наконец, снова появляются меченые делящиеся клетки — это те, которые вступили в деление уже второй раз. Если построить график встречаемости меченых митозов (рис. 4.19), то получится многовершинная кривая: точки между соседними вершинами будут отражать полную длительность



**Рис. 4.19.** Изменение количества меченых митозов в разное время после однократного введения  $^3\text{H}$ -тимидина:

**а** — идеальная кривая (1) и кривая, полученная при изучении цикла клеток крипт тощей кишки мыши (2). По оси абсцисс — время, по оси ординат — процент меченых митозов; **б** — диаграмма в виде круга, обозначающего клеточный цикл и его отдельные фазы

времени от деления до деления клетки — длительность клеточного цикла. Время от начала эксперимента до появления первых меченых митозов — это время интерфазы после S-периода, *постсинтетический период* или, как принято его обозначать,  $G_2$ -период.

Оказалось, что S-периоду предшествует *пресинтетический период*,  $G_1$ -период, отрезок времени, предшествующий началу синтеза ДНК. Зная длительность клеточного цикла, по проценту меченых клеток при импульсном введении меченого предшественника можно рассчитать длительность S-периода. Так, при времени клеточного цикла  $T$ , равном 20 ч, среди клеток встречается до 30% клеток, меченых  $^3\text{H}$ -тимидином, из чего следует, что длительность S-периода занимает около 7 ч. Таким образом, весь клеточный цикл состоит как бы из четырех отрезков времени: собственно митоз (M), пресинтетический ( $G_1$ ), синтетический (S) и постсинтетический ( $G_2$ ) периоды:  $T = G_1 + S + G_2 + M$ .

Как было найдено, общая продолжительность как всего клеточного цикла, так и отдельных его отрезков (периодов) значительно варьируют не только у разных организмов, но и у клеток разных органов одного организма (табл. 2).

Существуют объекты с более коротким клеточным циклом. Так, у некоторых дрожжей он занимает 1,5 ч, а при дроблении эмбриональных клеток амфибий — 0,5 ч.

Различные периоды клеточного цикла отличаются друг от друга по общему содержанию в клетках белка, ДНК и РНК и по уровню (интенсивности) их синтеза. В  $G_1$ -периоде клетки имеют диплоидное содержание ДНК на ядро (2c), в S-периоде

**Таблица 2.** Длительность митотического цикла и его периодов, ч

Вид	Митотический цикл	Митоз	$G_1$	S	$G_2$
Мышь					
Эпителий тонкой кишки	18,75	1,0	9,5	7,5	0,75
Эпителий роговицы	72,0	0,75	—	8,5	4,0
L-клетки (опухолевые фибробласты) человека	20,0	1,0	9,0–11,0	6,0–7,0	3,0–4,0
Кроветворные клетки	24,0	0,5–1,0	9,0	10,0	4,5

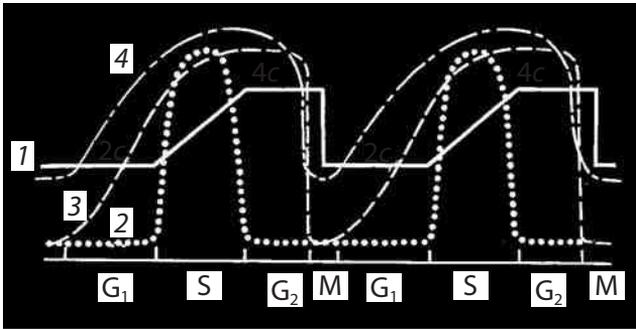


Рис. 4.20. Диаграмма уровней клеточных синтезов в течение клеточного цикла:

1 — содержание ДНК; 2 — интенсивность синтеза ДНК; 3 — интенсивность синтеза РНК; 4 — интенсивность синтеза белка

содержание ДНК колеблется от  $2c$  до  $4c$ , в  $G_2$ -периоде содержание ДНК соответствует тетраплоидному ( $4c$ ). Следовательно, если мы изучаем однородную популяцию клеток, то простым путем фотометрии ДНК в интерфазных клетках можно определить, в каком из периодов клеточного цикла находится та или иная клетка (рис. 4.20).

Количество РНК в клетках на разных этапах цикла также может меняться; в интенсивно делящихся клетках содержание РНК в течение интерфазы увеличивается по крайней мере в 2 раза. После деления в период  $G_1$  поступают дочерние клетки, по объему и по общему содержанию белков и РНК вдвое меньшие, чем исходная родительская клетка. В это время начинается рост клеток, главным образом за счет накопления клеточных белков, что определяется увеличением количества РНК на клетку. Необходимо вспомнить, что в течение всего митоза (от поздней профазы до средней телофазы) в клетке синтез РНК полностью подавлен, поэтому накопление клеточных белков и РНК связано с возобновлением синтеза РНК в начале нового клеточного цикла. В  $S$ -периоде уровень синтеза РНК возрастает соответственно увеличению количества ДНК, достигает своего максимума в середине  $G_2$ -периода. В конце  $G_2$ -периода или в профазе синтез РНК резко падает по мере конденсации митотических хромосом и снова полностью прекращается во время митоза.

Синтез белка во время митоза падает до 25% от исходного уровня и затем в последующих периодах достигает своего максимума в  $G_2$ -периоде, в общем повторяя характер синтеза РНК.

Отдельные периоды интерфазы отличаются друг от друга не только общим содержанием и активностью синтезов ДНК, РНК и белка, но и характером синтезируемых РНК и белков.

Такое регулярное повторение последовательности клеточных циклов легко можно наблюдать во время прогрессивного роста клеток культуры ткани.

В естественных условиях в растущих тканях растений и животных всегда есть клетки, которые находятся «вне цикла», не проходят регулярно из  $G_1$ - в  $S$ -, затем в  $G_2$ - и потом в  $M$ -фазу; такие клетки принято называть клетками  **$G_0$ -периода**. Именно эти клетки представляют собой так называемые **покоящиеся**, переставшие размножаться клетки. Под действием специфических белковых ростовых факторов или митогенов они могут снова вступать в клеточный цикл и начать делиться. В некоторых тканях такие клетки  $G_0$ -фазы могут находиться длительное время, не изменяя особенно своих морфологических свойств: они сохраняют в

принципе способность к делению, превращаясь в камбиальные, стволовые клетки (например, в кровяной ткани). Чаще такая потеря (хотя бы и временная) способности делиться сопровождается специализацией, дифференцировкой клеток. В этом случае дифференцирующиеся клетки выходят из цикла, но в особых условиях могут снова входить в цикл. Например, большинство клеток печени грызунов находится в  $G_0$ -периоде; они не участвуют в синтезе ДНК и не делятся. Однако если произвести удаление части печени, то многие клетки начинают подготовку к митозу ( $G_1$ -период), переходят к синтезу ДНК и могут митотически делиться. В других органах, выходя из клеточного цикла, клетки необратимо дифференцируются и теряют способность к делению навсегда. Так происходит с нейронами: нейробласты, эмбриональные нервные клетки после нескольких циклов клеточного деления теряют способность размножаться, дифференцируются и остаются в этом состоянии до конца жизни организма.

Следует отметить особо, что у многоклеточных зрелых организмов заведомо большая часть клеток находится в  $G_0$ -фазе. Прохождение клетками клеточного цикла как в интенсивно размножающихся популяциях, так и в клетках, стимулированных к размножению, регулируется целой сложной системой циклирующих белков, от активности которых зависит прохождение каждой из стадий клеточного цикла (см. ниже, глава 25).

## 8. Полиплоидия, анеуплоидия

Как оказалось, во многих органах и тканях нормальных диплоидных организмов животных и растений встречаются клетки с крупными ядрами, количество ДНК в которых кратно больше  $2n$ . При делении таких клеток видно, что количество хромосом у них также кратно увеличено по сравнению с обычными диплоидными клетками. Эти клетки являются результатом соматической **полиплоидии**.

Клетки, содержащие наборы хромосом кратные гаплоидному, называют **эуплоидными**. Эуплоидными является основная масса клеток человека, содержащие диплоидный (двойной) набор в интерфазных клетках. Однако в организме млекопитающих встречаются полиплоидные интерфазные клетки, в которых кратно повторен диплоидный набор хромосом. У человека встречаются тетраплоидные клетки печени и сердечной мышцы, а в мегакариоцитах костного мозга может содержаться от 8 (октоплоидные) до 32-х наборов хромосом. При этом все — нормальные эуплоидные клетки.

Подобные клетки появляются в результате отсутствия митоза в целом или в результате незавершенности отдельных его этапов. Существует несколько точек в процессе митоза, блокада которых приведет к его остановке и к появлению полиплоидных клеток. Блокада может наступить при переходе от  $G_2$ -периода к собственно митозу, остановка может произойти в профазе и метафазе, в последнем случае часто происходит нарушение целостности веретена деления. Наконец, нарушения цитотомии также могут привести к появлению двуядерных и полиплоидных клеток.

Путь возникновения полиплоидных клеток из диплоидных был доказан экспериментально. Если делящиеся клетки на некоторое время охладить или обработать каким-либо веществом, разрушающим микротрубочки веретена (например, колхицином), то деление клеток прекратится. При этом исчезнет веретено, а хромосомы без расхождения к полюсам могут продолжать цикл своих превращений: они начнут набухать, одеваться ядерной оболочкой.

Так возникают за счет объединения всех неразшедшихся наборов хромосом крупные новые ядра. Они, естественно, будут содержать вначале  $4n$  число хроматид и соответственно  $4c$  количество ДНК. По определению, это уже не диплоидная, а тетраплоидная клетка. Такие **полиплоидные** клетки могут из стадии  $G_1$  переходить в S-период и, если убрать колхицин, снова делиться митотическим путем, давая уже потомков с  $4n$  числом хромосом. В результате можно получить полиплоидные клеточные линии разной величины плоидности ( $4n, 8n, 16n$  и т.д.). Этот прием часто используют для получения полиплоидных растений.

Процесс появления полиплоидных соматических клеток в результате блокады деления клеточного тела подробно изучен на клетках млекопитающих. Было обнаружено, что в печени взрослых, и особенно стареющих, крыс и мышей встречаются кроме диплоидных тетра- и октоплоидные клетки, а также двуядерные клетки разной степени плоидности.

Оказалось, что в этом случае процесс полиплоидизации клеток можно описать следующим образом (рис. 4.21). После S-периода клетки, обладающие  $4c$  количеством ДНК, вступают в митотическое деление, проходят все его стадии, включая телофазу, но не приступают к цитотомии. Таким образом образуется двуядерная клетка ( $2 \times 2n$ ). Она может снова пройти S-период, в результате чего оба ядра в такой клетке станут содержать по  $4c$  ДНК и  $4n$  хромосом. Такая двуядерная клетка входит в митоз, на стадии метафазы происходит объединение хромосомных наборов (общее число хромосом равно  $8n$ ), а затем нормальное деление, в результате которого образуются две тетраплоидные клетки. Процесс попеременного появления двуядерных и одноядерных клеток может привести к появлению ядер с  $8n, 16n$  и даже  $32n$  количеством хромосом. Таким способом образуются полиплоидные клетки в печени, в эпителии мочевого пузыря, в пигментном эпителии сетчатки, в ацинарных отделах слюнной и поджелудочной желез, на ранних стадиях образования мегакариоцитов и др.

Необходимо отметить, что соматическая полиплоидизация встречается на терминальных участках пути развития клеток, тканей и организмов, она большей

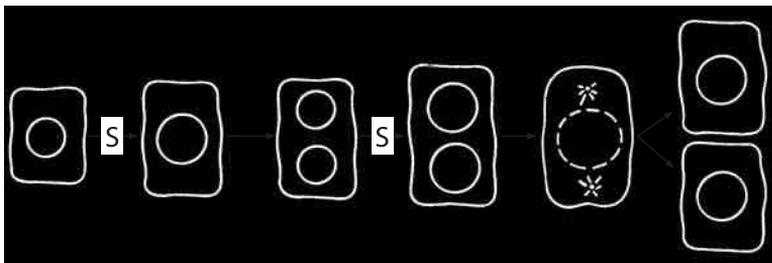


Рис. 4.21. Образование двуядерных и полиплоидных клеток паренхимы печени

частью характерна для специализированных, дифференцированных клеток и не встречается при генеративных процессах, таких, как эмбриогенез (исключая провизорные органы) и образование половых клеток, нет полиплоидии среди стволовых клеток. Действительно, гигантские полиплоидные клетки в деление не вступают; клетки с политенными хромосомами также не делятся и в процессе метаморфоза насекомых лизируются. Многоядерные и полиплоидные клетки у млекопитающих встречаются главным образом у стареющих организмов. По-видимому, главный результат соматической полиплоидии — увеличение размера клеток и тем самым увеличение их продуктивности.

В ряде патологических случаев (некоторые наследственные заболевания, повреждения клеток, опухоли) исходное эуплоидное число хромосом нарушается, возникают **анэуплоидные** клетки, у которых или недостает исходного числа хромосом, или наблюдается их избыток. Такие аномальные анэуплоидные клетки возникают в результате нарушений митоза в соматических клетках или при нарушении процесса мейотического деления гамет. Так, потеря или добавление в хромосомном наборе половых хромосом обычно сопровождаются фенотипическими отклонениями.

Потери же аутосом часто ведут к утрате значительной части генетической информации, несовместимой с жизнедеятельностью не только после рождения, но даже в процессе эмбриогенеза.

## 9. Пространственное расположение хромосом в интерфазном ядре

Представление о том, что митотические хромосомы после деления клеток превращаются в хроматин интерфазного ядра, не теряют своей целостности (не распадаются на фрагменты), а сохраняют свою физическую индивидуальность, переходя лишь в разрыхленное, деконденсированное состояние, было высказано Т. Бовери еще в 1887 г. Эти представления получили название теории непрерывности хромосом, которая гласит: хромосомы, вошедшие в состав дочернего ядра в телофазе, сохраняются в нем хотя бы и в очень измененном виде в качестве индивидуальных структур и появляются снова в собственном смысле слова в следующей профазе.

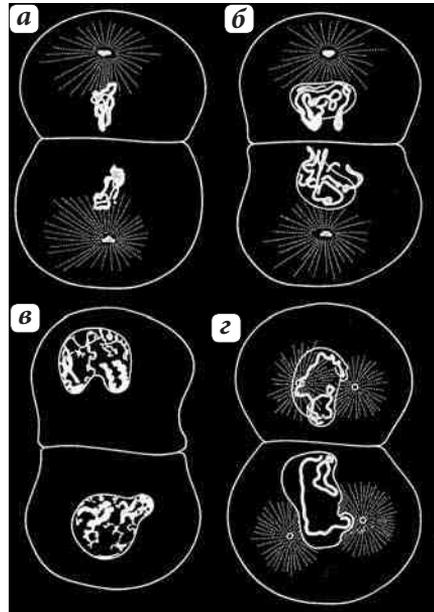
Основой для этого вывода послужили наблюдения за поведением хромосом в дробящихся яйцах одного из видов аскариды (*Ascaris megalocephala univaiens*), в соматической клетке которой всего две хромосомы. Было обнаружено, что в профазе первых двух делений зиготы хромосомы вновь обнаруживаются в местах бывших телофазных хромосом предыдущего деления, повторяя их форму и локализацию (рис. 4.22). Конечно, эти наблюдения не могут служить прямым доказательством этой теории, но являются основой для высказывания предположения о судьбе хромосом в клеточном цикле. Однако, кроме этого наблюдения существует целая серия косвенных данных, говорящих в пользу теории непрерывности хромосом. Вот некоторые из них.

Было найдено, что в интерфазных ядрах целого ряда объектов удастся регистрировать отдельные специфические участки, аналогичные по своим свойствам теломерам и центромерам митотических хромосом.

В интерфазных ядрах этих видов также обнаруживаются С-положительные зоны, в количестве вдвое меньшем, чем число плечей митотических хромосом, вероятно, за счет того, что в интерфазе эти центромерные участки соседних хромосом могут ассоциировать друг с другом. Интересно, что в интерфазном ядре эти участки располагаются на одном из полюсов, как бы повторяя теломерную ориентацию хромосом в митозе.

У мыши центромеры всех акроцентрических хромосом интенсивно окрашиваются по методике выявления С-сегментов (рис. 4.23). Таким же свойством обладают связанные с периферией ядра плотные участки интерфазного хроматина — хромоцентры. Показано, что эти участки по своей молекулярной композиции аналогичны центромерным участкам митотических хромосом.

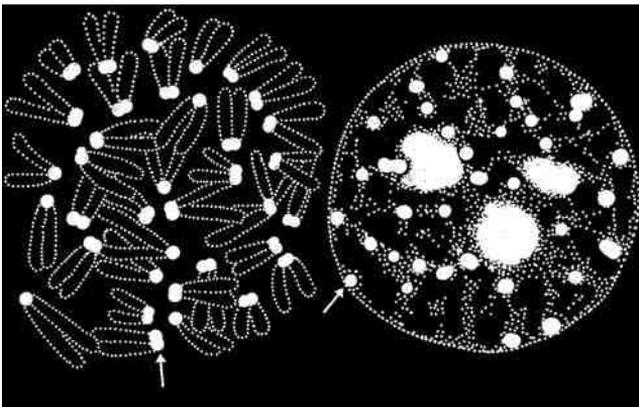
Наконец, в интерфазных клетках можно наблюдать целые отдельные хромосомы; например, одну из X-хромосом самок млекопитающих. Правда, такие целиком конденсированные хромосомы (тельца Барра) не обладают общей морфологией митотических хромосом, но по объему и количеству ДНК полностью соответствуют X-хромосоме в митозе. У пашенной полевки (*Microtus agrestis*) X половые хромосомы



**Рис. 4.22.** Морфологическое постоянство хромосом в первых делениях дробления аскариды:

**а** — первое деление, поздняя анафаза; **б** — то же, ранняя телофаза; **в** — интерфаза; **г** — профаза второго деления.

Обратить внимание на сходство в расположении хромосом в **б**, **в** и **г** (По Бовери, 1909 из Беллар, 1934)



**Рис. 4.23.** С-окраска центромерных районов метафазных хромосом и интерфазного ядра клеток культуры мыши

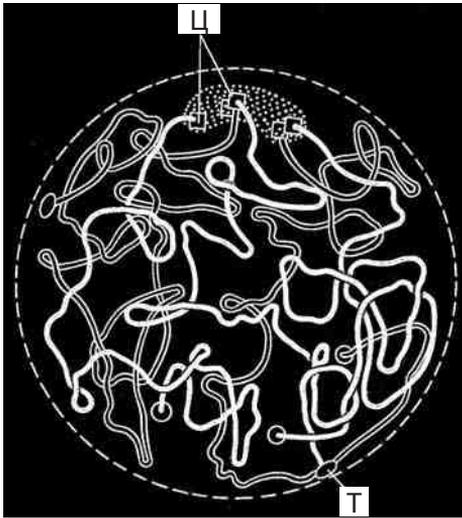


Рис. 4.24. Трехмерная реконструкция топологии политенных хромосом в ядре слюнной железы дрозофилы:

Т — теломеры хромосом; Ц — центромеры

обладают способностью целиком интенсивно окрашиваться по С-методике. В интерфазных ядрах различных клеток этого животного можно с помощью этой же окраски видеть два больших блока интенсивно окрашенного хроматина в клетках самок.

Каково же пространственное расположение отдельных деконденсированных интерфазных хромосом в трехмерном объеме клеточного ядра? Существует ли какой-либо порядок в размещении хромосом в интерфазном ядре или же они хаотически разбросаны внутри ядра? Первые исследования о порядке расположения хромосом внутри ядра принадлежат К. Раблю (1885), который, изучая профазные ядра растений, предположил, что внутри ядра хромосомы повторяют свою анафазную ориентацию (центромеры —

на одном полюсе, теломеры — на другом) в течение всего клеточного цикла.

Особенно демонстративно это положение было показано при изучении пространственной локализации гигантских интерфазных политенных хромосом дрозофилы. С помощью послойных оптических разрезов, используя компьютерную технику воспроизведения изображения, удалось создать объемную стереоскопическую реконструкцию интерфазного ядра и проследить в его трехмерном пространстве каждую из четырех гигантских политенных хромосом (рис. 4.24). Обнаружено, что действительно в объеме ядер хромосомы располагаются, повторяя ана-телофазную ориентацию (так называемую ориентацию по Раблю). При этом каждое плечо хромосомы занимает определенную зону, объем которой не заходит в объем соседних хромосом, хотя они расположены очень тесно друг с другом. Каждая из хромосом образует пологую правую спираль (5–7 витков), которая в нескольких местах связана с ядерной оболочкой, как бы фиксируясь на ней. Фиксированы на ядерной оболочке и теломерные участки всех хромосом, которые располагаются на одном из полюсов интерфазного ядра. На противоположном полюсе ядра также в связи с ядерной оболочкой располагаются центромерные районы хромосом, часто объединенные в один хромоцентр — крупный блок интерфазного хроматина. Прямые наблюдения за локализацией в ядре интерфазных хромосом были сделаны, используя метод FISH (флуоресцентная *in situ* гибридизация нуклеиновых кислот) в сочетании с конфокальной микроскопией. Вначале были выделены индивидуальные митотические хромосомы, из них были получены ДНК, которые метились разными флуорохромами. Такие меченые хромосомные ДНК наносились на препараты интерфазных ядер, ДНК которых была предварительно денатурирована. В результате молекулярной



**Рис. 4.25.** Модель организации интерфазных хромосом в ядре: хромосомы занимают отдельные территории, отделенные межхромосомными зонами, где происходит процессинг РНК и их транспорт



**Рис. 4.26.** Схема пространственного расположения интерфазных хромосом:

$T$  — теломерные;  $C$  — центромерные участки хромосом

гибридизации флуоресцирующая ДНК ренатурировала только со сходной хромосомой.

С помощью конфокального микроскопа просматривалась флуоресцентная метка в трехмерном пространстве интерфазного ядра. Было обнаружено, что интерфазное ядро состоит из тесно расположенных хромосомных территорий, объем которых значительно превосходил объем митотических хромосом. Некоторые особенно крупные хромосомы действительно проявляли ана-телофазную ориентацию (рис. 4.25).

Суммируя общие представления о формах организации хромосом, можно прийти к заключению, что они могут находиться в двух альтернативных состояниях, в двух морфологических выражениях: 1 — максимально конденсированное, компактное, метаболически неактивное, транспортное состояние, предназначенное для того, чтобы в минимальном объеме без структурных нарушений перенести во время клеточного деления огромные по длине молекулы ДНК; 2 — деконденсированное, при котором линейная длина развернутых хромосом увеличивается в десятки, а иногда и в сотни раз, метаболически активное состояние, связанное с синтезом ДНК и РНК (интерфаза).

Отличительная особенность интерфазной хромосомы от митотической, кроме всего, то, что по своей длине она может быть развернута неравномерно — есть участки полной деконденсации и есть участки, находящиеся в плотном, конденсированном и, соответственно, в неактивном состоянии. Это и придает интерфазному ядру своеобразную структуру, где хромосомы — хроматин — могут быть представлены то плотными блоками, то участками рыхлого, деконденсированного хроматина (рис. 4.26).

# Глава 5

## Структура и химия хроматина

**Хроматин** — основной компонент клеточного ядра — достаточно легко получить из выделенных интерфазных ядер и из выделенных митотических хромосом. Для этого используют его свойство переходить в растворенное состояние при экстракции водными растворами с низкой ионной силой или просто деионизованной водой. При этом участки хроматина набухают и переходят в гель.

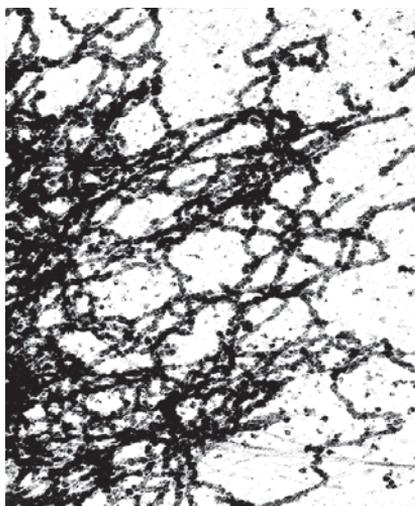


Рис. 5.1. Фибриллы хроматина, выделенные из эритроцитов тритона

Фракции хроматина, полученные из разных объектов, обладают довольно однообразным набором компонентов. Было найдено, что суммарный химический состав хроматина из интерфазных ядер и митотических хромосом мало отличаются друг от друга. Главные компоненты хроматина — ДНК и белки, среди которых основную массу составляют гистоны и негистоновые белки (табл. 3).

В среднем в хроматине около 40% приходится на ДНК и около 60% на белки, среди которых специфические ядерные белки — **гистоны**, составляют от 40 до 80% от всех белков, входящих в состав выделенного хроматина. Кроме того в состав хроматиновой фракции входят мембранные компоненты, РНК, углеводы, липиды. РНК может представлять собой транскрибируемую РНК, которая еще не потеряла связь с матрицей ДНК. Другие же минорные компоненты могут представлять собой вещества сосажденных фрагментов ядерной оболочки.

В структурном отношении хроматин представляет собой нитчатые комплексные молекулы дезоксирибонуклеопротеида (ДНП), которые состоят из ДНК, ассоциированной с гистонами (рис. 5.1). Именно за счет ассоциации гистонов с ДНК

Таблица 3. Химический состав хроматина. Содержание белков и РНК дано по отношению к ДНК

Источник хроматина	ДНК	Гистоны	Негистоновые белки	РНК
Печень крысы	1,0	1,16	0,67	0,043
Клетки HeLa (опухоль человека)	1,0	1,02	0,71	0,090
Тимус теленка	1,0	1,14	0,33	0,007
Эритроциты курицы	1,0	1,08	0,54	0,020

образуются очень лабильные, изменчивые нуклеиново-гистоновые комплексы, где отношения ДНК: гистон равно примерно единице, т.е. они присутствуют в равных весовых количествах. Эти нитчатые фибриллы ДНП и есть элементарные хромосомные или хроматиновые нити, толщина которых в зависимости от степени упаковки ДНК может колебаться от 10 до 30 нм. Эти фибриллы ДНП могут в свою очередь дополнительно компактизоваться с образованием более высоких уровней структуризации ДНП, вплоть до митотической хромосомы. Роль некоторых негистоновых белков заключается именно в образовании высоких уровней компактизации хроматина.

## 1. ДНК хроматина

В препарате хроматина на долю ДНК приходится обычно 30–40%. Эта ДНК представляет собой двухцепочечную спиральную молекулу подобно чистой выделенной ДНК в водных растворах. Об этом говорят многие экспериментальные данные. Так, при нагревании растворов хроматина наблюдается повышение оптической плотности раствора, так называемый *гиперхромный эффект*, связанный с разрывом межнуклеотидных водородных связей между цепями ДНК, подобно тому, что происходит при нагревании (плавлении) чистой ДНК. Длина молекул ДНК из ядер и хромосом эукариотических клеток может быть изучена с помощью метода светооптической радиоавтографии, подобно тому, как это изучалось на прокариотических клетках. После мягкого лизиса клеток эукариот можно прямо определять молекулярные массы ДНК физико-химическими методами.

Было обнаружено, что в составе хромосом длина индивидуальных линейных (в отличие от прокариотических хромосом) молекул ДНК может достигать сотен микрометров и даже нескольких сантиметров. Так, у разных объектов были получены молекулы ДНК от 0,5 мм до 8,5 см. Эти результаты показали, что есть близкое совпадение между расчетной длиной ДНК на хромосому и радиоавтографическим наблюдением.

Так, у человека на геном из 46 хромосом приходится  $6 \cdot 10^9$  Да ДНК. В составе генома встречаются молекулы ДНК величиной от  $50 \cdot 10^6$  п.н. до  $250 \cdot 10^6$  п.н. и соответственно отрезки ДНК от 1,7 до 8,5 см. Суммарная длина ДНК ядра человека составляет около 2 м (!). Такие длинные ДНК представляют собой одну молекулу, а не несколько более коротких, сшитых гуськом с помощью белковых связей, как считали некоторые исследователи. К этому заключению пришли после того, как оказалось, что длина молекул ДНК не изменяется после обработки препаратов протеолитическими ферментами.

Общее количество ДНК, входящее в ядерные структуры клеток, в геноме организмов, колеблется от вида к виду, хотя у микроорганизмов количество ДНК на клетку значительно ниже, чем у беспозвоночных, высших растений и животных (табл. 4).

Так, у мыши на ядро приходится почти в 600 раз больше ДНК, чем у кишечной палочки. Сравнивая количество ДНК на клетку у эукариотических организмов,

Таблица 4. Содержание ДНК в клетках некоторых объектов

Объект	Размер генома (1000 нуклеотидных пар на гаплоидный набор)	Число генов (белков)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	$580 = 5,8 \cdot 10^4$	470
<i>Escherichia coli</i> - кишечная палочка	$4,6 \cdot 10^6$	4000
Пекарские дрожжи	$12 \cdot 10^6$	6300
<i>C. elegans</i>	$9,7 \cdot 10^7$	19000
Дрожзофила	$1,3 \cdot 10^8$	14000
Человек	$3,2 \cdot 10^9$	≈ 30000

трудно уловить какие-либо корреляции между степенью сложности организма и количеством ДНК на ядро. Примерно одинаковое количество ДНК имеют такие различные организмы как лен, морской еж, окунь (1,4–1,9 пг) или рыба голец и бык (6,4 и 7 пг).

У некоторых амфибий в ядрах количество ДНК больше, чем в ядрах человека в 10–30 раз, хотя генетическая конституция человека несравненно сложнее, чем у лягушек. Следовательно, можно предполагать, что «избыточное» количество ДНК у более низкоорганизованных организмов либо не связано с выполнением генетической роли, либо число генов повторяется то или иное число раз.

Разрешить эти вопросы оказалось возможным на основании изучения кинетики реакции ренатурации или гибридизации ДНК. Если фрагментированные молекулы ДНК в растворах подвергнуть тепловой денатурации, а затем инкубировать их при температуре несколько более низкой, чем та, при которой происходит денатурация, то идет восстановление исходной двуспиральной структуры фрагментов ДНК за счет воссоединения комплементарных цепей — ренатурация. Для ДНК вирусов и прокариотических клеток было показано, что скорость такой ренатурации прямо зависит от величины генома; чем больше геном, тем больше количество ДНК на частицу или клетку, тем больше нужно времени для случайного сближения комплементарных цепей и

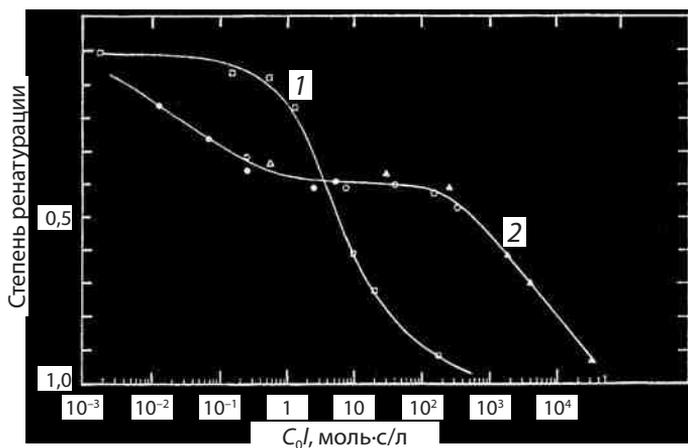


Рис. 5.2. Кинетика реассоциации денатурированной ДНК из различных источников:

1 — *E. coli*; 2 — ДНК зобной железы теленка

и специфической реассоциации большего числа разных по нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК (рис. 5.2).

Характер кривой реассоциации ДНК прокариотических клеток указывает на отсутствие повторяющихся последовательностей оснований в геноме прокариот; все участки их ДНК несут уникальные последовательности,

число и разнообразие которых отражает степень сложности генетической композиции объектов и, следовательно, их общей биологической организации.

Совсем другая картина реассоциации ДНК наблюдается у эукариотических организмов. Оказалось, что в состав их ДНК входят фракции, которые ренатурируют с гораздо более высокой скоростью, чем можно было бы предполагать на основании размера их генома, а также фракция ДНК, ренатурирующая медленно, подобно уникальным последовательностям ДНК прокариот. Однако для эукариот требуется значительно большее время для ренатурации этой фракции, что связано с общим большим размером их генома и с большим числом различных уникальных генов.

В той части ДНК эукариотов, которая отличается высокой скоростью ренатурации, различают две подфракции: 1) с высоко или часто повторяющимися последовательностями, где сходные участки ДНК могут быть повторены  $10^6$  раз; 2) с умеренно повторяющимися последовательностями, встречающимися в геноме  $10^2$ – $10^3$  раз. Так, у мыши во фракцию ДНК с часто повторяющимися последовательностями входит 10% от общего количества ДНК на геном и 15% приходится на фракцию с умеренно повторяющимися последовательностями. Остальные 75% от всей ДНК мыши представлены уникальными участками, соответствующими большому числу различных неповторяющихся генов.

Фракции с часто повторяющимися последовательностями могут обладать иной плавучей плотностью, чем основная масса ДНК, и поэтому могут быть выделены в чистом виде — так называемые фракции *сателлитной ДНК*.

У мыши эта фракция имеет плотность, равную 1,691 г/мл, а основная часть ДНК — 1,700 г/мл. Эти различия плотности определяются различиями в нуклеотидном составе. Например, у мыши в этой фракции имеется 35% Г и Ц пар, а в основном пике ДНК — 42% (рис. 5.3).

Как оказалось, сателлитная ДНК, или фракция ДНК с часто повторяющимися последовательностями, не участвует в синтезе основных типов РНК в клетке, не связана с процессом синтеза белка. Этот вывод сделан был на основании того, что ни один из типов РНК клетки (тРНК, иРНК, рРНК) не гибридизируется с сателлитными ДНК. Следовательно, на этих ДНК нет последовательностей, отвечающих за синтез клеточных РНК, т.е. сателлитные ДНК не являются матрицами для синтеза РНК, не участвуют в транскрипции.

Существует гипотеза о том, что высокоповторяющиеся последовательности, не участвующие непосредственно в синтезе белков, могут нести информацию, играющую важную структурную роль в сохранении и функционировании хромосом. К ним могут быть отнесены

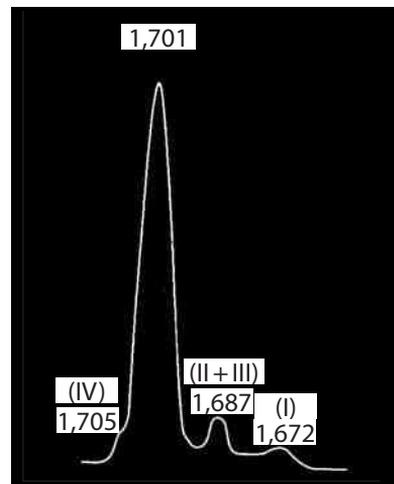


Рис. 5.3. Выявление плавучей плотности (г/см<sup>3</sup>), основного (1,701) и сателлитных пиков ДНК (I–IV) при равновесном центрифугировании ДНК дрожжей в градиенте хлористого цезия

многочисленные участки ДНК, связанные с белками остова интерфазного ядра (см. ниже), участки начала репликации или транскрипции, а также участки ДНК, регулирующие эти процессы.

Методом гибридизации нуклеиновых кислот прямо на хромосомах (*in situ*) была изучена локализация этой фракции. Для этого на изолированной сателлитной ДНК с помощью бактериальных ферментов синтезировали меченную  $^3\text{H}$ -уридином РНК. Затем цитологический препарат с хромосомами подвергали такой обработке, при которой происходит денатурация ДНК (повышенная температура, щелочная среда и др.). После этого на препарат помещали меченную  $^3\text{H}$  РНК и добивались гибридизации между ДНК и РНК. Радиоавтографически было обнаружено, что большая часть метки локализуется в зоне первичных перетяжек хромосом, в зоне их центромерных участков. Метка обнаруживалась также и в других участках хромосом, но очень слабо.

За последние 10 лет сделаны большие успехи в изучении **центромерных ДНК**, особенно у дрожжевых клеток. Так, у *S. cerevisiae* центромерная ДНК состоит из повторяющихся участков по 110 п.н. Центромерная ДНК человека (альфоидная сателлитная ДНК) состоит из тандема мономеров по 170 п.н., организованных в группы димеров или пентамеров, которые в свою очередь образуют большие последовательности по  $1-6 \cdot 10^3$  п.н. Такая самая большая единица повторена 100–1000 раз. С этой специфической центромерной ДНК комплексируются особые центромерные белки, участвующие в образовании **кинетохора**, структуры, обеспечивающей связь хромосом с микротрубочками веретена и в движении хромосом в анафазе (см. ниже).

ДНК с высокоповторяющимися последовательностями обнаружена также в **теломерных участках** хромосом многих эукариотических организмов (от дрожжей до человека). Здесь чаще всего встречаются повторы, в которые входят 3–4 гуаниновых нуклеотида. У человека теломеры содержат 500–3000 повторов TTAGGG. Эти участки ДНК выполняют особую роль — ограничивать хромосому с концов и предотвращать ее укорачивание в процессе многократной репликации.

Недавно было найдено, что высокоповторяющиеся последовательности ДНК интерфазных хромосом связываются специфически с белками — ламинами, подстилающими ядерную оболочку, и участвуют в закреплении растянутых деконденсированных интерфазных хромосом, тем самым определяют порядок в локализации хромосом в объеме интерфазного ядра.

Сателлитная ДНК может участвовать в узнавании гомологичных районов хромосом при мейозе. По другим предположениям, участки с часто повторяющимися последовательностями играют роль разделителей (спейсеров) между различными функциональными единицами хромосомной ДНК, например между репликациями (см. ниже).

Как оказалось, фракция умеренно повторяющихся (от  $10^2$  до  $10^5$  раз) последовательностей принадлежит к пестрому классу участков ДНК, играющих важную роль в процессах создания аппарата белкового синтеза.

В эту фракцию входят гены рибосомных ДНК, которые могут быть повторены у разных видов от 100 до 1000 раз. В эту фракцию входят многократно повторенные

участки для синтеза всех тРНК. Более того, некоторые структурные гены, ответственные за синтез определенных белков, также могут быть многократно повторены, представлены многими копиями. Такими являются гены для белков хроматина — гистонов, повторяющихся до 400 раз. Кроме того, в эту фракцию входят участки ДНК с разными последовательностями (по 100–400 нуклеотидных пар), также многократно повторенными, но рассеянными по всему геному. Их роль еще не до конца ясна. Высказывается предположение, что такие участки ДНК могут представлять собой акцепторные или регуляторные участки разных генов.

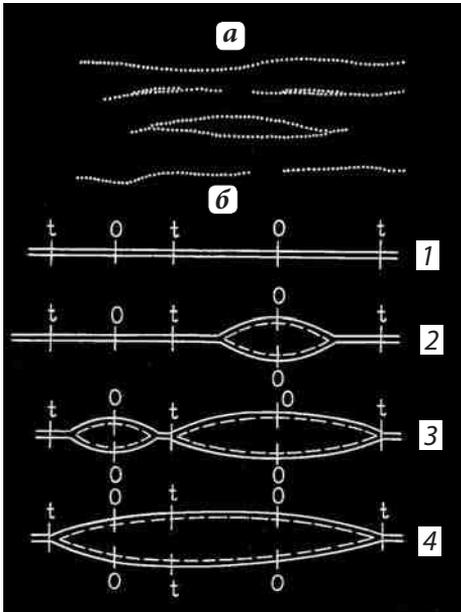
Итак, ДНК эукариотических клеток гетерогенна по составу, содержит несколько классов последовательностей нуклеотидов: **часто повторяющиеся последовательности** ( $> 10^6$  раз), входящие во фракцию сателлитной ДНК и не транскрибирующиеся; фракция **умеренно повторяющихся последовательностей** ( $10^2$ – $10^5$ ), представляющих блоки истинных генов, а также короткие последовательности, разбросанные по всему геному; **фракция уникальных последовательностей**, несущая информацию для большинства белков клетки.

Исходя из этих представлений, становятся понятными те различия в количестве ДНК, которые наблюдаются у разных организмов: они могут быть связаны с неодинаковой долей тех или иных классов ДНК в геноме организмов. Так, у амфибии *Ampibia* (у которой ДНК в 20 раз больше, чем у человека) на долю повторяющихся последовательностей приходится до 80% от всей ДНК, у луков — до 70, у лосося — до 60% и т.п. Истинное же богатство генетической информации должна отображать фракция уникальных последовательностей. Не нужно забывать, что в нативной, нефрагментированной молекуле ДНК хромосомы все участки, включающие уникальные, умеренно и часто повторяющиеся последовательности, связаны в единую гигантскую ковалентную цепь ДНК хромосомы, т.е. 1 молекула ДНК соответствует одной хромосоме.

## 2. Репликация эухроматических ДНК

Бактериальная хромосома реплицируется как одна структурная единица, имеющая одну стартовую точку репликации и одну точку терминации. Таким образом, бактериальная циклическая ДНК является одним **репликоном**. От стартовой точки репликация идет в двух противоположных направлениях, так что по мере синтеза ДНК образуется так называемый глазок репликации, ограниченный с двух сторон репликационными вилками, что хорошо видно при электронномикроскопическом изучении вирусных и бактериальных реплицирующихся хромосом.

У эукариотических клеток организация репликации иного характера — **полирепликонная**. Как уже говорилось, при импульсном включении  $^3\text{HT}$  множественная метка появляется практически во всех митотических хромосомах. Это означает, что одновременно в интерфазной хромосоме существует множество мест репликации и множество автономных точек начала репликации — **ARS** (*autonome replicating sequence*). Более подробно это явление было изучено с помощью



**Рис. 5.4.** Репликация эукариотической ДНК:

**а** — радиоавтограф включения  $^3\text{H}$ -тимидина в молекулу ДНК; **б** — схема репликации: четыре диаграммы представляют последовательные стадии двух смежных единиц репликации (репликонов). Сплошные линии указывают исходные, а пунктирные — новосинтезированные цепи молекулы ДНК; *O* — начало репликации; *t* — конец репликации; 1 — перед началом репликации; 2 — репликация началась в правом репликоне; 3 — репликация началась в левом репликоне; 4 — репликация закончилась в обоих репликонах

расстоянию между средними точками смежных метящихся репликонов, т.е. по расстоянию между двумя соседними стартовыми точками репликации, можно узнать величину отдельных репликонов. В среднем величина репликонов у высших животных составляет около 30 мкм или 100 тыс. п.н. Следовательно, в гаплоидном наборе млекопитающих должно быть 20 000–30 000 репликонов.

Как говорилось, синтез ДНК в репликоне идет в двух противоположных направлениях. Это легко доказывается радиоавтографически: если клеткам после импульсной метки дать продолжить синтезировать ДНК некоторое время в среде без  $^3\text{HТ}$ , то произойдет падение включения его в ДНК, будет происходить как бы разбавление метки, и на радиоавтографе можно будет видеть симметричное, с двух сторон реплицируемого участка, уменьшение количества зерен восстановленного серебра.

Реплицирующиеся концы или вилки в репликоне прекращают движение, когда встретятся с вилками соседних репликонов (в терминальной точке, общей для соседних репликонов). В этом месте реплицированные участки соседних репликонов объединяются в единые ковалентные цепи двух новосинтезированных

радиоавтографии меченых молекул, выделенных ДНК (рис. 5.4). Если клетки были импульсно мечены  $^3\text{HТ}$ , то в световом микроскопе на автографах выделенных ДНК можно видеть участки восстановленного серебра в виде пунктирных линий. Это небольшие отрезки ДНК, которые успели реплицироваться, а между ними расположены участки нереплицированной ДНК, которая не оставила радиоавтографа и поэтому остается невидимой. По мере увеличения времени контакта  $^3\text{HТ}$  с клеткой величина таких отрезков возрастает, а расстояние между ними уменьшается. Из этих экспериментов можно точно рассчитать скорость репликации ДНК у эукариотических организмов. Скорость движения репликационной вилки оказалась равной 1000–3000 п.н. в мин у млекопитающих, около 1000 п.н. в мин у некоторых растений, что намного ниже скорости репликации ДНК у бактерий (50 000 п.н. в мин). В этих же экспериментах была прямо доказана полирепликационная структура ДНК хромосом эукариот: по длине хромосомной ДНК, вдоль нее, располагается множество независимых участков репликации — репликонов. По

молекул ДНК. Функциональное подразделение ДНК хромосом на репликоны совпадает со структурным подразделением ДНК на домены или петли, основания которых, как уже упоминалось, скреплены белковыми связками.

Таким образом, весь синтез ДНК на отдельной хромосоме протекает за счет независимого синтеза на множестве отдельных репликонов, с последующим соединением концов соседних отрезков ДНК. Биологический смысл этого свойства становится ясным при сравнении синтеза ДНК у бактерий и эукариот. Так бактериальная монорепликонная хромосома длиной в 1600 мкм синтезируется со скоростью около получаса. Если бы сантиметровая молекула ДНК хромосомы млекопитающих реплицировалась тоже как монорепликонная структура, то на это ушло бы около недели (6 сут). Но если в такой хромосоме расположено несколько сотен репликонов, то для полной ее репликации понадобится всего около 1 ч. На самом же деле время репликации ДНК у млекопитающих составляет 6–8 ч. Это связано с тем, что не все репликоны отдельной хромосомы включаются одновременно.

В некоторых случаях наблюдается одновременное включение всех репликонов или же появление дополнительных точек начала репликации, что дает возможность закончить синтез всех хромосом за минимально короткое время. Это явление происходит на ранних этапах эмбриогенеза некоторых животных. Так известно, что при дроблении яиц шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* синтез ДНК занимает всего 20 мин, тогда как в культуре соматических клеток этот процесс продолжается около суток.

Оказалось, что происходит включение предшественника ДНК в большие участки хромосомы. Включение разных участков происходит строго последовательно в течение S-периода. Каждая хромосома характеризуется высокой стабильностью порядка репликации по своей длине, имеет свой специфический рисунок репликации.

Кластеры репликонов, объединенные в репликационные единицы, связаны с белками ядерного матрикса (см. ниже), которые вместе с ферментами репликации образуют т.н. кластеросомы — зоны в интерфазном ядре, в которых идет синтез ДНК.

Порядок, в котором активируются репликационные единицы, может, вероятно, определяться структурой хроматина в этих участках. Так, зоны конститутивного гетерохроматина (вблизи центромеры) реплицируются обычно в конце S-периода, также в конце S-периода удваивается часть факультативного гетерохроматина (например, X-хромосома самок млекопитающих). Особенно четко во времени последовательность репликации участков хромосом коррелирует с рисунком дифференциальной окраски хромосом: R-сегменты относятся к раннореплицирующимся, G-сегменты соответствуют участкам хромосом с поздней репликацией. C-сегменты (центромера) — места самой поздней репликации.

Длительность процесса репликации отдельных хромосом прямо не зависит от их размеров. Так крупные хромосомы человека группы А (1–3) оказываются мечеными в течение всего S-периода, так же как и более короткие хромосомы группы В (4–5).

Таким образом, синтез ДНК в геноме эукариот начинается почти одновременно на всех хромосомах ядра в начале S-периода. Но при этом происходит

последовательное и асинхронное включение разных репликонов как в разных участках хромосом, так и в разных хромосомах. Последовательность репликации того или иного участка генома строго детерминирована генетически. Это последнее утверждение доказывается не только картиной включения метки в разные отрезки S-периода, но также тем, что существует строгая последовательность появления в ходе S-периода пиков чувствительности определенных генов к мутагенам.

### 3. Основные белки хроматина — гистоны

Роль ДНК в составе как интерфазных хромосом (хроматин интерфазного ядра), так и митотических хромосом достаточно ясна: хранение и реализация генетической информации. Однако для выполнения этих функций в составе интерфазных ядер необходимо иметь четкую структурную основу, которая позволила бы расположить огромные по длине молекулы ДНК в строгом порядке, чтобы с определенной временной последовательностью протекали процессы как синтеза РНК, так и редупликации ДНК. В интерфазном ядре концентрация ДНК достигает 100 мг/мл (!). В среднем на интерфазное ядро млекопитающих приходится около 2 м ДНК, которая локализуется в сферическом ядре со средним диаметром около 10 мкм. Это значит, что такая огромная масса ДНК должна как-то быть уложена с коэффициентом упаковки  $1 \cdot 10^3 \dots 1 \cdot 10^4$ . И при этом в ядре должен сохраниться определенный порядок в расположении частично или полностью деконденсированных хромосом. И кроме того, должны быть реализованы условия для упорядоченного функционирования хромосом. Ясно, что все эти требования не могут быть осуществлены в бесструктурной, хаотической системе.

В клеточном ядре ведущую роль в организации расположения ДНК, в ее компактизации и в регулировании функциональных нагрузок принадлежит ядерным белкам. Как уже указывалось, хроматин представляет собой сложный комплекс ДНК с белками, дезоксирибонуклеопротеин (ДНП), где на долю белков приходится около 60% от сухого веса. Белки в составе хроматина очень разнообразны, но их можно разделить на две группы: *гистоны* и *негистоновые белки*. На долю гистонов приходится до 80% от всех белков хроматина. Их взаимодействие с ДНК происходит за счет солевых или ионных связей и неспецифично в отношении состава или последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК. Несмотря на преобладание в общем количестве, гистоны представлены небольшим разнообразием белков: эукариотические клетки содержат всего 5–7 типов молекул гистонов. В отличие от гистонов, т.н. негистоновые белки большей частью специфически взаимодействуют с определенными последовательностями молекул ДНК, очень велико разнообразие типов белков, входящих в эту группу (несколько сот), велико разнообразие функций, которые они выполняют.

Гистоны связаны с ДНК в виде молекулярного комплекса, в виде субъединиц или *нуклеосом*. До этого считалось, что ДНК равномерно покрыта этими белками, связь которых с ДНК определяется свойствами гистонов.

**Гистоны** — белки, характерные только для хроматина, обладают рядом особых качеств. Это основные или щелочные белки, свойства которых определяются относительно высоким содержанием таких основных аминокислот как лизин и аргинин. Именно положительные заряды на аминогруппах лизина и аргинина обуславливают солевую или электростатическую связь этих белков с отрицательными зарядами на фосфатных группах ДНК. Эта связь достаточно лабильна, легко нарушается, в этом случае может происходить диссоциация ДНП на ДНК и гистоны. Поэтому хроматин (дезоксирибонуклеопротеин или еще как его называли раньше, нуклеогистон) является сложным нуклеиново-белковым комплексом, в который входят линейные высокополимерные молекулы ДНК и огромное множество молекул гистонов (до 60 млн копий каждого типа гистонов на ядро). Гистоны — наиболее хорошо биохимически изученные белки (табл. 5).

Гистоны — относительно небольшие по молекулярной массе белки. Эти белки практически у всех эукариот обладают сходными свойствами, обнаруживаются одни и те же классы гистонов. Классы гистонов отличаются друг от друга по содержанию разных основных аминокислот. Так гистоны H3 и H4 относят к аргинин-богатым, из-за относительно высокого содержания в них этой аминокислоты. Эти гистоны являются наиболее консервативными из всех исследованных белков: их аминокислотные последовательности практически одинаковы даже у таких отдаленных видов как корова и горох (всего две аминокислотных замены).

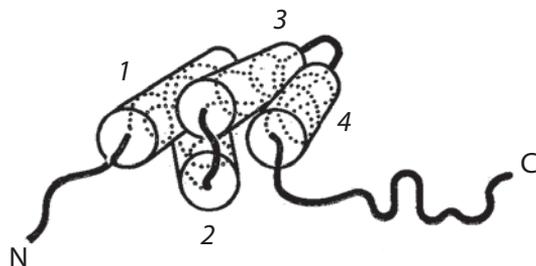
Два других гистона H2A и H2B относятся к умеренно обогащенным лизином белкам. У различных объектов внутри этих групп гистонов обнаруживаются межвидовые вариации в их первичной структуре, в последовательности аминокислот.

Гистон H1 представляет собой не уникальную молекулу, а класс белков, состоящих из нескольких достаточно близкородственных белков с перекрывающимися последовательностями аминокислот. У этих гистонов обнаружены значительные межвидовые и межтканевые вариации. Однако их общим свойством является обогащенность лизином, что делает их самыми основными белками, которые легко отделяются от хроматина в солевых (0,5 М) растворах NaCl. В растворах с высокой ионной силой (1–2 М NaCl) все гистоны полностью отделяются от ДНК и переходят в раствор.

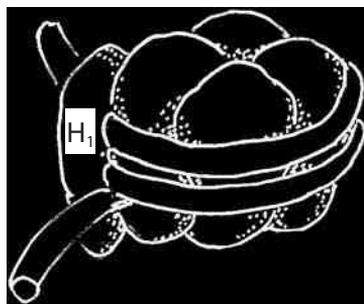
Для гистонов всех классов (особенно для H1) характерно кластерное распределение основных аминокислот, лизина и аргинина, на N- и C-концах молекул. Срединные участки молекул гистонов образуют несколько (3–4)  $\alpha$ -спиральных

Таблица 5. Общие свойства гистонов млекопитающих

Гистон	Молекулярная масса	Основные аминокислоты, %		Кислые аминокислоты	Отношение основных аминокислот к кислым
		Лизин	Аргинин		
H1	23 000	29	1	5	5,4
H2A	13 960	11	9	15	1,4
H2B	13 770	16	6	13	1,7
H3	15 340	10	13	13	1,8
H4	11 280	11	14	10	2,5



**Рис. 5.5.** Схема трехмерной структуры гистона H1: α-спиральные участки (1–4) и фибриллярные C- и N-концы полипептидной цепи



**Рис. 5.6.** Схема расположения гистона H1: сердцевина нуклеосомы состоит из двух молекул каждого гистона H2A, H2B, H3 и H4, окруженный двумя витками ДНК

участка, которые компактизуются в глобулярную структуру в изотонических условиях (рис. 5.5). По-видимому, богатые положительными зарядами неспирализованные концы белковых молекул гистонов и осуществляют их связь друг с другом и с ДНК. У гистона H1 наиболее вариабельным является N-конец, осуществляющий связь с другими гистонами, а C-конец, богатый лизином, взаимодействует с ДНК (рис. 5.6).

В процессе жизнедеятельности клеток могут происходить посттрансляционные изменения (модификации) гистонов: ацетилирование и метилирование некоторых остатков лизина, что приводит к потере числа положительных зарядов, и фосфорилирование сериновых остатков, приводящее к появлению отрицательного заряда. Ацетилирование и фосфорилирование гистонов может быть обратимым. Эти модификации значительно меняют свойства гистонов, их способность связываться с ДНК. Так, повышенное ацетилирование гистонов предшествует активации генов, а фосфорилирование и дефосфорилирование связаны соответственно с конденсацией и деконденсацией хроматина.

Гистоны синтезируются в цитоплазме, транспортируются в ядро и связываются с ДНК во время ее репликации в S-периоде, т.е. синтез гистонов и ДНК синхронизированы. При прекращении клеткой синтеза ДНК гистоновые информационные РНК за несколько минут распадаются, и синтез гистонов останавливается. Включившиеся в хроматин гистоны очень стабильны, имеют низкую скорость замены.

## 4. Функциональные свойства гистонов

Широкое распространение гистонов, их сходство даже у очень отдаленных видов, обязательность вхождения их в состав хромосом — все это говорит об их чрезвычайно важной роли в процессе жизнедеятельности клеток. Еще до открытия нуклеосом существовало две взаимодополняющие друг друга группы гипотез о функциональной роли гистонов, о регуляторной и структурной их роли.

Было обнаружено, что выделенный хроматин при добавлении к нему РНК-полимераза может быть матрицей для транскрипции, однако активность его составляет всего лишь около 10% от активности, соответствующей активности выделенной чистой ДНК. Эта активность прогрессивно возрастает по мере удаления групп гистонов и может достичь 100% при полном удалении гистонов. Отсюда можно было сделать вывод, что общее содержание гистонов может регулировать уровень транскрипции. Это наблюдение совпадает с тем, что по мере удаления гистонов, особенно H1, происходит прогрессивная деконденсация, разворачивание фибрилл ДНП, что возможно облегчает взаимодействие РНК-полимеразы с матричной ДНК. Так же было обнаружено, что модификация гистонов приводит к усилению транскрипции и одновременной декомпактизации хроматина. Следовательно, напрашивается вывод о том, что количественное и качественное состояние гистонов влияет на степень компактности и активности хроматина. Однако оставался открытым вопрос о специфичности регуляторных свойств гистонов: какова роль гистонов при синтезе специфических иРНК в различно дифференцированных клетках. Этот вопрос до сих пор еще не решен, хотя можно сделать некоторые обобщения: на эту роль могут претендовать те группы гистонов, которые наименее консервативны, такие как H1 или как H2A и H2B, которые могут в значительной мере модифицироваться и тем самым изменять свои свойства в определенных участках генома.

Была очевидна и структурная, компактизирующая, роль гистонов в организации хроматина. Так, постепенное добавление фракции гистонов к растворам чистой ДНК приводит к выпадению в осадок комплекса ДНП, и наоборот, частичное удаление гистонов из препаратов хроматина, ведет к его переходу в растворимое состояние. С другой стороны, в цитоплазматических экстрактах ооцитов земноводных или яиц морских ежей, содержащих свободные гистоны, добавление любой ДНК (включая фаговую) приводит к образованию хроматиновых фибрилл (ДНП), длина которых в несколько раз короче исходных ДНК. Эти данные говорят о структурной, компактизирующей роли гистонов. Для того чтобы огромные сантиметровые молекулы ДНК уложить по длине хромосомы, имеющей размер всего несколько микрометров, молекула ДНК должна быть как-то скручена, компактизована с плотностью упаковки равной 1:10 000. Оказалось, что в процессе компактизации ДНК существуют несколько уровней упаковки, первые из которых прямо определяются взаимодействием гистонов с ДНК.

## 5. Гистоны образуют первый, нуклеосомный, уровень компактизации ДНК

В ранних биохимических и электронномикроскопических работах было показано, что препараты ДНП содержат нитчатые структуры с диаметром от 5 до 50 нм. Постепенно стало ясно, что диаметр фибрилл хроматина зависит от способа выделения препарата.

Крупным событием в изучении хроматина было открытие двумя разными способами **нуклеосом** — дискретных частиц хроматина. Так, при осаждении на

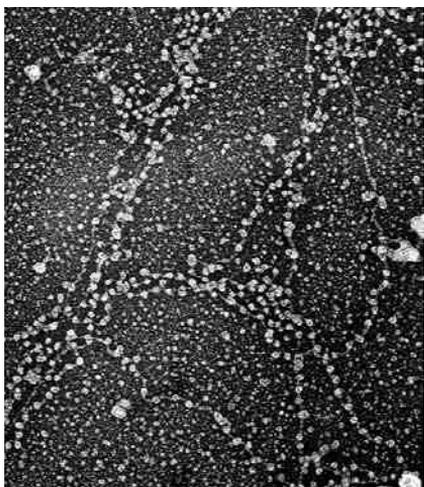


Рис. 5.7. Нуклеосомные фибриллы

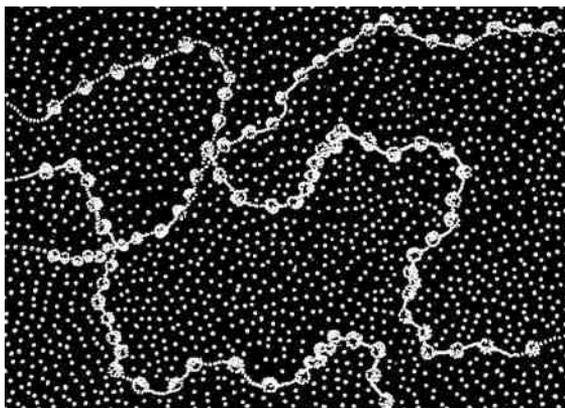


Рис. 5.8. Нуклеосомы в виде «бусин на нити»

подложку для электронной микроскопии препаратов хроматина в щелочных условиях при низкой ионной силе можно было видеть, что нити хроматина представляли собой что-то, напоминающее «бусы на нитке»: небольшие, около 10 нм, глобулы, связанные друг с другом отрезками ДНК длиной около 20 нм (рис. 5.7, 5.8). Эти наблюдения совпадали с результатами фракционирования хроматина после частичного нуклеазного переваривания.

Было найдено, что если подвергнуть выделенный хроматин действию нуклеазы микрококков, то он подвергается распаду на регулярно повторяющиеся структуры. Так, ДНК, полученная из хроматина, обработанного нуклеазой, состояла из серии отрезков, кратных 200 парам оснований; встречались отрезки в 200, 400, 600, 800 и больше пар нуклеотидов (п.н.). Это говорит о том, что нуклеазной атаке в составе хроматина подвергаются участки ДНК, расположенные примерно через каждые 200 п.н.

При этом в кислоторастворимую фракцию (низкополимерная) ДНК уходит всего 2% ядерной ДНК. Кроме того после такой нуклеазной обработки из хроматина путем центрифугирования удастся выделить фракцию частиц со скоростью седиментации 11S ( $S$  — единица Сведберга, определяющая скорость седиментации частиц, равна  $1 \cdot 10^{-13}$  с), а также частицы кратного этой величине размера: димеры, тримеры, тетрамеры и т.д. Оказалось, что частицы 11S содержат около 200 п.н. ДНК и восемь гистонов (*октамер*) по две копии гистонов H2A, H2B, H3 и H4 и одну копию гистона H1. Такая сложная нуклеопротеидная частица получила название **нуклеосомы** (рис. 5.9). Более подробный анализ этой фракции показал, что нуклеосома устроена

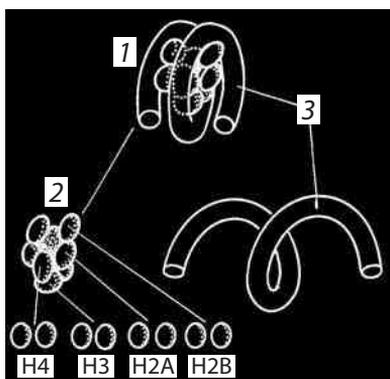


Рис. 5.9. Схема строения нуклеосомной частицы (1): в состав ее входят четыре пары гистонов в октамере (2) и фрагмент ДНК длиной 146 пар оснований (3)

следующим образом: октамер гистонов образует белковую основу — сердцевину (от англ. *core*, часто в нашей литературе этот термин используется без перевода: кор, коровая частица), по поверхности которой располагается ДНК величиной в 146 п.н., образующая 1,75 оборота; остальные 54 п.н. ДНК образуют участок, несвязанный с белками сердцевинны — **линкер**, который, соединяя две соседние нуклеосомы, переходит в ДНК следующей нуклеосомы. Гистон Н1 связывается частично с основной, сердцевинной и с участком линкера (около 30 п.н.). Следовательно, полная нуклеосома содержит около 200 п.н. ДНК (146 п.н. — сердцевина, 30 п.н. — участок линкера в комплексе с гистоном Н1, 30 п.н. — свободная ДНК), октамер **сердцевинных** (коровых) гистонов и одну молекулу гистона Н1. Молекулярная масса полной нуклеосомы — 262 000 Да. Рассчитано, что на весь гаплоидный геном человека ( $3 \cdot 10^9$  пар оснований) приходится  $1,5 \cdot 10^7$  нуклеосом.

**Сердцевина** или коровая частица (или минимальная нуклеосома) очень консервативны по своей структуре: они всегда содержат 146 п.н. ДНК и октамер гистонов. Линкерный участок может значительно варьировать (от 8 до 114 п.н. на нуклеосому).

Используя метод рассеяния нейтронов, удалось установить форму и точные размеры нуклеосом. При грубом приближении — это плоский цилиндр или шайба диаметром 11 нм и высотой 6 нм. Располагаясь на подложке для электронного микроскопирования, они образуют «бусины» — глобулярные образования около 10 нм, гуськом, тандемно сидящие на вытянутых молекулах ДНК. На самом же деле вытянутыми являются только линкерные участки, остальные три четверти длины ДНК спирально уложены по периферии гистоновой октамеры. Сам гистоновый октамер, как считают, имеет форму, напоминающую мяч для игры в регби, в состав которого входит тетрамер (Н3, Н4)  $\times$  2 и два независимых димера Н2А, Н2В. На рис. 5.10 представлена схема расположения гистонов в сердцевинной части нуклеосомы.

В фибриллах хроматина линкерный участок не линеен, а продолжая спираль ДНК на поверхности нуклеосомной частицы связывает соседние нуклеосомы так, что образуется как бы сплошная нить, толщиной около 10 нм, состоящая из тесно расположенных нуклеосом (рис. 5.11) При этом за счет дополнительной спирализации ДНК (1 отрицательный супервиток ДНК на 1 нуклеосому) происходит

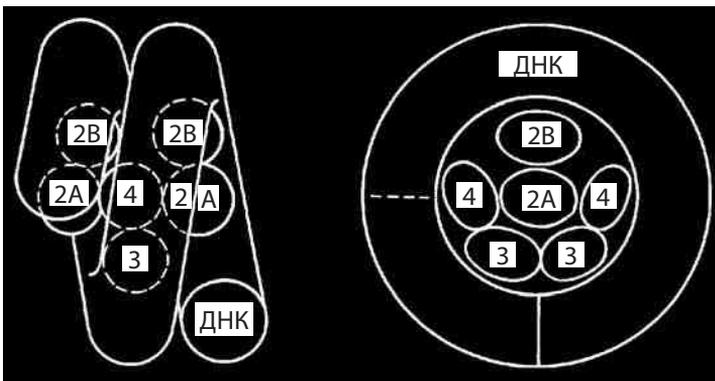


Рис. 5.10. Схема расположения гистонов в нуклеосоме

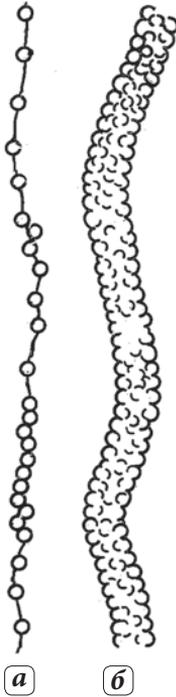


Рис. 5.11. Нуклеосомная нить ДНП (а) и 30-нм фибрилла хроматина (б)

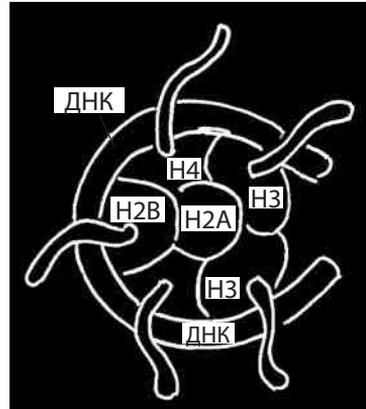


Рис. 5.12. Терминальные модифицированные N-концевые участки гистонов в составе нуклеосомы

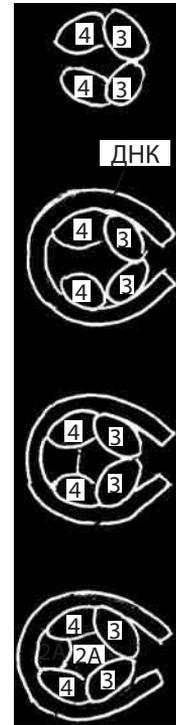


Рис. 5.13. При сборке нуклеосомы вначале взаимодействует тетрамер H32-H42, затем два димера H2A-H2B

первичная компактизация ДНК, с плотностью упаковки равной 6–7 (200 п.н. длиной 68 нм, уложены в глобулу диаметром 10 нм). Укладка почти двух витков ДНК по периферии сердцевин нуклеосомы происходит, как считается, за счет взаимодействия положительно заряженных аминокислотных остатков на поверхности октамера гистонов с фосфатами ДНК. N- и C-концевые участки сердцевинных гистонов, обогащенные положительными зарядами, вероятно, служат для дополнительной стабилизации структуры нуклеосомы.

В составе нуклеосомы у каждого гистона N-терминальный фибриллярный участок обращен наружу. N-терминальные участки гистонов H3 и H2B локализируются между оборотами ДНК, а терминальные участки гистона H4 контактируют с доменом H2A • H2B на соседней нуклеосоме (рис. 5.12). Модификации гистонов происходят главным образом на этих терминальных участках, что изменяет заряд на белковых молекулах нуклеосом и изменяет свойства октомеров при репликации и транскрипции, а также при конденсации хроматина. Так, фосфорилирование гистона H1 на начальных стадиях S-фазы подготавливает хроматин к конденсации во время митоза. После митоза происходит дефосфорилирование гистона H1 при переходе в интерфазу.

Ведущая роль сердцевинных (коровых) белков в компактизации ДНК показана при самосборке нуклеосом. Регулируя последовательность добавления гистонов

и ДНК, удалось получить полную реконструкцию нуклеосом. В этом процессе не играет никакой роли источник, откуда была взята ДНК: это может быть ДНК бактерии и даже циклическая ДНК вирусов. Оказалось, что для образования нуклеосом гистон H1 не требуется, он участвует в связывании уже готовых нуклеосом друг с другом и в образовании более высоких уровней компактизации ДНК. Ключевыми в построении нуклеосом оказались гистоны H3 и H4. При этом вначале ДНК связывается с тетрамером (H3, H4) × 2 к которому позже присоединяются два димера H2A • H2B. Вероятно, высокая консервативность в строении гистонов H3 и H4 отражает их ведущую структурную роль на первых этапах компактизации ДНК при образовании нуклеосом (рис. 5.13).

## 6. Нуклеосомы при репликации и транскрипции

Как же происходит образование нуклеосом при репликации ДНК, какова судьба нуклеосом в вилке репликации, как распределяются новые и старые нуклеосомы или их белки — все эти вопросы еще до конца не разрешены.

При электронномикроскопическом исследовании реплицирующегося хроматина было обнаружено, что обе новообразованные фибриллы содержат нуклеосомы (рис. 5.14). Если учесть скорость синтеза ДНК эукариот (20 нм/с), то новые нуклеосомы при удвоении хромосомных фибрилл должны возникать со скоростью 3–4 с. Такая высокая скорость образования нуклеосом связана с тем, что в момент синтеза ДНК существует уже пул синтезированных гистонов всех классов, готовых войти в состав нуклеосом. Гистоновые гены, относящиеся к фракции умеренно повторяющихся последовательностей ДНК, представлены в виде множественных копий для каждого гистона. Они активируются вместе с началом синтеза ДНК, поэтому по мере продвижения репликационной вилки, новые участки ДНК могут сразу взаимодействовать с новосинтезированными гистонами. Новосинтезированные гистоны и старые гистоны в составе предшествующих нуклеосом не смешиваются при образовании нуклеосом во время репликации ДНК. Вместо этого октамеры гистонов, присутствующие до репликации, остаются интактными и переходят на дочерний дуплекс ДНК, в то время как новые гистоны собираются в совершенно новые кор-частицы на свободных от нуклеосом участках ДНК. Старые и новые октамеры гистонов распределяются между дочерними дуплексами ДНК случайным образом.

Что происходит со старыми нуклеосомами в вилке репликации ДНК до конца не ясно. Согласно одной из гипотез, каждая из нуклеосом при подходе к ней репликативной вилки как бы расщепляется на две «полунуклеосомы», а нуклеосомная ДНК разворачивается, чтобы дать пройти этот участок ДНК-полимеразе. После этого новосинтезированная цепь ДНК связывается со свободными гистонами, которые есть в избытке в ядре, и образуются новые нуклеосомы на второй цепи ДНК.



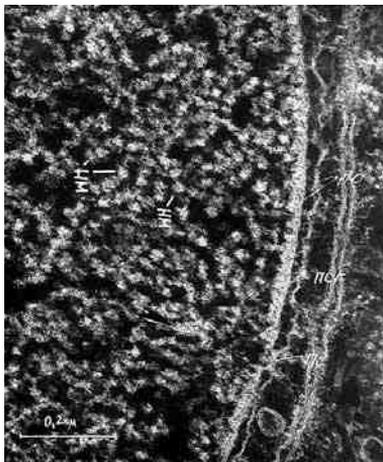
Рис. 5.14. При репликации ДНК нуклеосомы обнаруживаются на обеих новосинтезированных молекулах

Как уже упоминалось, для активно функционирующих зон хроматина характерно деконденсированное, диффузное, состояние. На этом свойстве хроматина основан один из методов получения фракций активного хроматина, когда с помощью центрифугирования удается осадить конденсированный хроматин из гомогенатов ядер, отделив его тем самым от диффузного хроматина, обладающего высокой транскрипционной активностью. Фракции активного хроматина обладают рядом характерных свойств: повышенной чувствительностью к нуклеазам, повышенным уровнем модификации гистонов (особенно ацелированием гистона H1), повышенным содержанием некоторых негистоновых белков.

Биохимические данные показывают, что во время транскрипции часть нуклеосомных белков остается связанной с ДНК. Нуклеосомы как частицы видны на хроматиновых фибриллах как до места отхождения транскрипта, так и после него при редкой посадке РНК-полимеразы, фермента вдвое большего, чем нуклеосома. При частой посадке этого фермента (например при транскрипции рибосомных генов или генов в других активных локусах), частицы РНК-полимеразы располагаются тесно друг к другу и между ними нуклеосомы не видны. Вероятнее всего нуклеосомные белки при прохождении РНК-полимеразы не теряют связи с ДНК, а сама ДНК в составе нуклеосомы разворачивается. Предлагают два варианта изменения структуры нуклеосом при синтезе РНК: при одном нуклеосома «расщепляется» на две полунуклеосомы, а ДНК разворачивается; при другом — нуклеосома частично декомпактизуясь, сохраняет тетрамер H3–H4, а два димера H2A–H2B временно отходят, а затем, после прохождения РНК-полимеразы, возвращаются, при этом восстанавливается исходная нуклеосома.

## 7. Второй уровень компактизации ДНК — 30 нм фибрилла

Таким образом, первый, нуклеосомный, уровень компактизации хроматина играет как регуляторную, так и структурную роль, обеспечивая плотность упаковки ДНК приблизительно в 6–7 раз.



Однако во многих электронномикроскопических исследованиях было показано, что как в митотических хромосомах, так и в интерфазных ядрах постоянно выявляются фибриллы хроматина с диаметром 30 нм (рис. 5.15). Хроматиновые фибриллы такого диаметра были видны как на ультратонких срезах после фиксации глутаровым альдегидом, так и на препаратах выделенного хроматина и выделенных хромосом в

Рис. 5.15 Электронная фотография интерфазного ядра при деконденсации хроматина в растворе с низкой ионной силой. Видны нуклеомеры (НМ) в составе 30-нм фибриллы хроматина

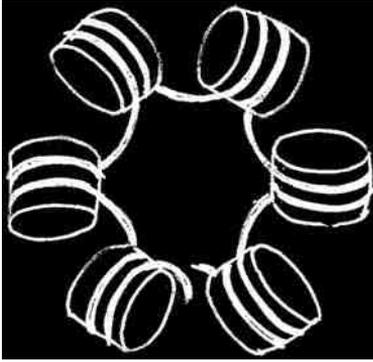


Рис. 5.16. «Суперсоленоид», состоящий из ДНК и 6 нуклеосом

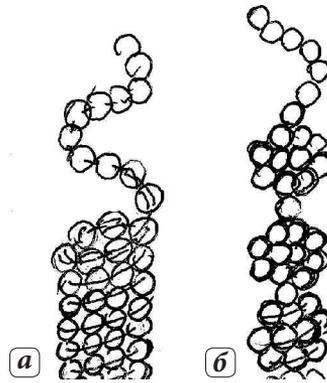


Рис. 5.17. Схема строения 30-нм фибриллы хроматина:

**а** — соленоидный тип; **б** — нуклеомерный тип укладки нуклеосомной фибриллы

растворах, содержащих хотя бы низкие концентрации двухвалентных катионов. Было показано, что 30 нм фибрилла хроматина может обратно менять свой диаметр, становиться фибриллой толщиной 10 нм, если препараты хроматина переводить в деионизованную воду или в растворы, содержащие хелатон ЭДТА. С другой стороны, даже частичная экстракция гистона Н1 переводит исходные 30 нм фибриллы хроматина в 10 нм нити, имеющие типичный нуклеосомный уровень организации. При добавлении к ним гистона Н1 восстанавливается первоначальный диаметр фибрилл.

Все это говорило о том, что нуклеосомные цепочки хроматина каким-то специфическим образом уложены так, что возникает не хаотическая агрегация нуклеосом, а правильная нитчатая структура диаметром 30 нм.

Относительно характера упаковки нуклеосом в составе 30 нм фибриллы хроматина существует, по крайней мере, две точки зрения. Одна из них защищает т.н. **соленоидный тип** укладки нуклеосом (рис. 5.16). Согласно этой модели нить плотно упакованных нуклеосом диаметром 10 нм образует в свою очередь спиральные витки с шагом спирали около 10 нм. На один виток такой суперспирали приходится 6 нуклеосом (рис. 5.17). В результате такой упаковки возникает фибрилла спирального типа с центральной полостью, которая иногда на негативно окрашенных препаратах бывает видна как узкий «канал» в центре фибриллы. При частичном разворачивании, декомпактизации такой фибриллы и нанесении ее на подложку хорошо видно «зигзагообразное» расположение нуклеосом вдоль фибриллы. Считается, что гистон Н1 обеспечивает взаимодействие между соседними нуклеосомами, не только сближая и связывая их друг с другом, но и обеспечивая кооперативную связь нуклеосом так, что образуется довольно плотная спираль из 10 нм фибриллы. Удаление, даже частичное, гистона Н1 вызывает переход 30 нм фибриллы в 10 нм фибриллу, а полное удаление его вызывает разворачивание последней в структуру типа «бусин-на-нити». Такой соленоидный тип упаковки ДНК приводит к плотности упаковки равной приблизительно 40 (т.е. на каждый

мкм нити приходится 40 мкм ДНК). Эти представления получили подтверждение при анализе структуры хроматина с помощью дифракции рентгеновских лучей и нейтронов. Здесь необходимо отметить, что представление о соленоидном типе укладки получены из анализа вторично конденсированного хроматина.

Если же исследовать хроматин в составе ядер или в виде выделенных препаратов, но при поддержании определенной концентрации двухвалентных катионов (не ниже 1мМ), то можно видеть дискретность в составе 30 нм фибрилл хроматина: она состоит как бы из сближенных глобул того же размера, из **нуклеомеров** (рис. 5.18). В зарубежной литературе такие 30 нм глобулы или нуклеомеры получили название сверхбусин («супербиды»). В состав одного нуклеомера входит отрезок ДНК, соответствующий 1600 парам оснований или 8 нуклеосомам.

Компактность нуклеомера зависит от концентрации ионов магния и наличия гистона H1. Негистоновые белки в конформационных превращениях нуклеомеров не участвуют.

Таким образом основная 30 нм фибрилла хроматина представляет собой линейное чередование нуклеомеров вдоль компактизованной молекулы ДНК (см. рис. 5.18). Вероятно, что гистоны H1, находясь в центральной зоне этой крупной частицы, взаимодействуя друг с другом, поддерживают ее целостность. В пользу этого говорят данные о кооперативном связывании гистонов H1 в группе по 6–8 молекул.

Противоречие между соленоидной и нуклеомерной моделью упаковки нуклеосом в составе фибрилл хроматина может быть снято, если принять модель нерегулярного соленоида: число нуклеосом на виток спирали не является строго постоянной величиной, что может привести к чередованию участков с большим или меньшим числом нуклеосом на виток.

Нуклеомерный уровень укладки хроматина обеспечивает 40-кратное уплотнение ДНК, что важно не только для достижения целей компактизации гигантских молекул ДНК. Компактизация ДНК в составе 30 нм фибрилл хроматина может налагать дополнительные функциональные ограничения. Так, было обнаружено, что в составе 30 нм фибриллы хроматина ДНК становится практически недоступной для взаимодействия с таким ферментом как метилаза ДНК. Кроме того, резко падает способность хроматина связываться с РНК-полимеразой и рядом регуляторных белков. Таким образом, второй уровень компактизации ДНК может играть роль фактора, инактивирующего гены.

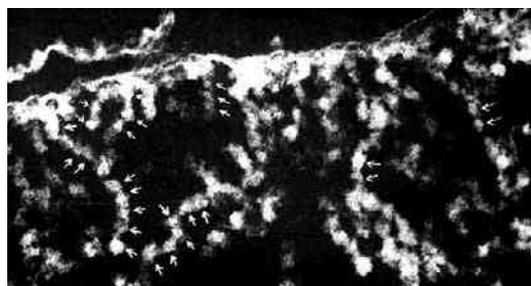


Рис. 5.18. Нуклеомеры на срезах ядер печени крысы при деконденсации хроматина

В заключение необходимо еще раз напомнить, что как нуклеосомный, так и нуклеомерный (супербидный) уровни компактизации ДНК хроматина осуществляются за счет гистоновых белков, которые участвуют не только в образовании нуклеосом, но и в их кооперативном объединении в виде фибрилл ДНП, где ДНК

претерпевает дополнительную сверхспирализацию. Все остальные уровни компактизации связаны с дальнейшим характером укладки 30 нм фибрилл в новые компактизационные уровни, где ведущую роль играют **негистоновые белки**.

## 8. Негистоновые белки

Негистоновые белки составляют около 20% от всех белков хроматина. По определению, **негистоновые белки** — это все белки хроматина, кроме гистонов, выделяющиеся с хроматином или хромосомами. Это сборная группа белков, отличающихся друг от друга как по общим свойствам, так и по функциональной значимости. Около 80% из негистоновых белков относится к **белкам ядерного матрикса**, обнаруживаемых как в составе интерфазных ядер, так и митотических хромосом. Эта группа белков будет отдельно рассмотрена в разделе, посвященном комплексу структур, входящих в состав ядерного матрикса: фиброзный слой или ламина ядерной оболочки и внутренний ядерный матрикс, интерхроматиновая сеть, матрикс ядрышка (см. ниже).

Во фракцию негистоновых белков может входить около 450 индивидуальных белков с различной молекулярной массой (5–200 кД). Часть этих белков водорастворима, часть растворима в кислых растворах, часть непрочно связана с хроматином и диссоциирует при 0,35 М концентрации солей (NaCl) в присутствии денатурирующих агентов (5 М мочевины). Поэтому характеристика и классификация этих белков затруднена, а сами белки еще недостаточно изучены.

Среди негистоновых белков обнаруживается целый ряд регуляторных белков как стимулирующих инициацию транскрипции, так и ингибирующих ее, обнаружены белки, специфически связывающиеся с определенными последовательностями на ДНК. К негистоновым белкам относят также ферменты, участвующие в метаболизме нуклеиновых кислот (ДНК-полимеразы, ДНК-топоизомеразы, метилазы ДНК и РНК, РНК-полимеразы, РНКазы и ДНКазы и т.д.), белков хроматина (протеинкиназы, метилазы, ацетилазы, протеазы и др.) и многие другие.

Наиболее подробно изучены негистоновые белки т.н. группы с высокой подвижностью (HMG — *high mobility group*, или «белки Джонса»). Они хорошо экстрагируются в 0,35 М NaCl и 5% HClO<sub>4</sub> и обладают высокой электрофоретической подвижностью (отсюда их название). Основных HMG-белков четыре: HMG-1, HMG-2, HMG-14, HMG-17. Эта группа наиболее богата представлена среди негистоновых белков: в клетке их около 5% от всего числа гистонов. Особенно часто эти белки встречаются в активном хроматине (примерно 1 молекула HMG-белка на 10 нуклеосом). Белки HMG-1 и HMG-2 не входят в состав нуклеосом, а связываются, видимо, с линкерными участками ДНК. Белки HMG-14 и HMG-17 связываются с сердцевинными белками нуклеосом, что обеспечивает, вероятно, изменение уровня компактизации фибрилл ДНП, которые становятся более доступными для взаимодействия с РНК-полимеразой. В этом случае HMG-белки выступают в качестве регуляторов транскрипционной активности. Было обнаружено, что

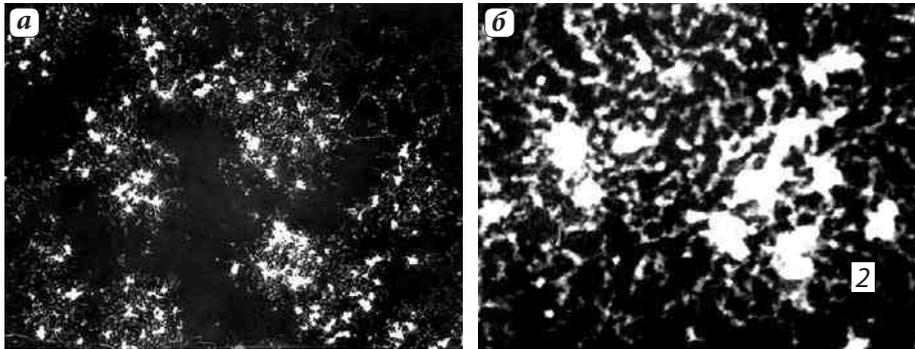
фракция хроматина, обладающая повышенной чувствительностью к ДНКазе I, обогащена НМГ-белками.

## 9. Петлевые домены ДНК — третий уровень структурной организации хроматина

Расшифровка принципа строения элементарных хромосомных компонентов — нуклеосом и 30 нм фибрилл — еще мало что дает для понимания основ трехмерной организации хромосом, как в интерфазе, так и в митозе. Сорокакратное уплотнение ДНК, которое достигается при сверхспиральном характере ее компактизации, совершенно еще недостаточно для получения реального ( $1 \cdot 10^4$ ) уровня уплотнения ДНК. Следовательно, должны существовать более высокие уровни компактизации ДНК, которые, в конечном счете, должны определять размеры и общие характеристики хромосом. Такие высшие уровни организации хроматина были обнаружены при искусственной его деконденсации, когда было найдено, что поддержание их связано с негистоновыми белками. В этом случае специфические белки связываются с особыми участками ДНК, которые в местах связывания образуют большие петли, или домены. Таким образом, следующие, более высокие уровни компактизации ДНК, связаны не с ее дополнительной спирализацией, а с образованием поперечной петливой структуры, идущей вдоль интерфазной или митотической хромосомы.

Как уже указывалось, сложная структура ядра или нуклеоида прокариот организована в виде иерархии петлевых доменов ДНК, связанных с небольшим количеством специальных белков. Петлевой принцип упаковки ДНК обнаруживается также и у эукариотических клеток. Так, если выделенные ядра обработать 2 М NaCl, т.е. удалить все гистоны, то целостность ядра сохраняется, за исключением того, что вокруг ядра возникнет т.н. «гало», состоящее из огромного числа петель ДНК. Такая структура ядер получила название «нуклеоида» (это только терминологическое сходство с ядерным аппаратом прокариот). Гало (или периферия такого нуклеоида) состоит из огромного (до 50 000) количества замкнутых на периферии петель ДНК, со средним размером петель около 60 т.п.н., основание которых закреплено где-то внутри ядра, на участках негистоновых белков. Тем самым считается, что после удаления гистонов основания петлевых доменов ДНК связаны с т.н. «матриксом», или «скэффолдом» — негистоновым белковым остовом интерфазного ядра. Оказалось, что участки ДНК, связанные с этим остовом, имеют особое родство к негистоновым белкам, их состав изучен, они получили название MAR (*matrix attachment region*), или SAR (*scaffold attachment region*) участков.

Признаки петлевой доменной организации хроматина можно наблюдать с помощью электронного микроскопа после помещения ядер или хромосом в солевые растворы низкой ионной силы (0,01 М NaCl) в присутствии низких концентраций двухвалентных катионов (1 мМ). В этих условиях не происходит депротенизации хроматина, он сохраняет свою нормальную химическую композицию,



**Рис. 5.19.** Хромомеры в составе хромосом, деконденсированных гипотонией:

**а** — общий вид ультратонких срезов деконденсированных митотических хромосом; **б** — розетковидная структура отдельных хромомеров того же препарата

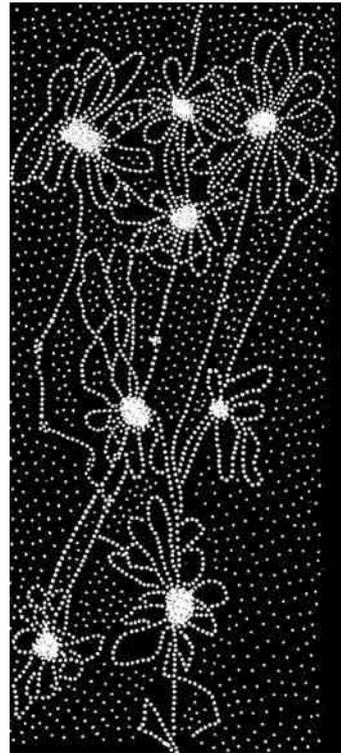
1 — центральная часть хромомера; 2 — радиально расходящиеся фибриллы ДНП

но значительно разрыхляется и представлен стандартными фибриллами толщиной 30 нм. При этом в некоторых местах можно видеть, что отдельные сгустки конденсированного хроматина выявляют особую структуру. Это — розетковидные образования, состоящие из многих петель 30 нм фибрилл, соединяющихся в общем плотном центре. Средний размер таких петлистых розеток достигает 100–150 нм. Подобные розетки фибрилл хроматина — **хромомеры** — можно видеть в ядрах самых разнообразных объектов, животных, растений, простейших (рис. 5.19).

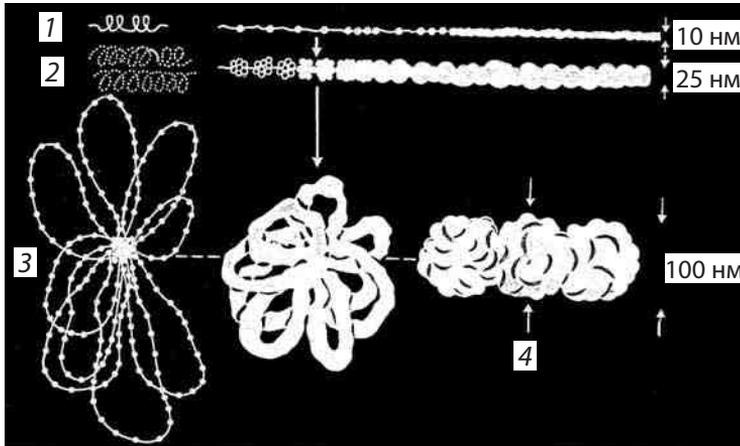
Особенно демонстративно такие хромомеры выявляются на тотальных препаратах хроматина из макронуклеусов инфузории *Bursaria*. В этом случае можно видеть, что каждый хромомер состоит из нескольких содержащих нуклеосомы петель, которые связаны в одном центре. Хромомеры связаны друг с другом участками нуклеосомного хроматина, так что в целом видна цепочка розетковидных структур (рис. 5.20).

При деконденсации хроматина ядер некоторых растений (*Allium*, *Haemantnus*, *Vicia*), для которых характерна особая структура интерфазных ядер, хромомеры видны в составе хромонемных нитей — толстых (0,1–0,2 мкм) хроматиновых нитей, заполняющих весь объем интерфазного ядра.

Сходные розетковидные петлистые структуры, хромомеры, можно видеть также при разрыхлении и митотических хромосом как животных, так и растений. Следовательно, хромосомные 30 нм фибриллы,



**Рис. 5.20.** Хромомеры, выделенные из макронуклеуса инфузории *Bursaria* (По В.И. Попенко)



**Рис. 5.21.** Схема начальных уровней компактизации хроматина:

1 — нуклеосомный; 2 — нуклеомерный (30-нм фибрилла ДНП); 3 — хромомерный (петлевой домен); 4 — хромономный

состоящие из ДНК и гистонов, упаковываются в виде петлистых розетковидных структур, претерпевая еще дополнительную компактизацию. Это третий уровень структурной организации хроматина, как считается, может приводить уже к 600-кратной компактизации ДНК (рис. 5.21).

Важно отметить, что размер отдельных петлевых доменов совпадает с размером средних репликонов и может соответствовать одному или нескольким генам. В своих основаниях петли ДНК связаны негистоновыми белками ядерного матрикса, в состав которых могут входить как ферменты репликации ДНК, так и транскрипции. Такая петельно-доменная структура хроматина обеспечивает не только структурную компактизацию хроматина, но и организует функциональные единицы хромосом — репликоны и транскрибируемые гены. Комплекс белков, участвующих в такой структурно-функциональной организации хроматина, относится к белкам ядерного матрикса.

# Глава 6

## Ядерный белковый матрикс

### 1. Общий состав ядерного белкового матрикса

Мы уже познакомились с тем, что в интерфазном ядре развернутые хромосомы располагаются не хаотично, а строго упорядоченно. Такая организация хромосомы в трехмерном пространстве ядра необходима не только для того, чтобы при митозе происходила сегрегация хромосом, их обособление от соседей, но и для упорядочения процессов репликации и транскрипции хроматина. Можно предполагать, что для осуществления этих задач должна существовать какая-то каркасная внутриядерная система, которая может служить объединяющей основой для всех ядерных компонентов — хроматина, ядрышка, ядерной оболочки. Такой структурой является **белковый ядерный остов, или матрикс**. Необходимо сразу же оговориться, что ядерный матрикс не представляет собой четкой морфологической структуры: он выявляется как отдельный морфологический гетерогенный компонент при экстракции из ядер практически всех участков хроматина, основной массы РНК и липопротеидов ядерной оболочки. От ядра, которое не теряет при этом своей общей морфологии, оставаясь сферической структурой, остается как бы каркас, остов, который иногда называют еще «ядерным скелетом».

Впервые компоненты ядерного матрикса (остаточные ядерные белки) были выделены и охарактеризованы в начале 60-х годов. Было обнаружено, что при последовательной обработке изолированных ядер печени крыс 2 М раствором NaCl, а затем ДНКазой, происходит полное растворение хроматина, а основными структурными элементами ядра остаются: ядерная оболочка, связанные с ней компоненты — нуклеомемы (ядерные нити), содержащие белок и РНК, и ядрышки. Была высказана гипотеза, что фибриллы хроматина в нативных ядрах прикреплены к этим осевым белковым нитям наподобие «ершика для чистки бутылок» (рис. 6.1).

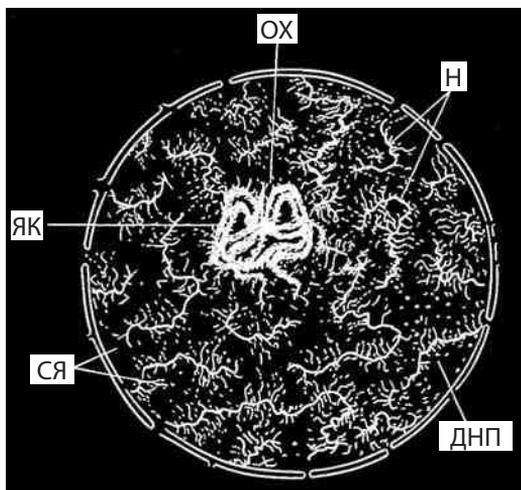


Рис. 6.1. Гипотетическая схема строения интерфазного ядра (Георгиев, Ченцов, 1960):

Н — нуклеомера; ЯК — ядрышко; ОХ — околоядрышковый хроматин; СЯ — ядерный сок

Значительно позднее (середина 70-х годов) эти работы получили развитие и привели к появлению массы новых сведений о нехроматиновых белках ядерного остова и о его роли в физиологии клеточного ядра. В это же время был предложен термин «ядерный матрикс» для обозначения остаточных структур ядра, которые могут быть получены в результате последовательных экстракций ядер различными растворами. Новым в этих приемах было использование неионных детергентов, таких как Тритон X-100, растворяющих ядерные липопротеидные мембраны.

Последовательность обработки выделенных ядер, приводящая к получению препаратов ядерного матрикса, обогащенного белком, следующая (табл. 6).

Химический состав ядерного матрикса, полученный таким способом, сходен у различных объектов (табл. 7).

По своей морфологической композиции ядерный матрикс состоит, по крайней мере, из трех компонентов: периферический белковый сетчатый (фиброзный) слой — ламина (*nuclear lamina, fibrous lamina*), внутренняя или интерхроматиновая сеть (остов) и «остаточное» ядрышко (рис. 6.2).

Ламина представляет собой тонкий фиброзный слой, подстилающий внутреннюю мембрану ядерной оболочки. В ее состав входят так же комплексы ядерных пор, которые как бы вмурованы в фиброзный слой. Часто эту часть ядерного матрикса называют фракцией «поровый комплекс — ламина» (PCL — «*poze complex — lamina*»). В интактных клетках и ядрах ламина большей частью морфологически не выявляется, т.к. к ней тесно прилегает слой периферического хроматина. Лишь иногда ее удается наблюдать в виде относительного тонкого (10–20 нм) фиброзного слоя, располагающегося между внутренней мембраной ядерной оболочки и периферическим слоем хроматина.

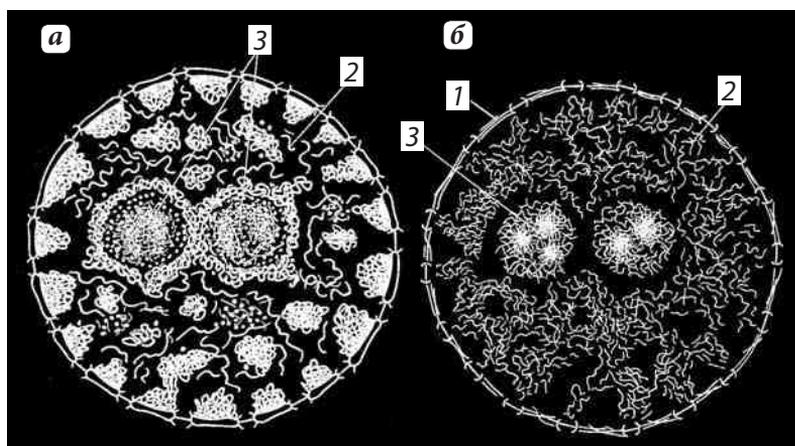
Структурная роль ламины очень велика: она образует сплошной фиброзный белковый слой по периферии ядра, достаточный для того, чтобы поддерживать морфологическую целостность ядра. Так удаление обеих мембран ядерной оболочки с помощью детергента Тритона X-100 не вызывает распада, растворения

**Таблица 6.** Процент ядерных компонентов, экстрагированных в процессе получения ядерного белкового матрикса

Обработка	Фракция	Белок	ДНК	РНК	Фосфолипиды
1. Изолированные ядра (контроль)	N	0	0	0	0
2. 0,2 мМ MgCl <sub>2</sub>	LS	52	75	19	2,5
3. 2 М NaCl	HS	83	97	66	6,4
4. 1%-ный Тритон X-100	NM	90	97	71	97,8
5. ДНКаза+РНКаза	NPM	90	99	98	98

**Таблица 7.** Состав ядерного белкового матрикса

Объект	Белок	ДНК	РНК	Фосфолипиды
Крыса, печень	97	0,1	1,2	1,1
Клетки HeLa	92,3	1,2	0,05	6,9
Тетрахимена	97	0,1	1,2	0,5



**Рис. 6.2.** Ядерный белковый матрикс. Схема строения ядер до экстракции ДНП (а), после нее (б):

1 — примембранный белковый слой (ламина) и поровые комплексы; 2 — межхроматиновая белковая сеть матрикса; 3 — белковый матрикс ядрышка

ядер. Они сохраняют свою округлую форму и не расплываются даже в случае перевода их в низкую ионную силу, когда происходит набухание хроматина.

Внутриядерный остов или сеть морфологически выявляется только после экстракции хроматина. Он представлен рыхлой фиброзной сетью, располагающейся между участками хроматина, часто в состав этой губчатой сети входят различные гранулы РНП-природы.

Наконец, третий компонент ядерного матрикса — остаточное ядрышко — плотная структура, повторяющая по своей форме ядрышко, также состоит из плотно уложенных фибрилл.

Морфологическая выраженность этих трех компонентов ядерного матрикса, так же как и количество во фракциях, зависит от целого ряда условий обработки ядер. Лучше всего элементы матрикса выявляются после выделения ядер в относительно высоких (5 мМ) концентрациях двухвалентных катионов. Для выявления белкового компонента ядерного матрикса большое значение имеет образование дисульфидных связей.

Эти наблюдения привели к выводу, что компоненты ядерного матрикса представляют собой не застывшие жесткие структуры, а компоненты, обладающие динамической подвижностью, которые могут меняться не только в зависимости от условий их выделения, но и от функциональных особенностей нативных ядер. Например, в зрелых эритроцитах кур весь геном репрессирован и хроматин локализован преимущественно на периферии ядра, в этом случае внутренний матрикс не выявляется, а только ламина с порами. В эритроцитах 5-дневных куриных эмбрионов, ядра которых сохраняют транскрипционную активность, элементы внутреннего матрикса выражены отчетливо.

Как было видно из табл. 7, основной компонент остаточных структур ядра — белок, содержание которого может колебаться от 88 до 98%. Белковый состав ядерного матрикса из разных клеток довольно близок. Характерны для него три белка

фиброзного слоя, называемые **ламинами**. Кроме этих основных полипептидов в матриксе присутствует большое количество минорных компонентов с молекулярными массами от 11–13 до 200 кД.

Ламины представлены тремя белками (ламинаы А, В, С). Два из них, ламинаы А и С, близки друг к другу иммунологически и по пептидному составу. Ламин В от них отличается тем, что он представляет собой липопротеид и поэтому он более прочно связывается с ядерной мембраной. Ламин В остается в связи с мембранами даже во время митоза, тогда как ламинаы А и С освобождаются при разрушении фиброзного слоя и диффузно распределяются по клетке.

Как оказалось, ламинаы близки по своему аминокислотному составу промежуточным микрофиламентам (виментиновым и цитокератиновым), входящим в состав цитоскелета. Часто фракция выделенных ядер, а также препараты ядерного матрикса содержат значительные количества промежуточных филаментов, которые остаются связанными с периферией ядра даже после удаления ядерных мембран.

В отличие от промежуточных филаментов ламинаы при полимеризации не образуют нитчатых структур, а организуются в сети с ортогональным типом укладки молекул. Такие сплошные решетчатые участки подстилают внутреннюю мембрану ядерной оболочки, могут разбираться при фосфорилировании ламинов и вновь полимеризоваться при их дефосфорилировании, что обеспечивает динамичность как этого слоя, так и всей ядерной оболочки.

Молекулярная характеристика белков внутриядерного остова детально еще не разработана. Показано, что в его состав входит ряд белков, принимающих участие в доменной организации ДНК в интерфазном ядре в создании розетковидной, хромомерной формы упаковки хроматина. Предположение о том, что элементы внутреннего матрикса представляют собой сердцевины розеточных структур хромомеров, находит подтверждение в том, что полипептидный состав матрикса интерфазных ядер (за исключением белков ламинаы) и остаточных структур метафазных хромосом (осевые структуры или «скэффолд») практически одинаковы.

## 2. ДНК ядерного белкового матрикса

Рассматривая особенности ДНК, входящей в состав ядерного матрикса, необходимо еще раз подчеркнуть, что эта остаточная ДНК представлена в минимальном количестве (0,1–1% от сухого веса фракции) составляет лишь менее 1% от всей ДНК ядра. Эта ДНК оказалась устойчивой к действию нуклеаз, вероятно за счет ее существования в виде прочных ДНК-белковых комплексов.

Большой интерес представляет изучение фрагментов ДНК, входящих в состав ядерного матрикса. Расчеты показали, что в ядрах существует от 60 000 до 125 000 участков ДНК, защищенных от действия нуклеаз, и эти участки могут быть расположены на всех трех компонентах ядерного матрикса.

Эти участки ДНК, связывающиеся со структурами ядерного белкового матрикса (*MAR-matrix attachment regions* или *SAR-scaffold attachment regions*), обогащены А–Т парами нуклеотидов.

Были обнаружены две размерные группы фрагментов ДНК в составе ядерного матрикса. В первую группу входили высокомолекулярные фрагменты размером около 10 т.п.н., они составляли всего 0,02% от исходного количества ДНК. Их число составляло примерно 100 на гаплоидный набор хромосом, т.е. всего 2–3 участка прикрепления ДНК к ядерному матриксу на хромосому. Эти фрагменты были обогащены сателлитной ДНК и были связаны с ламиной. Функциональное значение этих участков может состоять в обеспечении фиксированного положения хромосом в ядре с помощью закрепления их определенных участков (центромер, теломер) на ламине.

Вторая группа фрагментов, связанных с матриксом, состояла из небольших участков ДНК (120–140 п.н.), гетерогенных по последовательности. Они встречаются между участками ДНК длиной около 50 т.п.н., представляющих собой, вероятно, петли основной массы хроматина (рис. 6.3). Функциональное значение второй группы этих коротких участков ДНК может заключаться в том, что они ассоциированы с белками, лежащими в основаниях розеткоподобных структур хроматина или в основании развернутых петель ДНК хроматина при его активации.

Места расположения последовательностей SAR (MAR) очень сходны или даже идентичны с местами связывания ДНК с топоизомеразой II, которая играет основную структурную и ферментативную роль в образовании петель хроматина. Более того, один из белков матрикса («скэффолда») митотических хромосом, белок Scl оказался просто топоизомеразой II.

С помощью иммунофлуоресценции было показано, что на интерфазных хромосомах Scl локализуется в основании петель ДНК.

Было обнаружено, что ядерный белковый матрикс связан с репликацией ДНК: свыше 70% новосинтезированной ДНК было локализовано в зоне внутреннего ядерного матрикса. Это наблюдение давало основание считать, что на ядерном

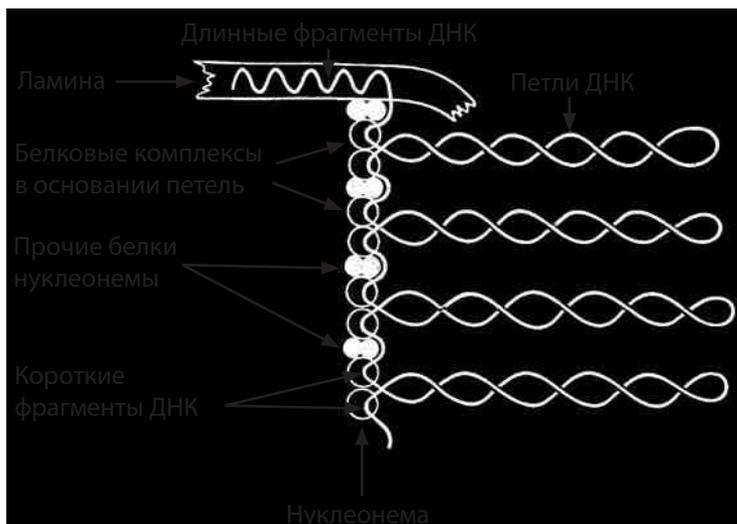


Рис. 6.3. Схема связи ДНК с компонентами ядерного белкового матрикса (по Разин, Яровая)

матрикс происходит инициация и собственно репликация ДНК. Фракция ДНК, ассоциированная с ядерным матриксом, оказалась обогащенной репликативными вилками. В составе ядерного матрикса обнаружена ДНК-полимераза  $\alpha$ , основной фермент репликации ДНК. Кроме него с ядерным матриксом связаны и другие ферменты репликативного комплекса (реплисомы): ДНК-праймаза, ДНК-лигаза, ДНК-топоизомераза II. Было обнаружено, что участки начала репликации ДНК располагаются вблизи (или совпадают с ними) участков постоянного прикрепления ДНК к ядерному матриксу.

В состав ядерного матрикса входит около 1% РНК, включающей как гетерогенную высокомолекулярную РНК, так и рибосомную РНК, и РНК ядерных малых РНП. На возможность связи элементов матрикса с процессами транскрипции указывали данные о том, что при коротком мечении матрикс обогащался быстро меченной гетерогенной РНК. Было обнаружено, что в состав белков внутреннего ядерного матрикса входит РНК-полимераза II, ответственная за синтез информационных РНК. С ядерным матриксом клеток яйцеводов кур оказалась связанной большая часть (95%) новосинтезированных пре-мРНК овальбумина и пре-рРНК. Эти наблюдения привели к заключению, что ядерный матрикс может выполнять структурную роль в синтезе, процессинге и транспорте РНК в ядре.

С ядерным матриксом связаны собственно транскрибирующиеся гены. Транскрипционные комплексы закреплены на ядерном матриксе, а сама транскрипция осуществляется одновременно с перемещением матричной ДНК относительно закрепленных транскрипционных комплексов, содержащих РНК-полимеразу II. В составе ядерного белкового матрикса обнаруживаются малые ядерные рибонуклеопротеиды (мя РНП), которые участвуют в созревании информационных РНК, в процессе сплайсинга (см. ниже). Эти РНК-содержащие частицы, иногда называемые *сплайсосомами*, собраны в группы или кластеры, связанные с белками ядерного матрикса.

Элементы ядерного матрикса могут прямо участвовать в регуляции транскрипции. Так, участки MAR обычно связаны с такими регуляторными последовательностями на ДНК, как энхансеры и сайленсеры, определяющими интенсивность транскрипционных процессов. На ядерном матриксе локализованы белки-рецепторы для ряда стероидных гормонов.

Относительно связи ДНК с элементами ядерного матрикса на сегодня сложились представления о том, что эта связь может отражать различные функциональные особенности. Так, связь ДНК с ламинной может отражать структурную, постоянную ассоциацию ДНК, а связь с внутренними элементами — функциональную, связанную как с синтезом ДНК, так и РНК.

Поведение белков ядерного матрикса во время митоза изучено еще далеко недостаточно. О судьбе ламинной при митозе уже было сказано: ее компоненты разбираются, частично переходя в цитоплазму, частично (ламин В) оставаясь в связи с мембранами. Относительно компонентов внутриядерного матрикса сведений меньше: известно, что часть этих белков входит в состав матрикса («скэффолда») митотических хромосом.

## Глава 7

# Четвертый – хромонемный – уровень упаковки хроматина

Исследуя структурную организацию хроматина и хромосом, можно определенно говорить о нескольких уровнях компактизации ДНК.

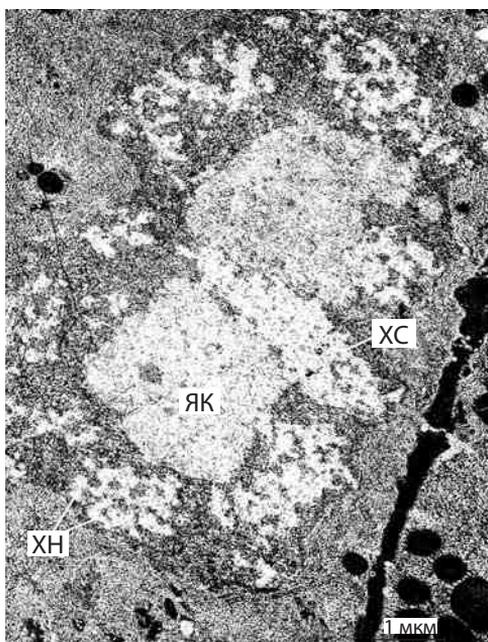
Первый — нуклеосомный, дающий 7-кратное уплотнение ДНК в составе фибрилл ДНП, второй — 30 н.м. фибрилла или нуклеомерный уровень с 40–70-кратной степенью упаковки, третий — доменно-петлевой или хромомерный приводящий к 600–700-кратному уплотнению ДНК в составе этих структур. Для поддержания первых двух уровней компактизации было достаточно участие только гистоновых белков, тогда как петлевые и розетко-подобные доменные структуры уже требовали участия негистоновых белков, и перехода от спирального или соленоидного типа укладки ДНК к образованию компактных глобулярных структур, состоящих из петель хроматиновых 30 н.м. фибрилл, к структурам типа *хромомеров*, имеющих уже размеры 0,1–0,2 мкм.

Однако еще в классических работах цитологов начала XX века как в интерфазных ядрах, так и, особенно, в митотических хромосомах описывались нитчатые структуры — *хромонемы*, имеющие толщину 0,1–0,2 мкм. Их удавалось наблюдать как на фиксированных объектах, так и в живых клетках.

Наличие нитчатых структур в теле митотических хромосом давало начало для представления о том, что в их составе может быть несколько «субхроматид». Однако сейчас достоверно известно, что на одну хромосому приходится одна гигантская молекула ДНК, тем самым гипотеза о многонитчатости хромосом отвергается. Поэтому наличие в составе хромосом нитчатых структур толщиной 0,1–0,2 мкм необходимо считать дополнительным высшим уровнем компактизации хроматина — хромонемой, образующей тело митотической хромосомы, за счет ее специальной укладки.

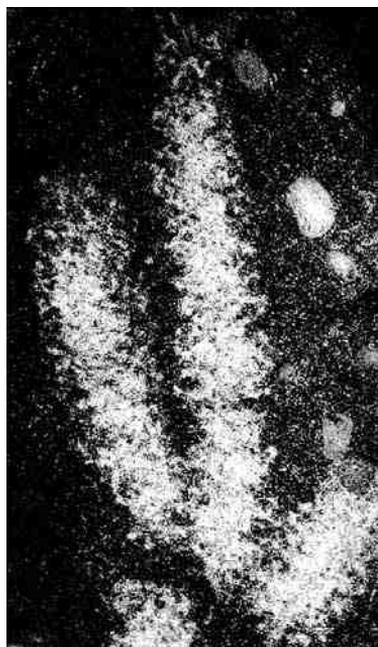
Исследования ультраструктуры митотических хромосом на разных этапах митоза с помощью электронной микроскопии полностью подтвердило наличие этого четвертого уровня компактизации хроматина. При изучении ультратонких срезов хромосом обнаруживаются сечения хромонемных нитчатых хроматиновых структур с толщиной 0,1–0,2 мкм на разных стадиях конденсации хромосом в профазе и при их деконденсации в телофазе. Причем хромонема выявляется как в клетках животных, так и растений (рис. 7.1, 7.2).

В составе метафазных хромосом хромонемные элементы на ультратонких срезах не выявляются. Но по мере деконденсации митотических хромосом в поздней анафазе и ранней телофазе снова можно видеть признаки хромонемной



**Рис. 7.1.** Хромонемная организация хромосом *Paeonia arborea* в профазе митоза:

ЯК — ядрышко; ХС — хромосома; ХН — хромонемы



**Рис. 7.2.** Хромонемная организация хромосом клеток СПЭВ в ранней телофазе

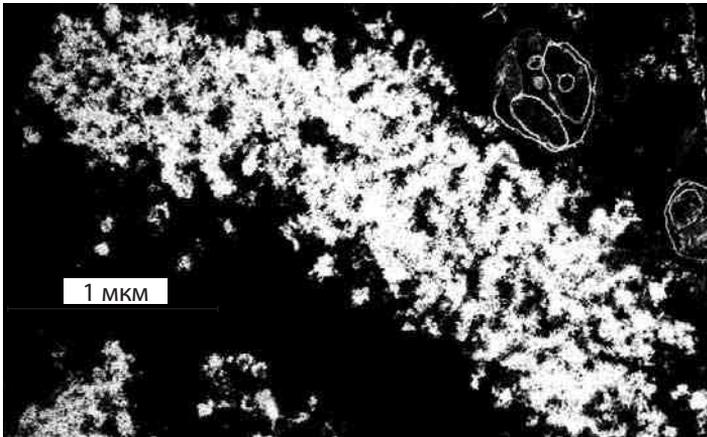
(фото В.Ю. Полякова)

организации хромосом. В поздней анафазе, когда хромосомы достигают противоположных полюсов клетки, в их структуре снова выявляются хроматиновые нитчатые образования с толщиной 0,2 мкм. При этом вся структура хромосом разрыхляется, что отражает начало общей деконденсации митотических хромосом. Эта начальная стадия деконденсации связана не с разрыхлением фибрилл ДНП внутри хромонемы, а с расхождением, обособлением участков хромонемы друг от друга. Особенно заметным и выраженным этот процесс становится в телофазе.

В это время хромосомы начинают увеличиваться в объеме, при этом расстояние между отдельными участками хромонемы также возрастает.

В поздней телофазе хромосомы уже полностью окружены ядерной оболочкой. Участки хромонемы расходятся на значительные расстояния, но все же зоны отдельных хромосом еще выявляются. В это время некоторые участки хромонем начинают разрыхляться. Таким образом, наблюдая за состоянием структуры и расположением хромонемных участков в ядрах и хромосомах в телофазе, можно видеть картину, обратную той, что наблюдалась в профазе: разрыхление хромосом за счет первоначального расхождения участков хромонемы и последующего их разрыхления, деконденсации самой хромонемы.

Ультраструктурная организация хромонемного уровня упаковки ДНП хорошо выявляется при постепенном экспериментальном разрыхлении хромосом при понижении концентрации двухвалентных катионов. Оказалось, что плотное тело



**Рис. 7.3.** Хромонемы в составе экспериментально деконденсированного хромосома (фото В.В. Буракова)

митотических хромосом сначала разрыхляется так, что выявляется его хромонемная организация: на срезах видно, что хромосомы представлены сечениями толстых (0,1–0,2 мкм) хромосомных нитей, хромонемы (рис. 7.3). Затем, при последующем снижении концентрации двухвалентных катионов, в элементах хромонемы выявляется множество линейно расположенных глобулярных блоков хроматина с диаметром около 0,1–0,2 мкм. В дальнейшем эти блоки (хромомеры) начинают деконденсироваться: на их периферии видны петли фибрилл ДНП, а в центре остается тело хромомера. Возникает розеткоподобная структура. Важно отметить, что расположение зон с розеткоподобными хромомерами совпадает с рисунком G-бэндрингирования хромосома. По мере дальнейшей деконденсации петли увеличиваются в длину, а центральные участки хромомеров прогрессивно уменьшаются. При полной деконденсации все тело хромосомы представлено на срезах равномерно расположенным фибриллами ДНП.

Изучение хромосом как животных, так и растений показывает, что процесс конденсации хромосомного материала включает в себя промежуточный этап — образование из фибрилл ДНП нитчатых хромонемных структур, являющихся единицей последующей хромосомной структуризации.

Надо отметить, что в современных молекулярно биологических исследованиях строения хромосом хромонемный уровень, как один из высших уровней упаковки ДНП, совершенно выпадает из поля зрения исследователей. Лишь в последнее время некоторые исследователи на основании косвенных данных приходят к выводам о наличии в интерфазных ядрах хромонемо-подобных структур.

## Тотальное строение митотических хромосом

Интенсивное изучение ультраструктуры хромосом началось в середине 1950-х годов, что было связано с внедрением в цитологию метода электронной микроскопии. Однако вклад электронной микроскопии в изучение структуры

интерфазных и митотических хромосом оказался неизмеримо ниже того, что дал этот метод для изучения структуры цитоплазмы. Наши представления о структурной организации даже элементарных компонентов ядра и о структуре хромосом очень скудны и противоречивы. Разрыв между успехами в биохимическом изучении процессов биосинтеза ДНК и РНК, с одной стороны, и чрезвычайно медленным прогрессом в исследовании тонкой организации клеточного ядра — с другой, объясняется многими причинами. Одна из основных причин та, что современные методы не позволяют изучать ядро и хромосомы в целостной совокупности составляющих их элементов. Хромосома оказалась слишком мала для детального анализа с помощью светового микроскопа и слишком велика и плотна для изучения в электронном микроскопе. На выделенных хромосомах в электронном микроскопе не удастся выявить все детали из-за наложений проекций разных уровней и можно наблюдать лишь характер формы или же тонкую структуру в ограниченных участках. Исследование ультратонких срезов хромосом ограничивается характеристикой отдельных элементов без возможности получить объемное представление о всей структуре.

Это происходит из-за того, что в данном случае мы можем исследовать лишь плоские сечения, составляющие только 0,05–0,025 часть общего объема ядра. Так как для ядра и хромосом характерно преобладание тонких и длинных спутанных фибриллярных структур, которые на ультратонких срезах будут иметь вид беспорядочно разбросанных коротких отрезков, то по таким сечениям воссоздать трехмерную картину взаимосвязи этих элементов друг с другом практически невозможно.

При изучении ультраструктуры хромосом исследователи сталкиваются с парадоксальной ситуацией: чем ближе подходим к высшим структурным уровням организации хромосом, тем меньшей по объему и более низкой по надежности становится информация об этой важнейшей клеточной структуре (рис. 7.4).

Действительно, получена полная информация о генетическом

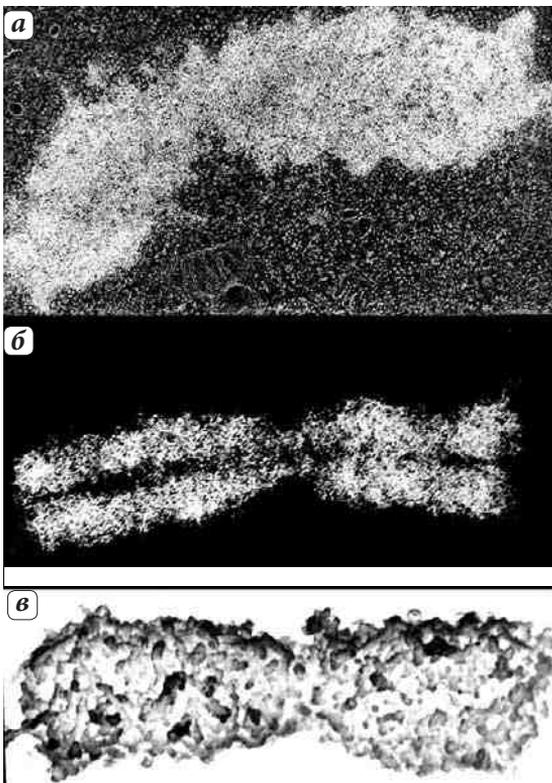


Рис. 7.4. Общий вид хромосом:

**а** — хромосомы клеток культуры СПЭВ на ультратонком срезе; **б** — вид выделенных метафазных хромосом в просвечивающем электронном микроскопе; **в** — вид выделенных метафазных хромосом в сканирующем электронном микроскопе

коде человека, хорошо изучен нуклеосомный уровень компактизации ДНК, определен общий петлевой доменный характер дальнейшей укладки ДНК, подтверждаются представления о хромонемном уровне, но все же, на сегодня мы до конца не знаем, как построена митотическая хромосома.

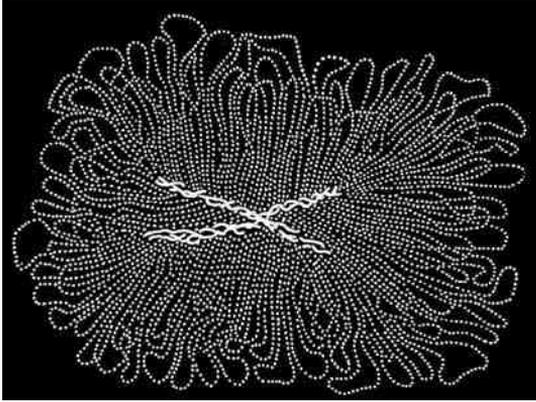
Трудности изучения хромосом связаны кроме всего прочего в том, что это очень лабильная структура, легко меняющая свою морфологию в зависимости от условий эксперимента. Так, обращает на себя внимание свойство митотических хромосом обратимо изменять свой объем при изменении ионного окружения. Как уже указывалось, применение гипотонических растворов приводит к набуханию хромосом, но при возвращении их в изотонические условия, они вновь приобретают исходную морфологию. Из этого следует, что существует какой-то механизм, стабилизирующий общую организацию хромосомы. В хромосоме существует какой-то структурный порядок, алгоритм взаимодействия компонентов, который инвариантно приводит интерфазную развернутую, деконденсированную хромосому в состояние плотного тела (митотическая хромосома), не меняющего ни своей толщины, ни длины, ни особенностей структуры в бесчисленном ряду клеточных поколений.

Как уже говорилось, для изучения ультраструктуры хромосом широко применяется метод получения целых выделенных митотических хромосом с помощью гипотонических воздействий на клетки. На таких препаратах видно, что в состав хромосом входят 25–30 нм элементарные фибриллы. Однако уловить характер их укладки, какой-либо порядок в их расположении не удастся. Хромосомы в этом случае имеют вид тел, состоящих как бы из перепутанных изгибающихся фибрилл, или, по образному выражению одного из цитологов, напоминают результат аварии на макаронной фабрике.

На препаратах таких выделенных и распластанных хромосом нет реальной возможности выяснить, из какого числа нитей состоит хромосома, тем более проследить путь и порядок укладки одной нити от начала до конца, если бы она была основой хромосомы. Более того, процесс выделения хромосом приводит к изменению их структуры. Легко видеть в световом микроскопе, что перенос живых делящихся клеток в гипотонические растворы приводит к резкому набуханию их хромосом. Хромосомы при этом плохо различимы, они увеличиваются в объеме, становятся менее оптически плотными. В целом митотические хромосомы в этих условиях ведут себя так же, как препараты выделенного хроматина, — набухают, переходят в менее конденсированное состояние. Такое воздействие на них гипотонической среды приводит к потере субструктуризации хромосомы.

Однако о том, что такая субструктуризация существует, говорит масса фактов не только электронно-микроскопических, но и полученных с помощью светового микроскопа. Вся совокупность морфологических и биохимических данных должна быть учтена при воссоздании трехмерной организации митотических хромосом.

В 1970-х гг. удалось уловить общий принцип структурной организации митотической хромосомы. Было обнаружено, что хромосомы не теряют своей



**Рис. 7.5.** Латеральные петли ДНК и осевые компоненты метафазной хромосомы после полной экстракции гистонов

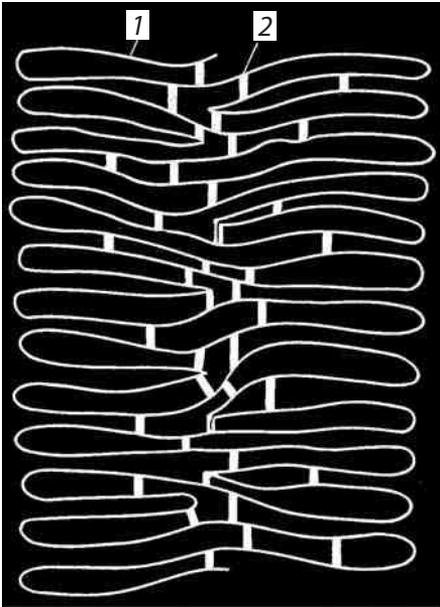
морфологической целостности, не распадаются даже при резком набухании, вызванном удалением всех гистонов. Это достигается обработкой выделенных хромосом растворами полианионов, декстран-сульфата и гепарина. В этом случае хромосомы настолько деконденсируются, что перестают быть видны в фазово-контрастном микроскопе. При добавлении же флуорохрома, связывающегося с ДНК (этидий бромид), было видно, что сильно набухшие хромосомы не разваливались, а значительно (до 4 раз) увеличивались в длину и ширину. Та-

кие сильно набухшие, лишенные гистонов, хромосомы помещали на подложку и рассматривали в электронный микроскоп.

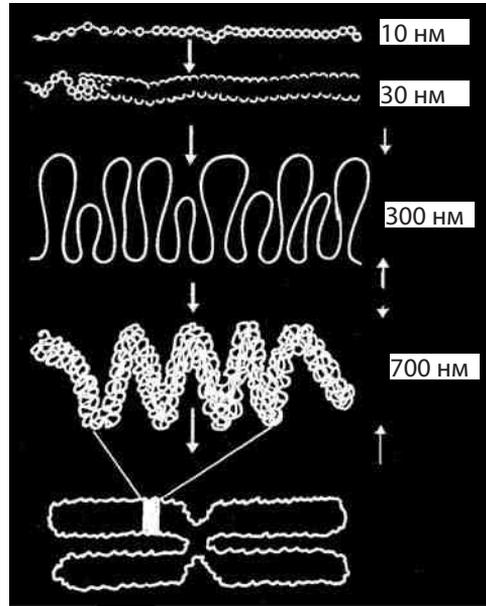
Оказалось, что набухшие хромосомы состоят из двух компонентов: из рыхлой сети плотных фибрилл в центральных участках (хромосомный остов — скэф-фолд), повторяющих контуры метафазных хромосом (осевые компоненты), и из многочисленных длинных тонких петель, отходящих от них в поперечном направлении (рис. 7.5). Была показана белковая природа осевых компонентов и ДНК в составе петель. Средний размер боковых петель составлял около 30 мкм. Если такие препараты обработать ДНКазой, то можно получить белковые остовы и анализировать их состав. Оказалось, что в них присутствует около 20 белков негистоновой природы, сходных с белками ядерного матрикса. Исходя из этого, была предложена модель структурной организации митотических хромосом. В ее основе лежит принцип поперечного расположения петель ДНК вдоль белковой осевой структуры. В принципе этот тип организации митотической хромосомы очень напоминает хромосомы типа «ламповых щеток», встречающихся в процессе мейоза.

Петлевое расположение ДНК вдоль хромосомы получило в дальнейшем целый ряд подтверждений. Однако при разных способах депротенинизации кроме петель в периферии набухших хромосом можно было выявить и розеткоподобные структуры, состоящие из ДНК.

В последнее время получены данные о том, что осевые структуры могут представлять собой артефакт, получившийся в результате монтажа и высушивания дегистонизированных хромосом на подложке. На самом же деле в теле хромосомы существуют негистоновые белковые связки (скрепки), сшивающие основания боковых петель ДНК, но эти связки, разбросанные рыхло по объему хромосомы (рис. 7.6). Как бы то ни было, принцип петлевой поперечной укладки ДНК в теле хромосомы очень важен для понимания ее общей ультраструктурной организации.



**Рис. 7.6.** Схема возможного расположения петель ДНК (1) и белковых «скрепок» (2), связь между которыми определяет параметры хромосом



**Рис. 7.7.** Схема уровней организации хроматид (по Альбертсу и др. 1994)

Необходимо подчеркнуть, что на поперечных и продольных сечениях митотических хромосом, фиксированных в нативном состоянии внутри клеток, никаких центральных или осевых элементов не обнаружено. Они выявляются только после удаления из выделенных хромосом всего набора гистонов, чему предшествует изоляция хромосом в гипотонической среде.

На основании этих наблюдений широкое распространение нашла хроматидная схема, объясняющая общую структуру митотической хромосомы (рис. 7.7). По этой схеме первым уровнем компактизации ДНК является нуклеосомная фибрилла толщиной 10 нм, где вокруг одной нуклеосомы оборачивается 146 п.н. ДНК с коэффициентом компактности равным 6–7 (к.к. 6–7); второй уровень — 30 нм фибрилла-соленоид (к.к. 40); третий уровень — петлевой домен, 60 т.п.н. на петле в 0,2–0,3 мкм (к.к. 680). Далее отрезок примерно с 18–20 петлевыми доменами образуют вокруг осевого элемента хромосомы один виток диаметром 0,7–0,8 мкм (толщина хроматиды) с коэффициентом компактизации  $12 \cdot 10^4$ . Такой виток из петлевых доменов может представлять собой минимального размера бэнд, а набор из нескольких витков — средний бэнд.

По другим представлениям можно предположить, что петле ДНК, выявляемой на хромосомах, лишенных гистонов, соответствует хромомер, промежуточным этапом деконденсации которого является розеткоподобная структура ДНП.

Важно отметить, что хромомерные участки ДНП встречаются и в интерфазных ядрах (там они называются хромоцентрами). Оказалось, что порядок их

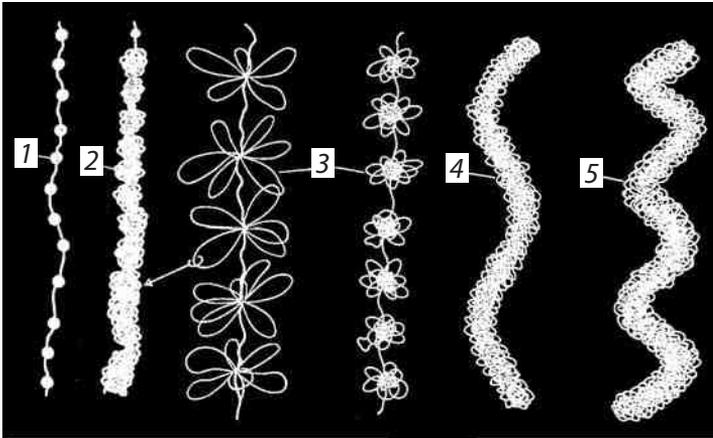


Рис. 7.8. Схема различных уровней компактизации хроматина:

1 — нуклеосома; 2 — нуклеомер, «сверхбусина»; 3 — хромомер, петлевой домен; 4 — хромонема; 5 — хроматида

деконденсации такой же, что и в митотической хромосоме: из хромоцентров возникают розеткоподобные структуры с петлями ДНП по их периферии.

Итак, можно несколько иначе оценить некоторые этапы компактизации ДНК, которые приводят в конце концов к построению плотного тела митотической хромосомы (рис. 7.8).

Первый уровень — **нуклеосомный** — образует сверхскручивание ДНК по поверхности гистоновой сердцевины. Второй — **нуклеомерный** (сверхбусина), где идет объединение 8–10 нуклеосом в виде глобулы. Так как все эти уровни компактизации происходят на огромных линейных молекулах ДНК, то ряд сближенных нуклеомеров и образует 20–30-нанометровую фибриллу ДНП. Третий уровень — **хромомерный**: петли фибрилл ДНП, объединенные скрепками из негистоновых белков, образуют компактные тела, которые при искусственной деконденсации дадут розетковидные структуры. Расположение петлевых доменов, хромомеров, может быть неравномерным; участки тела митотической хромосомы, обогащенные ими, могут соответствовать «бэндам» или сегментам при дифференциальной окраске хромосом. Четвертый уровень — **хромонемный**: сближенные в линейном порядке хромомеры образуют толстые (0,1–0,2 мкм) хромосомные нитчатые структуры, которые можно уже наблюдать и в световом микроскопе. Характер упаковки этой нити в теле хроматиды еще недостаточно выяснен; возможна спиральная укладка хромонемы, но не исключено образование ею и еще одного уровня петlistых структур.

Конечно, такая общая схема организации митотических хромосом очень неполно отражает особенности строения их специализированных участков, таких как ядрышковый организатор, теломеры и центромеры.

Еще менее ясным представляется сам процесс конденсации хроматина при построении митотических хромосом. Непосредственное участие в специальном типе конденсации хроматина во время митоза принимает целый класс особых белков, принадлежащих к т.н. белкам «структурного поддержания хроматина» (SMC-

белки). Они при переходе клеток в S-фазу индуцируют активацию специальных киназ **белков-когезинов**, которые по мере прохождения синтеза ДНК удерживают реплицированные хроматиды друг около друга (рис. 7.9). Эта связь сохраняется в течение всей профазы и метафазы, где когезины удерживают сестринские хроматиды вплоть до начала анафазы. Другая группа SMC-белков включает в себя комплекс **конденсинов**. Конденсины представляют собой многосубъединичные димерные белковые образования, связывающие отдельные участки хроматина, сближают их друг с другом, делая каждую интерфазную хромосому компактней, уплотняя ее и укорачивая более чем в 50 раз (рис. 7.10).

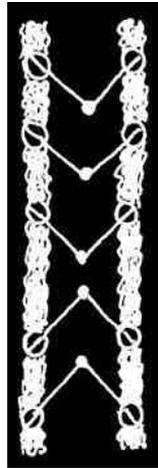


Рис. 7.9. При синтезе ДНК когезины сшивают сестринские хроматиды и удерживают их до анафазы



Рис. 7.10. Конденсины, димерные белковые комплексы, связывают отдельные участки хроматина в процессе конденсации хромосом

# Глава 8

## Ядерные транскрипты и их транспорт

Одна из важнейших функций клеточного ядра — реализация генетической информации в виде синтеза целого ряда РНК или служащих матрицами для синтеза белка, или образующих аппарат белкового синтеза. Синтез РНК на матрицах ДНК хроматина, **транскрипция**, включает образование нескольких типов РНК, с помощью различных РНК-полимераз, ферментов синтезирующих РНК по одной из цепей матричной ДНК. Всего в эукариотических клетках встречается 5 типов РНК (табл. 8).

Информационные РНК, самые разнообразные по величине и по строению нуклеотидных последовательностей, — самые нестабильные по времени их жизни: они синтезируются в большом количестве и быстро деградируют, что обеспечивает смену функциональных активностей клетки. В связи с их быстрой заменой общее число их относительно невелико — 10% от массы всех РНК в клетке. Эти иРНК синтезируются при участии фермента РНК-полимеразы II, которая может образовывать первичную копию РНК с любого гена, кодирующего структуру белка. Дальнейшее созревание этих первичных транскриптов, их значительное укорочение и перестройка (сплайсинг — см. ниже) происходит с помощью особых рибонуклеопротеидных частиц, содержащих малые ядерные РНК (мяРНК). Эти мяРНК синтезируются также с помощью этого фермента, их количество в клетке невелико (5%), но они более стабильны и долгоживущие. К мяРНК относится целая гетерогенная группа РНК, входящая в состав малых РНП-частиц, таких как SRP, теломераза, сплайсосомы и др. (см. ниже). Все остальные клеточные РНК необходимы для создания аппарата белкового синтеза. Рибосомные РНК синтезируются с помощью РНК-полимеразы I, они представляют основную массу клеточных РНК и относительно стабильны. Одна из рибосомных РНК, 5S РНК,

Таблица 8. Типы РНК, их количество, стабильность и ферменты, участвующие в их синтезе

Тип РНК	Количество, %	Количество синтезированных молекул за единицу времени, %	Фермент
иРНК	10	58	РНК-полимераза II
рРНК	50–70	39	РНК-полимераза I
тРНК	25	–	РНК-полимераза III
мяРНК	5	3	РНК-полимераза II, III
митРНК	15	–	РНК-полимераза, сходная с бактериальной

а также 20 трансферных РНК, тоже стабильных, синтезируются с помощью РНК-полимеразы III. Митохондриальные РНК синтезируются в ядре.

Реализация генетической информации, выражающаяся в синтезе разнообразных молекул РНК, должна быть связана с изменением морфологии ядерных компонентов. На светооптическом уровне активация ядерной транскрипции всегда связана с деконденсацией хроматина, с увеличением объема ядрышек, с повышением их базофилии, т.е. с увеличением в них количества РНК. Эти общие признаки увеличения ядерной активности мало что дают для понимания хода молекулярных процессов на уровне реальных ядерных компонентов. Что происходит с участками хроматина, заключающими индивидуальный ген, кодирующий определенный белок, изучать очень трудно, т.к. эти гены в подавляющем большинстве случаев существуют в единичных копиях и проследить в гигантском клубке деконденсированных интерфазных хромосом за работой индивидуального гена чрезвычайно трудно (хотя и возможно).

Относительно более просто эту же задачу можно решить на генах, многократно повторенных в геноме, таких как гены рибосомных РНК, входящих в состав интерфазных ядрышек, основная функция которых — образование рибосом. Изучая ультраструктуру ядрышек и особенности морфологии синтеза рибосомных РНК, впервые удалось с помощью электронного микроскопа визуализировать работающий ген.

## 1. Ядрышко — источник рибосом

В молекулярном отношении ядрышко представляет собой участок линейной молекулы ДНК хромосомы, на котором происходит синтез рибосомной РНК и сборка рибосомных субъединиц.

Внутри интерфазных ядер как при витальных наблюдениях, так и на фиксированных и окрашенных препаратах видны мелкие, обычно шаровидные тельца — ядрышки. В живых клетках они выделяются на фоне диффузной организации хроматина из-за своей светопреломляемости. Последнее свойство связано с тем, что ядрышки — наиболее плотные структуры в клетке. Ядрышки обнаруживаются практически во всех ядрах эукариотических клеток за редким исключением. Это говорит об обязательном присутствии этого компонента в клеточном ядре.

В клеточном цикле ядрышко присутствует в течение всей интерфазы: в профаза по мере компактизации хромосом во время митоза оно постепенно исчезает, и отсутствует в мета- и анафаза, и вновь появляется в середине телофазы, чтобы сохраняться вплоть до следующего митоза, или до гибели клетки.

Еще в 30-х годах рядом исследователей (МакКлинток, Хейтц, Навашин) было показано, что возникновение ядрышек связано топографически с определенными зонами на особых, ядрышкообразующих хромосомах. Эти зоны были названы **ядрышковыми организаторами**, а сами ядрышки представлялись как структурное выражение хромосомной активности.

По данным цитохимических и биохимических исследований основным компонентом ядрышка является белок: на его долю приходится до 70–80% от сухого веса. Такое большое содержание белка и определяет высокую плотность ядрышек. Кроме белка в составе ядрышка обнаружены были нуклеиновые кислоты: РНК (5–14%) и ДНК (2–12%).

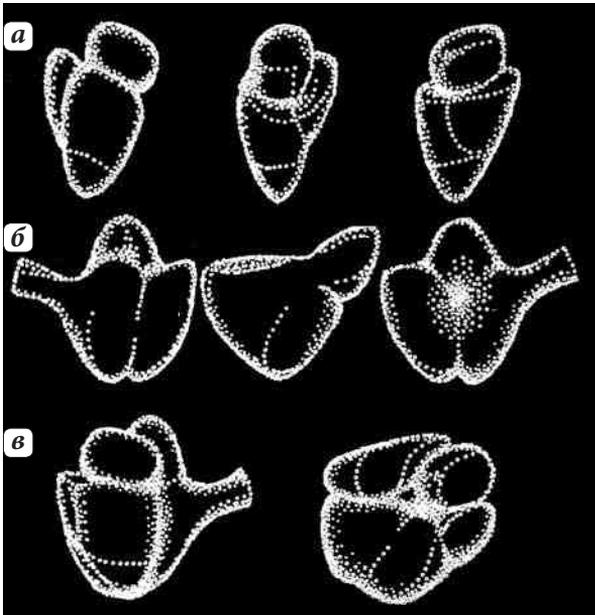
Уже в 50-х годах при изучении ультраструктуры ядрышек в их составе были обнаружены гранулы, сходные по своим свойствам с цитоплазматическими гранулами рибонуклеопротеидной природы, с рибосомами. Следующим этапом в изучении ядрышка было открытие принципиального факта — «ядрышковый организатор» является вместилищем генов рибосомных РНК, а само ядрышко — местом сборки рибосом.

## 2. Строение рибосом

Рибосома представляет собой элементарную клеточную машину синтеза любых белков клетки. Все они построены в клетке одинаково, имеют одинаковую молекулярную композицию, выполняют одинаковую функцию — синтез белка — поэтому их можно так же считать клеточными органоидами. В отличие от других органоидов цитоплазмы (пластид, митохондрий, клеточного центра, мембранной вакуолярной системы и др.) они представлены в клетке огромным числом: за клеточный цикл их образуется  $1 \cdot 10^7$  штук. Поэтому основная масса клеточной РНК представляет собой именно рибосомную РНК. РНК рибосом относительно стабильна, рибосомы могут существовать в клетках культуры ткани в течение нескольких клеточных циклов. В печеночных клетках время полужизни рибосом составляет 50–120 ч.

**Рибосомы** — это сложные рибонуклеопротеидные частицы, в состав которых входит множество молекул индивидуальных (неповторенных) белков и несколько молекул РНК. Рибосомы прокариот и эукариот по своим размерам и молекулярным характеристикам отличаются, хотя и обладают общими принципами организации и функционирования. К настоящему времени методом рентгеноструктурного анализа высокого разрешения полностью расшифрована структура рибосом.

Полная работающая рибосома состоит из двух неравных субъединиц, которые легко обратимо диссоциируют на большую субъединицу и малую. Размер полной прокариотической рибосомы составляет  $20 \times 17 \times 17$  нм, эукариотической —  $25 \times 20 \times 20$  нм. Полная прокариотическая рибосома имеет коэффициент седиментации 70S и диссоциирует на две субъединицы: 50S и 30S. Полная эукариотическая рибосома, 80S рибосома, диссоциирует на 60S и 40S субъединицы. Форма и детальное очертание рибосом из разнообразных организмов и клеток, включая как прокариотические, так и эукариотические, поразительно похожи, хотя и отличаются рядом деталей. Малая рибосомная субъединица имеет палочковидную форму с несколькими небольшими выступами (рис. 8.1). Большая субъединица похожа на полусферу с тремя торчащими выступами. При ассоциации в полную



**Рис. 8.1.** Рибосомы бактерий в разных проекциях:  
**а** — малая субъединица; **б** — большая субъединица; **в** — полная 70S рибосома, вид сверху и сбоку

70S рибосому малая субчастица ложится одним концом на один из выступов 50S частицы, а другим — в ее желобок. В состав малых субъединиц входит по одной молекуле РНК, а в состав большой — несколько: у прокариот — две, у эукариот — 3 молекулы. Характеристики молекулярной композиции рибосом даны в табл. 9.

Таким образом, в состав эукариотической рибосомы входят четыре молекулы РНК разной длины: 28S РНК содержит 5000 нуклеотидов, 18SРНК — 2000, 5,8S РНК — 160, 5SРНК — 120. Рибосомные РНК обладают сложной вторичной и третичной структурой, образуя сложные петли и шпильки

на комплементарных участках, что приводит к самоупаковке, самоорганизации этих молекул в сложное по форме тело. Так, сама по себе молекула 18S РНК в физиологических ионных условиях образует палочковидную частицу, определяющую форму малой субъединицы рибосом.

Для того чтобы образовались рибосомы необходимо наличие четырех типов рибосомных РНК в эквимолярных отношениях и наличие всех рибосомных белков. Сборка рибосом может происходить спонтанно *in vitro*, если последовательно добавлять к РНК белки в определенной последовательности.

**Таблица 9.** Молекулярная характеристика рибосом

Объект	Коэффициент седиментации полной рибосомы и ее субъединиц	Кол-во молекул РНК на субъединицу	Молекулярный вес РНК	Коэффициент седиментации РНК	Кол-во белковых молекул на субъединицу
Рибосомы Прокариот	70S $\begin{cases} \rightarrow 30S \\ \rightarrow 50S \end{cases}$	1	$0,56 \cdot 10^6$	16S	21
		2	$1,2 \cdot 10^6$	23S	34
			$4,0 \cdot 10^4$	5S	
Рибосомы Эукариот	80S $\begin{cases} \rightarrow 40S \\ \rightarrow 60S \end{cases}$	1	$0,6 \cdot 10^6$	18S	Всего Около 80
		3	$1,6 \cdot 10^6$	28S	
			$4,0 \cdot 10^4$	5S	
			$4,5 \cdot 10^4$	5,8S	

### 3. Чем определяется число ядрышек в клетке

Обычно в клетках наблюдается 1–5 ядрышек, причем их количество не строго постоянно даже у одного и того же типа клеток. Более того, в некоторых половых клетках (растущие ооциты) число ядрышек может достигать нескольких сот, т.е. на два порядка выше, чем в соседних соматических клетках. Это — т.н. амплификация ядрышек.

Еще в 30-х годах было сделано предположение, что число ядрышек зависит от числа «ядрышковых организаторов» — особых участков, на которых в телофазе происходит новообразование ядрышек интерфазного ядра. Часто ядрышковые организаторы локализованы во вторичных перетяжках хромосом (образуют вторичные перетяжки хромосом). Так, у человека ядрышковые организаторы расположены в коротких плечах 13, 14, 15, 21 и 22 хромосом (10 на диплоидный набор) (рис. 8.2).

Таким образом, максимальное число ядрышек в разных клетках определяется числом ядрышковых организаторов и увеличивается согласно ploидности ядра: в крупных полиплоидных ядрах всегда количество ядрышек больше.

Локализация ядрышковых организаторов определяется довольно точно на митотических хромосомах с помощью окраски солями серебра, которые имеют специфическое сродство к некоторым ядрышковым белкам. Более точным является определение ядрышковых организаторов с помощью метода молекулярной гибридизации *in situ*. Так, меченная тритием или флуорохромами рРНК при контакте с денатурированной ДНК на препарате митотических хромосом образует

ДНК-рРНК гибрид только в тех местах, где есть последовательности ДНК, комплементарные рРНК.

Чаще всего в клетках количество ядрышек меньше, чем число ядрышковых организаторов. Это связано с тем, что при новообразовании ядрышек они могут сливаться друг с другом в одну общую структуру, т.е. могут объединяться в пространстве интерфазного ядра отдельные ядрышковые организаторы разных хромосом (рис. 8.3). Так, в тканях человека могут встречаться клетки с одним ядрышком. Это значит, что десять ядрышкообразующих участков,

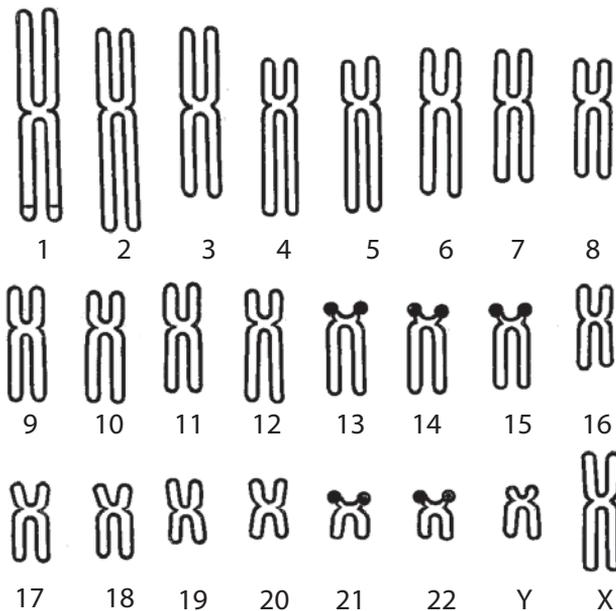


Рис. 8.2. Хромосомы (№№ 13–15, 21, 22) с ядрышковыми организаторами (ЯО) в кариотипе человека



**Рис. 8.3.** В образовании ядрышек может участвовать несколько хромосом с ядрышковыми организаторами (ЯОР)

локусов, диплоидного набора хромосом входят в состав одного ядрышка. Слияние ядрышек друг с другом хорошо показано на живых клетках культуры ткани при цейтраферной киносъемке.

#### 4. Множественность рибосомных генов

При изучении числа ядрышек при различных хромосомных абберациях было найдено, что при разрыве хромосомы на месте вторичной перетяжки ядрышки могут возникать на каждом из фрагментов хромосом. Из этих наблюдений был сделан очень важный вывод (который полностью подтвердился в 60-х годах на молекулярно-биологическом уровне) о том, что ядрышковый организатор представляет собой не точечный локус хромосомы, а является множественным по своей структуре, содержит несколько одинаковых генных участков, каждый из которых отвечает за образование ядрышка.

Методом молекулярной гибридизации было показано, что в составе геномов эукариот рибосомные гены представлены сотнями и тысячами единиц; они принадлежат к фракции умеренно повторяющихся последовательностей ДНК. Даже у бактерий в геноме может быть несколько (6–7) рассеянных по геному идентичных последовательностей, ответственных за синтез рРНК. Общее количество этой фракции ДНК (рДНК) у *E. coli* составляет около 1% от всей ДНК. У эукариотических организмов этот процент может составлять 0,4 — для человека, 1,3 для дрожифилы, 5,5 для пекарских дрожжей. Число же рибосомных генов у эукариот намного больше, чем у прокариотических клеток. В табл. 10 приведены некоторые примеры числа генов рРНК у различных представителей эукариот.

С помощью метода молекулярной гибридизации было проанализировано не только число рибосомных генов, но и их локализация. Из этих экспериментов следовало, что именно зоны ядрышков-ых организаторов содержат рибосомные гены и что у млекопитающих в каждом из этих организаторов содержится

**Таблица 10.** Количество рибосомных генов на гаплоидный набор хромосом

Млекопитающие	Человек	200
	Мышь	100
	Кошка	1000
Птицы	Курица	200
Амфибии	Тритон гребенчатый	4100
	Амфиума	19600
Рыбы	Линь	120
	Лосось	730
	Неоцератод	4800

примерно по 100–1000 генов, т.е. ядрышковые организаторы представляют собой полицистронные участки, содержащие множество одинаковых генов (полиизогенные участки). Следовательно, рибосомные гены собраны вместе в группы или кластеры.

Наблюдать непосредственно порядок расположения рибосомных генов на ДНК выделенных ядрышек с помощью электронного микроскопа удалось на дополнительных ядрышках ооцитов амфибий.

Обычно число генов рибосомных рРНК постоянно на геном, оно не меняется в зависимости от уровня транскрипции этих генов. Так, у клеток с высоким уровнем метаболизма число генов рРНК точно такое же, как и число у клеток, полностью прекративших синтез рибосом. При репликации ДНК в S-периоде происходит и удвоение числа генов рРНК, поэтому их количество коррелирует с пloidностью клетки.

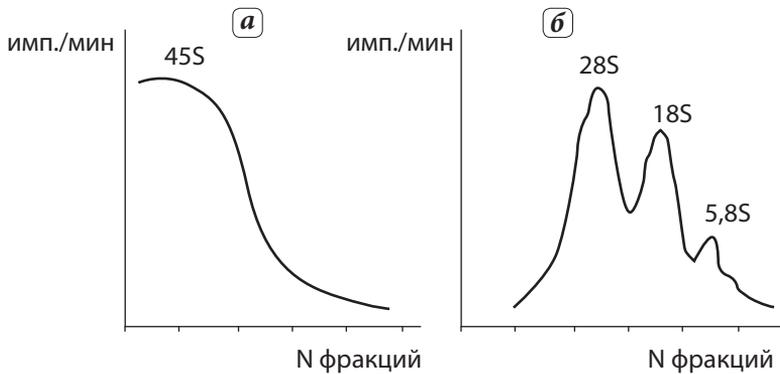
Однако есть случаи, когда гены рРНК подвергаются избыточной репликации. При этом дополнительная репликация генов рРНК происходит в целях обеспечения продукции большого количества рибосом. В результате такого сверхсинтеза генов рРНК их копии могут становиться свободными, экстрахромосомными. Эти внехромосомные копии генов рРНК могут функционировать независимо, в результате чего возникает масса свободных дополнительных ядрышек, но уже не связанных структурно с ядрышкообразующими хромосомами. Это явление получило название **амплификации генов рРНК**. Особенно подробно оно изучено на растущих ооцитах амфибий, хотя встречается как у животных, так и у растений.

Так, у шпорцевой лягушки *X. laevis*, наиболее подробно изученный и популярный объект, амплификация рДНК происходит в профазе I деления созревания, когда синтез хромосомной ДНК давно закончен. В этом случае количество дополнительной амплифицированной рДНК (или генов рРНК) становится в 3000 раз больше того, что приходится на гаплоидное количество рДНК, и соответствует  $1,5 \cdot 10^6$  генов рРНК. Эти сверхчисленные внехромосомные копии и образуют сотни дополнительных ядрышек в растущих ооцитах. В среднем же на одно дополнительное ядрышко приходится несколько сот или тысяч генов рРНК.

Биологический смысл появления сверхчисленных экстрахромосомных ядрышек при росте ооцитов совершенно понятен: для синтеза огромного количества запасных продуктов, которые будут использованы на ранних стадиях эмбриогенеза, необходимо соответственно огромное количество рибосом, которые могут быть в клетке синтезированы на дополнительных матрицах этих многочисленных амплифицированных ядрышек. После периода созревания ооцита при его двух последовательных делениях эти дополнительные ядрышки в состав митотических хромосом не входят, они отделяются от новых ядер и деградируют. Следовательно, амплификация рДНК в ооците — временное явление, не сказывающееся на постоянстве генома.

## 5. Строение и функционирование генов рРНК

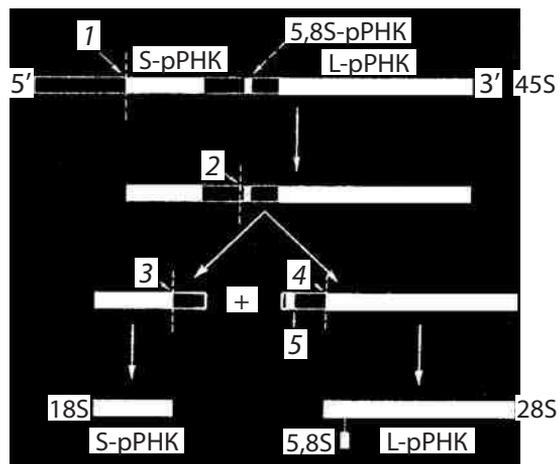
Итак, в ядрышковых организаторах определенных хромосом локализованы места множественных сгруппированных вместе генов рибосомной РНК. Но, как уже



**Рис. 8.4.** Динамика включения  $H^3U$  в рНК:

**а** — синтез предшественника 45S рНК; **б** — последующее распределение метки по пикам 28S, 18S и 5,8S рНК

говорилось, существует 4 типа молекул рибосоной рНК, каждый из которых в полной эукариотической рибосоме представлен один раз. Значит ли это, что для каждой из этих рНК (28S рНК, 18S рНК, 5,8S рНК, 5S рНК) должен существовать отдельный ген, было долгое время неясным. Не понятно было так же, как осуществляется в клетках одновременное сбалансированное образование этих разных рНК. Этот вопрос был решен при исследовании динамики синтеза рибосомных рНК. Было обнаружено, что при использовании импульсной короткой метки среди клеточных рНК находится быстро синтезирующая рНК с высокой скоростью седиментации, тяжелая 45S рНК или предшественник рНК (пре-рНК) (рис. 8.4). Если после появления этой 45S рНК продолжать наблюдать за распределением метки во фракциях рНК, но уже в отсутствие меченых предшественников, то можно видеть, что по мере убывания метки в зоне 45S рНК, она начинает появляться и стабильно накапливаться в зонах 28S, 18S и 5,8S рибосомных рНК. Эти данные говорили о том, что при синтезе рибосомных рНК сначала образуется гигантская молекула-предшественник (45S рНК), которая затем дает начало основным молекулам рибосомной рНК. Было найдено, что молекула 45S рНК содержит около  $13 \cdot 10^3$  оснований, имеет массу около  $4,6 \cdot 10^6$  и может быть длиной 2–5 мкм. Явление распада молекулы 45S рНК на фрагменты, соответствующие размерам 28S, 18S и 5,8S рНК, получил название «*процессинг*», или *созревание*. Во время процессинга происходит разрыв предшественника на три фрагмента и кроме того наблюдается значительная деградация рНК



**Рис. 8.5.** Процессинг 45S рНК: 1–5 — места последовательного расщепления предшественника рибосомных рНК

(около 50%, т.е. 6000 нуклеотидов) (рис. 8.5). Кроме этих данных было вычислено, что молекула 5S РНК синтезируется независимо от 45S РНК и локализация гена 5S рРНК не связана с ядрышковым организатором.

Почти одновременно с получением этих биохимических данных О. Миллеру (1969) удалось с помощью электронного микроскопа увидеть работающие рибосомные гены. Для этого под световым микроскопом выделялись не связанные с хромосомами амплифицированные ядрышки из ооцитов шпорцевых лягушек. Эти ядрышки подвергались разрыхлению в растворах с низкой ионной силой и помещались на сеточки для электронной микроскопии. После оттенения металлом препараты изучали в просвечивающем электронном микроскопе.

На таком препарате были видны сложно изогнутые и перепутанные длинные осевые молекулы ДНК, на которых через равные промежутки располагались фибриллярные зоны, имеющие вид «елочек». Длина фрагмента ДНК, занятого такой «елочкой» была постоянной и равнялась около 5 мкм (рис. 8.6). На этом отрезке располагалось около 100 плотных гранул величиной около 20 нм, от каждой из которых отходила в сторону тонкая изогнутая нить. Величина такой нити была минимальной на одном конце такого отрезка и максимальной на другом. Эти извитые латеральные нити и образовывали структуру типа «елочки».

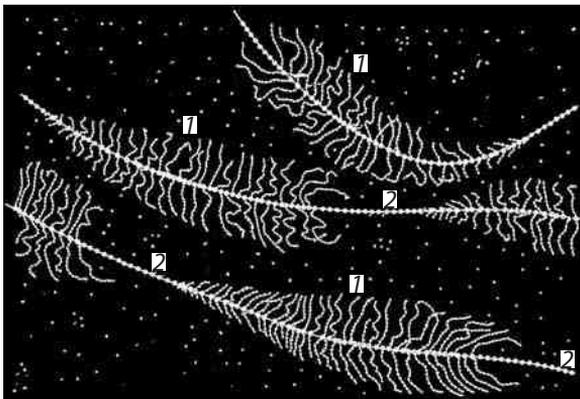


Рис. 8.6. Рибосомные транскрипты в выделенных амплифицированных ядрышках, в препарате по О. Миллеру:

1 — транскрибируемый участок (р-ген); 2 — спейсеры

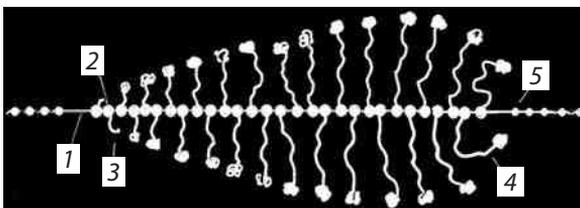


Рис. 8.7. Строение транскрипционной единицы рРНК:

1 — ДНК р-гена; 2 — РНК-полимераза; 3 — начальные транскрипты; 4 — конечные транскрипты (45S РНК); 5 — нуклеосомы спейсера

и образовывали структуру типа «елочки». Было доказано, что крупные гранулы на нити ДНК представляют собой молекулы РНК-полимеразы I, ответственной за синтез рРНК, а боковые изогнутые нити — транскрипты, состоящие из синтезируемых молекул РНК. Самые длинные транскрипты находились на одном конце «елочки», соответствовали 45S предшественнику рРНК. Следовательно, синтез рРНК начинался на конце отрезка с короткими боковыми нитями и заканчивался на участке с длинными нитями РНК. Такой участок ДНК, на котором были видны молекулы рРНК в процессе их удлинения, получил название *транскрипционной единицы* (рис. 8.7). Между транскрипционными единицами располагались участки ДНК, лишённые гранул РНК-полимеразы I и транскриптов. Это — зоны т.н. *спейсеров*, которые не транскрибируются, и, более того, на таких

препаратах они имеют нуклеосомное строение, тогда как транскрипционные единицы свободны от нуклеосом. Длина боковых фибрилл была в 5–10 раз короче, чем 45S РНК, из-за того, что эта новосинтезированная РНК связана с белками, образуя рибонуклеопротеидный тяж, предшественник рибосом.

В состав транскрипционной единицы входит весь ген за исключением спейсерного участка. Такая структура рибосомного гена практически одинакова для всех эукариотических организмов. Вариабельны как нетранскрибируемые (спейсерные) участки, так и транскрибируемые вставки, которые не входят в состав зрелых рРНК.

Итак, три основные молекулы рРНК синтезируются на одной транскрипционной единице. Что же касается молекулы 5S рРНК, то она к этому гену никакого отношения не имеет: 5S рРНК синтезируется на отдельных генах, локализованных не в зонах ядрышковых организаторов, даже на совсем иных хромосомах при участии РНК-полимеразы III. Так, у человека основная масса генов 5S рРНК находится на I хромосоме, более мелкие кластеры — на 9 и 16 хромосомах. Гены 5S рРНК, тоже множественные, также собраны в кластеры, но их число выше, чем у остальных генов рРНК. Так, у человека их насчитывается до 2000. Транскрипция рРНК идет с помощью двух ферментов: РНК-полимеразы I, которая участвует в синтезе 45S предшественника рРНК (пре-рРНК) и РНК-полимеразы III, ответственной за синтез 5S рРНК. Матрицей для синтеза рРНК по определению должна быть ядрышковая ДНК.

Первичные транскрипты (морфологически представлены в виде латеральных филаментов на «елочках», образующихся на активных транскрипционных единицах) прогрессивно увеличиваются в длину по мере прохождения РНК-полимеразы I вдоль всего транскрипционного участка гена, начиная с точки начала репликации до терминального участка. Скорость роста цепи пре-рРНК составляет около 20–30 нуклеотидов/с, т.е. весь синтез 45S рРНК занимает около 5–10 мин.

На каждой транскрипционной единице располагается множество (50–100) молекул РНК-полимеразы I, тем самым на каждом гене одновременно происходит синтез множества молекул пре-рРНК, которые находятся на разных стадиях роста полинуклеотидной цепи. Максимальной величины пре-рРНК достигает вблизи терминального участка, где ее молекулярный вес достигает  $4,5 \cdot 10^6$  Д (для млекопитающих), а длина должна соответствовать 5,2 мкм. На самом же деле длина латерального транскрипта в 5–10 раз короче этой величины. Это связано с тем, что по мере роста транскрипта он связывается сразу же с белками, образуя в конечном участке транскрипции рибонуклеопротеид с коэффициентом седиментации 80S. Такие 80S рРНК составляют до 20% от всех РНК ядрышка. Большая часть белков, которые связываются с 45S РНК, являются белками, входящими в состав малой и большой субъединиц зрелых рибосом. Таким образом, уже на уровне незрелой гигантской молекулы пре-рРНК происходит специфическое связывание с рибосомными белками: около 50% белков большой субъединицы и около 30% малой субъединицы связываются с пре-рРНК во время ее синтеза или вскоре после него. Такая связь 45S РНК с белками и приводит к тому, что латеральные транскрипты имеют толщину около 10 нм (после оттеснения металлами), на их свободном конце часто наблюдается крупная гранула (30 нм), что может указывать на высокую степень компактизации РНК и белка на 5'-конце цепи РНК.

Распад 45S РНК на более короткие отрезки, явление созревания рРНК или **процессинг**, происходит после завершения транскрипции. Ферментативный механизм этого явления еще до конца не ясен, в нем принимает участие эндо- и экзонуклеазы. При этом происходит последовательное расщепление пре-рРНК на фрагменты и частичная деградация участков РНК на этих фрагментах. В результате процессинга пре-рРНК примерно 50% нуклеотидов первично синтезированной молекулы отщепляется (мол. масса 45S РНК составляет  $4,6 \cdot 10^6$  Да, а суммарный мол. вес зрелых рРНК — около  $2,2 \cdot 10^6$  Да).

Таким образом, в ядрышке локализуются следующие основные предшественники рибосом:

1. Транскрипты рРНК в процессе их роста;
2. 80S РНП, содержащие 45S РНК, они могут составлять до 10–20% всех РНП ядрышка;
3. 55S РНП, предшественники большой субъединицы, могут составлять до 70–80% всех РНП ядрышка; время созревания большой рибосомной субъединицы занимает около 1 ч;
4. Незрелые малые (40S РНП) субъединицы рибосом, быстро (за 15–30 мин) покидающие ядрышко.

В интенсивно функционирующих ядрышках происходит синтез огромного числа рибосом: 1500–3000 штук в минуту. Поэтому в ядрышке насчитывается около  $5 \cdot 10^4$  предшественников рибосом.

## 6. Ультраструктура ядрышка

О тонком строении ядрышка сведения были получены главным образом методом электронной микроскопии. Световая микроскопия давала ограниченный набор сведений о структуре ядрышка из-за их малого размера (1–5 мкм) и недостаточной разрешающей способности данного метода. Гистохимически в ядрышках выявлялась РНК, но не ДНК. ДНК в ядрышках выявлялась лишь в периферической их зоне в виде т.н. **околяядрышкового хроматина**, который мог прилежать к одной из сторон ядрышка, окружать его кольцом или вообще отсутствовать. Считалось, что околяядрышковый хроматин представляет собой гетерохроматиновые зоны. Кроме того, было найдено, что ядрышки имеют некоторое сродство к солям серебра, обладают аргентофилией, могут восстанавливать серебро из различных растворов (нитрат серебра, «аммиачное серебро», протеинаты серебра). При этом происходит отложение темных осадков исключительно в ядрышках интерфазных клеток, а также в ядрышковых организаторах на митотических хромосомах при делении клетки.

Первые электронномикроскопические работы показали, что ядрышки самых различных объектов, несмотря на разнообразие, построены из одинаковых компонентов: гранулярного и фибриллярного (рис. 8.8). При этом гранулы в составе ядрышек имели размеры 15–20 нм. Кроме гранул в составе ядрышек обнаружили зоны скопления тонких (3–5 нм) фибрилл — диффузная часть ядрышек. Взаимное расположение гранулярных и фибриллярных зон в ядрышке может быть различным. Так,

в некоторых случаях, фибриллярный компонент занимает центральную часть ядрышка в виде однородного образования или в виде нескольких (3–5) отдельных зон (рис. 8.9).

Обычно **гранулярный компонент** (ГК) расположен на периферии ядрышка, но встречаются случаи, когда фибриллярный и гранулярный компонент распределены в ядрышке равномерно. Часто в структуре ядрышек фибриллярно-гранулярные компоненты образуют нитчатые структуры, **нуклеолонемы** (ядрышковые нити), толщиной около 100–200 нм.

Эти нуклеолонемы при достаточном контрастировании могут быть видны даже в световом микроскопе. Ядрышковые нити или нуклеолонемы также неоднородны по своему строению: в них кроме гранул 15 нм входит множество тонких фибрилл, которые могут образовывать в нуклеолонемах отдельные сгущения.

Неоднородной оказалась структура и диффузного, фибриллярного компонента. Было найдено, что практически во всех типах ядрышек как животных, так и растительных объектов встречаются т.н. **фибриллярные центры** (ФЦ), участки скопления фибрилл с низкой электронной плотностью, окруженные зоной фибрилл более высокой электронной плотности — **плотный фибриллярный компонент** (ПФК).

В составе ядрышка есть белковый остов, матрикс. На ультратонких срезах необработанных ядрышек матрикс не выявляется в виде отдельного компонента, но если экстрагировать из ядрышек РНК, ДНК и белки, связанные с ними, то можно видеть, что ядрышко как таковое не распадается, не теряет своей общей формы. После таких обработок структура остаточного ядрышка представлена рыхлой фибриллярной сетью, заполняющей объем ядрышка.

Таким образом, в структуре ядрышек можно различить следующие пять компо-

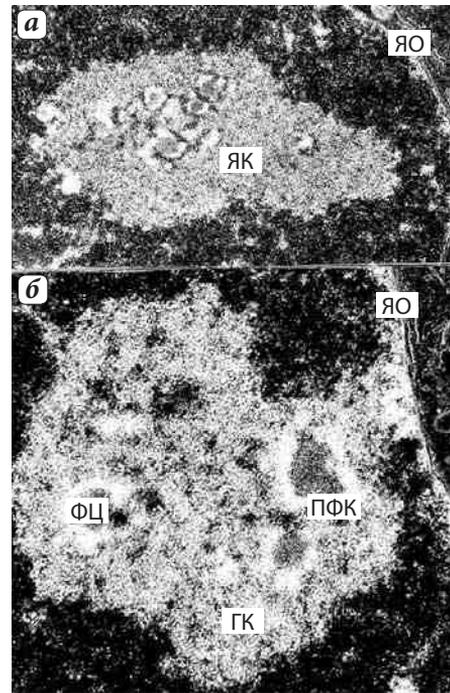


Рис. 8.8. Ультраструктура ядрышка клеток культуры СПЭВ:

**а** — малое увеличение; **б** — большое увеличение; ЯО — ядерная оболочка; ЯК — ядрышко; ГК — гранулярный компонент; ФЦ — фибриллярный центр; ПФК — плотный фибриллярный компонент (фото О.В. Зацепиной)

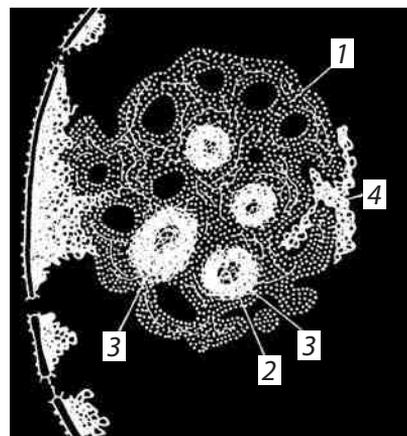


Рис. 8.9. Схема компонентов ядрышка:

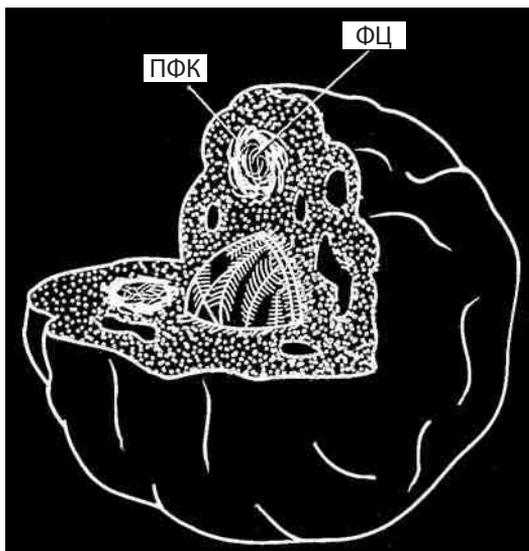
1 — гранулярный компонент (нуклеолонема); 2 — фибриллярные центры; 3 — плотный фибриллярный компонент; 4 — околядрышковый хроматин

нентов: гранулярный, фибриллярные центры, плотный фибриллярный компонент, хроматин, белковый сетчатый матрикс.

Каким же образом распределены внутри ядрышек рДНК, рРНК и белки, где располагаются матрицы для синтеза рРНК, где первичные транскрипты, где предшественники рибосом, зрелые рибосомы — все эти вопросы были решены с применением самых разнообразных молекулярно-биологических и цитологических методов.

Так, при короткой пульсовой метке тритированным уридином ( $^3\text{H}$ -уридин), первые следы мечения обнаруживались сначала (через 1–15 мин) в плотном фибриллярном компоненте (ПФК), а затем (до 30 мин) меченым оказывался гранулярный компонент (ГК). Важно отметить, что в фибриллярных центрах (ФЦ) метка не обнаруживалась. Из этого наблюдения был сделан вывод, что 45S пре-рРНК синтезируется в области плотного фибриллярного компонента, а гранулярный компонент ядрышка соответствует прерибосомным частицам (55S-, 40S РНП).

Оставался открытым вопрос о природе фибриллярных центров, окруженных плотными РНК-содержащими фибриллами. Было обнаружено с помощью различных методов (специфическое окрашивание с помощью осмий-амин, ДНКазы, меченной золотом, связыванием меченого актиномицина, прямой молекулярной гибридизацией с меченой рДНК), что в составе фибриллярных центров находится ДНК, ответственная за синтез рРНК. Зоны фибриллярных центров отличаются от остального хроматина тем, что состоят из тонких хроматиновых фибрилл, значительно обедненных гистонами Н1.



**Рис. 8.10.** Трехмерная реконструкция ядрышка и одного фибриллярного центра. Транскрипты рРНК соответствуют плотному фибриллярному компоненту (ПФК), рДНК, «спейсеры» и неактивные цистроны расположены внутри фибриллярного центра (ФЦ)

Эти исследования позволили связать друг с другом данные молекулярной организации транскрибируемых рибосомных генов с данными морфологии ядрышек и выяснить топологию в объеме ядрышка процесса синтеза рибосомной РНК и образования рибосом.

По одной из моделей, в фибриллярных центрах расположены неактивные рибосомные гены и, возможно, спейсерные участки. Транскрипция пре-рРНК происходит по периферии фибриллярных центров, где плотный фибриллярный компонент и представляет собой 45S пре-рРНК, располагающиеся в виде «елочек» на деконденсированных участках рДНК (рис. 8.10). После завершения транскрипции 45S РНК теряет связь с транскрипционной единицей на ДНК в зоне плотного

фибрилярного компонента, каким-то еще непонятным образом переходит в гранулярную зону, где и происходит процессинг рРНК, образование и созревание рибосомных субъединиц.

Строение и химические характеристики ФЦ оказались практически одинаковыми с таковыми ядрышковых организаторов митотических хромосом. И те и другие построены из тесно ассоциированных фибрилл, толщиной 6–10 нм; и те и другие обладают характерной особенностью — окрашиваться солями серебра, что зависит от наличия особых ядрышковых белков, содержат РНК-полимеразу I.

Однако число ФЦ в интерфазных ядрышках не соответствует числу ядрышковых организаторов в митозе. Так в клетках культуры СПЭВ число ФЦ может быть в 2–4 раза выше, чем число ядрышковых организаторов (табл. 11).

Более того, количество ФЦ возрастает по мере увеличения ploидности клетки ( $G_2$ , 4n) и транскрипционной ее активности. При этом уменьшается величина каждого отдельного фибриллярного центра. Однако суммарные объемы ФЦ при пересчете на гаплоидный хромосомный набор остаются постоянными в интерфазе, но превышают это число вдвое по сравнению с метафазой. Другими словами при активации синтеза рРНК наблюдается такое изменение числа ФЦ и их размеров, которое может говорить о какой-то фрагментации исходных ФЦ.

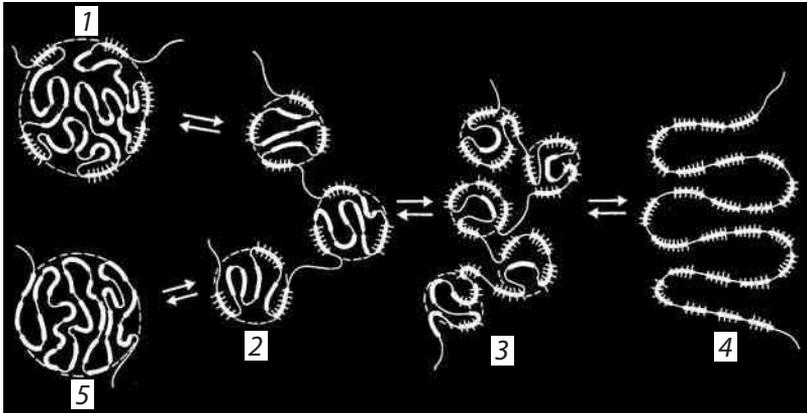
Противоположная картина наблюдается при затухании синтетических процессов в дифференцирующихся клетках эритроидного ряда мышей (табл. 12). При этом видно, что в размножающихся и активно синтезирующих гемоглобин проэритробластах количество фибриллярных центров зависит от ploидности клетки (88 в  $G_1$ -фазе, 118 в  $G_2$ -фазе клеточного цикла), размер индивидуальных ФЦ изменяется мало. После прекращения размножения этих клеток и падения их

**Таблица 11.** Количество ядрышек (ЯК), фибриллярных центров (ФЦ) в  $G_0$ - и  $G_2$ -периодах и во время клеточного цикла

Период	Среднее число ЯК	Среднее число ФЦ	Общий объем ЯК, мкм <sup>3</sup>	Общий объем ФЦ, мкм <sup>3</sup>	Средний объем одного ФЦ, мкм <sup>3</sup>
$G_0$ -период	2,3	7	8,05	0,212	0,033
$G_2$ -период	2,3	33,7	23,43	0,430	0,014
Митоз	–	6-8	–	0,2	0,025

**Таблица 12.** Количество фибриллярных центров (ФЦ) и значения их размеров при эритропоэзе в печени зародышей мыши

Стадия дифференцировки	Средний объем ядрышек, мкм <sup>3</sup>	Среднее кол-во ФЦ	Средний диаметр ФЦ, мкм <sup>3</sup>	Суммарный объем ФЦ, мкм <sup>3</sup>
Проэритробласт (2 с ДНК)	17,7	88	0,2	0,369
Проэритробласт (4 с ДНК)	29,4	118	0,23	0,749
Базофильный эритробласт (2 с ДНК)	4,5	8	0,35	0,170
Полихроматофильный эритробласт (2 с ДНК)	0,5	4,3	0,4	0,110
Нормобласт (2 с ДНК)	0,102	2,7	0,42	0,102



**Рис. 8.11.** Схема активации и инактивации ядрышкового организатора:

1 — начало активации — «елочки» появляются по периферии одного крупного ФЦ (ЯОР — хромосомы); 2,3 — дальнейшая активация приводит к образованию множественных ФЦ; 4 — полная активация; 5 — полная инактивация

синтетической активности резко меняются параметры ядрышка. Их объем, уже начиная со стадии базофильного эритробласта, уменьшается в 4–5 раз, а на конечной стадии дифференцировки (нормобласт) — в сотню раз. При этом резко падает число ФЦ (10–40 раз) и возрастает объем почти в 10 раз величины отдельного фибриллярного центра.

Исходя из этих наблюдений, можно так представить общую схему активации и инактивации ядрышка на примере одного ядрышкового организатора (рис. 8.11).

В неактивной форме ядрышковый организатор представлен в виде одного крупного фибриллярного центра, включающего в себя компактно уложенную часть цепи хромосомной ДНК, несущей тандемно расположенные рибосомные гены (транскрипционные единицы). В начале активации ядрышка происходит деконденсация р-генов на периферии такого фибриллярного центра, эти р-гены начинают транскрибироваться, на них образуются РНП-транскрипты, которые при созревании дают начало появлению гранул — предшественников рибосом по периферии активированного ядрышка. По мере усиления транскрипции единый фибриллярный центр как бы распадается на ряд более мелких фибриллярных центров, связанных друг с другом полностью декомпактизованными участками рДНК. Чем выше транскрипционная активность ядрышка, тем больше число мелких, связанных друг с другом фибриллярных центров, окруженных плотным фибриллярным компонентом (ПФК), содержащим 45S рРНК. При полной активации ядрышка все мелкие фибриллярные центры деконденсируются; в этом случае зоны плотного фибриллярного компонента содержат всю рДНК, находящуюся в активном состоянии. Такая структура наблюдается у амплифицированных ядрышек растущих ооцитов. В случае инактивации ядрышка происходит постепенная конденсация рДНК, снова образуются фибриллярные центры, они объединяются друг с другом, величина их растет параллельно уменьшению доли ПФК.

При полной инактивации, как в случае нормобластов, ядрышко представлено одним крупным (4–5 мкм) сферическим ФЦ, без сопутствующего транскрипции

ПФК: оно окружено зоной конденсированного хроматина. Такое инактивированное ядрышко сходно по своим структурным особенностям с ядрышковым организатором в составе митотических хромосом.

## 7. Структурно-функциональные типы ядрышек

Приведенные выше описания дают основу для понимания разнообразия строения ядрышек в клетках с соответствующим уровнем синтеза рРНК. Однако кроме различной степени выраженности гранулярного и фибриллярных компонентов существуют и иные варианты структурной организации ядрышек. Обычно различают несколько структурных типов ядрышек: ретикулярный, или нуклеолонемный, компактный, кольцевидный, остаточный (покоящийся), сегрегированный (рис. 8.12).

Ретикулярный тип ядрышка наиболее характерен для большинства клеток, для него свойственно нуклеолонемное строение, обилие гранул и фибриллярного плотного материала. Во многих случаях фибриллярные центры выявляются плохо, вероятно из-за высокого уровня транскрипции. Этот тип ядрышек встречается в клетках животных и растений.

Компактный тип ядрышка отличается от предыдущего меньшей выраженностью нуклеолонемы, большей частотой встречаемости фибриллярных центров. Такие ядрышки характерны для активно размножающихся клеток (клетки опухолей, клетки культуры ткани и др.). Вероятно, что оба эти типа могут переходить друг в друга, во всяком случае, они чаще всего встречаются в клетках с высоким уровнем синтеза РНК и белка.

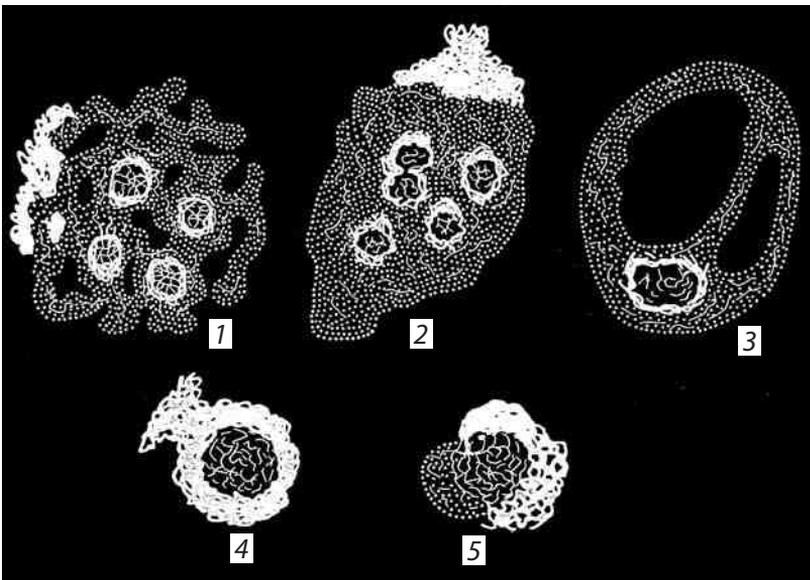


Рис. 8.12. Структурные типы ядрышек:

1 — ретикулярный; 2 — компактный; 3 — вакуолярный; 4 — кольцевидный; 5 — сегрегированный

Кольцевидные ядрышки встречаются в клетках животных. В световом микроскопе они имеют форму кольца с оптически светлой центральной зоной — это фибриллярный центр, окруженный РНП-фибриллами и гранулами. Размер этих ядрышек составляет около 1 мкм. Типичные кольцевидные ядрышки характерны для лимфоцитов, эндотелиоцитов, т.е. для клеток с относительно низким уровнем транскрипции.

Остаточные ядрышки характерны для клеток полностью потерявших способность к синтезу рРНК (нормобласты, дифференцированные энтероциты, клетки шиповатого слоя кожного эпителия и др.). Часто они настолько малы и так окружены конденсированным хроматином, что с трудом обнаруживаются в световом микроскопе. В ряде случаев они могут снова активироваться и переходить в компактную или ретикулярную форму.

Сегрегированные ядрышки характерны для клеток, обработанных различными антибиотиками или химическими веществами, вызывающими прекращение синтеза рРНК (актиномицин Д, амфотерицин и др.), а также антибиотиками, влияющими на синтез ДНК и белков (митомицин, пурамицин, многие канцерогены и т.д.). Термин «сегрегация» используется в данном случае в связи с тем, что происходит как бы разделение, обособление разных компонентов ядрышек, сопровождающиеся прогрессивным уменьшением его объема. При этом обособляются друг от друга крупные фибриллярные центры и гранулярно-фибриллярный компонент.

При некрозе в процессе кариолизиса ядрышки набухают и исчезают.

## 8. Белки ядрышек

До 60% сухого веса выделенных ядрышек приходится на белки, число которых может составлять несколько сот разных видов. Помимо белков ассоциированного с ядрышками хроматина в состав ядрышек входят белки рибосом и специфические ядрышковые белки, связанные с транскрипцией рибосомных генов, с процессингом 45S рРНК, такие как РНК-полимераза I, факторы транскрипции, топоизомеразы, метилазы, нуклеазы, протеинкиназы, фосфатазы. Часть ядрышковых белков имеет родство к серебру — аргентофильные белки: РНК-полимераза I, фактор транскрипции UBF, нуклеолин (С-23), нуклеофозмин (ньюматрин или В-23).

Аргентофилия характерна для белков, обогащенных сульфгидрильными, дисульфидными связями. Как уже указывалось, четкой аргентофилией обладают интерфазные ядрышки и зоны ядрышковых организаторов на митотических хромосомах.

Собственно ядрышковые белки расположены в специфических местах их активности. Так РНК-полимераза I и фактор транскрипции рРНК UBF располагаются в фибриллярных центрах (ФЦ) и/или в плотном фибриллярном компоненте (ПФК) (рис. 8.13).

Аг-фильным является также белок с мол. весом 195 кДа, представляющий собой большую субъединицу РНК-полимеразы I, участвующую в синтезе рРНК. Этот

белок локализуется в зоне фибриллярных центров, по их периферии. На плоскостных препаратах ядрышек аргентофилией обладают участки над осевой частью «елочек», непосредственно над расположением гранул РНК-полимеразы I. Кроме того, с помощью иммуноморфологических методов РНК-полимераза I обнаруживается в зоне ядрышковых организаторов митотических хромосом. Это обстоятельство не противоречит данным о том, что во время митоза транскрипция полностью прекращается. Вероятно, что во время митоза гены, нагруженные неактивной РНК-полимеразой I, переносятся вместе с нею в области ядрышковых организаторов из одной клеточной генерации в другую.

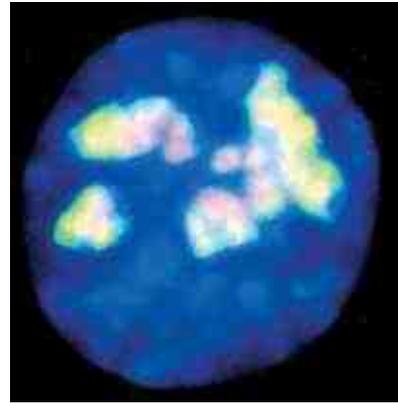


Рис. 8.13. Иммунофлуоресцентное выявление в ядрышке специфических белков

Специфический для ядрышек белок **фибрилларин** (В-36, м.в. 34 кДа) располагается в ПФК, где он осуществляет процессинг пре-рРНК в комплексе с другими РНП, в состав которых входит U3 мяРНК, необходимая для начального этапа процессинга 45S рРНК. Фибрилларин обнаруживается также в остаточных ядрышках — в «ядрышковом матриксе».

Белок С23 (110 кДа) или «нуклеолин» локализуется в зоне плотного фибриллярного компонента и в фибриллярных центрах ядрышек, но также и в зонах ядрышковых организаторов митотических хромосом. Следовательно, он обнаруживается как на транскрибируемых, так и на неактивных участках рибосомных генов. В препаратах распластанных ядрышек он обнаруживается над транскрипционными единицами («елочками»), он обнаружен во фракциях, содержащих предшественники рибосом. Функции его до конца не ясны, хотя стало известно, что белок С23 может играть важную структурную роль в процессе транскрипции: он своим N-концом, на котором находятся лизиновые группы, связывается с ядрышковым хроматином, а С-концом с транскрибируемым спейсером (tsi) на 45S рРНК.

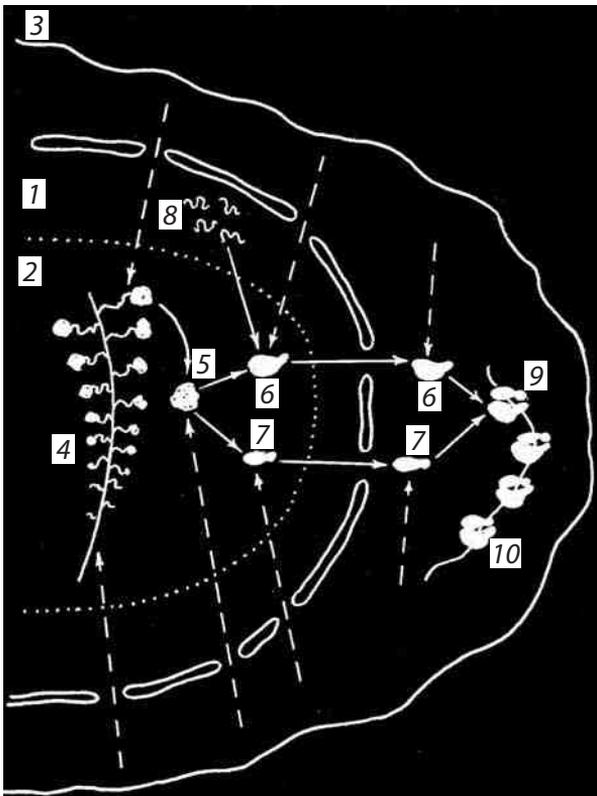
Обнаружено, что этот белок связывается не с ДНК транскрипционной единицы, а с ДНК, имеющей нуклеосомное строение (вероятно со спейсерными участками).

Белок В-23 (нуклеофозмин, м.в. 37 кДа) с помощью иммуноцитохимических методов локализован в области ПФК и, главным образом, в зоне гранулярного компонента. Считается, что В-23 участвует в промежуточных и терминальных стадиях биогенеза рибосом, и в транспорте пре-рибосом.

## 9. Общая схема работы ядрышка как специального локуса синтеза рибосом

При становлении синтеза рРНК в ядрышках на поверхности ФЦ происходит активация транскрипционных единиц — связывание с факторами транскрипции

и РНК-полимеразой I, которая начинает считывать первичный транскрипт рРНК. По мере прохождения первой РНК-полимеразы I, на освобождающемся участке транскрипционной единицы садится следующая РНК-полимераза и начинается синтез новой рРНК. Одновременно и последовательно на одном р-гене могут находиться до сотни РНК-полимераз I, от которых отходят транскрипты разной степени завершенности. Конечным продуктом является пре-рРНК или 45S рРНК. По мере синтеза растущие цепи рРНК одеваются рибосомными белками, поступающими в ядро из цитоплазмы, так что сразу образуются цепи РНП-предшественников. Совокупность продуктов транскрипции нескольких транскрипционных единиц образует вокруг ФЦ зону ПФК. Конечным продуктом такого синтеза является рибонуклеопротеидный тяж, или глобула, имеющая константу седиментации около 80S, содержащая одну молекулу 45S рРНК. После отделения 45S рРНК в терминальной точке транскрипционной единицы происходит расщепление — процессинг 45S рРНК, в конце которого образуются 40S и 60S рибосомные субъединицы. Синтез малых субъединиц в ядрышке занимает примерно 30 мин, а больших — около 1 ч. В ядрышке незрелая 60S рибосомная субъединица, кроме двух фрагментов рРНК (28S и 5,8S), связывается с третьим (5S), который синтезировался независимо от хромосом с ядрышковыми организаторами на других хромосомах. Такие новообразованные рибосомные субъединицы особым образом выходят из ядра в цитоплазму



**Рис. 8.14.** Общая схема работы ядрышка:

1 — ядро; 2 — область ядрышка; 3 — плазматическая мембрана клетки; 4 — транскрипционная единица; 5 — 80S РНП, содержащая 45S пре-рРНК; 6 — большая рибосомная субъединица; 7 — малая рибосомная субъединица; 8 — 5S рРНК, синтезируемая вне ядрышка; 9 — полная 80S работающая рибосома; 10 — полирибосома.

Пунктирные стрелки — потоки белков из цитоплазмы к рРНК

через ядерные поры. В цитоплазме такие незрелые рибосомы могут связаться с дополнительными белками. 40S субъединица сначала связывается с иРНК, и только затем с большой 60S субъединицей, образуя полную 80S функционирующую рибосому (рис. 8.14).

## 10. Ядрышко во время митоза: периферический хромосомный материал

С помощью светового микроскопа ядрышко выявляется во время интерфазы, в митотических клетках оно исчезает. При использовании цейтраферной микрокиносъемки можно наблюдать в живых клетках как по мере конденсации хромосом в интерфазе ядрышко исчезает. Сначала оно слегка уплотняется, но затем ко времени разрыва ядерной оболочки начинает быстро терять плотность, становится рыхлым и на глазах быстро исчезает, как бы тает. При этом видно, что часть ядрышкового материала растекается между хромосомами. В метафазе и анафазе ядрышки как таковые отсутствуют. Первые признаки новых ядрышек появляются после средней телофазы, когда уже достаточно разрыхлились хромосомы дочерних ядер, имеющие новую ядерную оболочку. В это время вблизи деконденсирующихся хромосом появляются плотные тельца — предъядрышки. Обычно их число выше, чем число ядрышка в интерфазе. Позднее уже в  $G_1$ -периоде клеточного цикла предъядрышки растут, начинают объединяться друг с другом, их общее число падает, но суммарный объем возрастает. Общий объем ядрышка удваивается в S- $G_2$ -фазах. При конденсации хромосом крупные ядрышки распадаются на более мелкие, которые в митозе исчезают.

На самом деле никакого полного исчезновения, или «растворения» ядрышка нет: происходит изменение его структуры, редукция одной части его компонентов при сохранении другой.

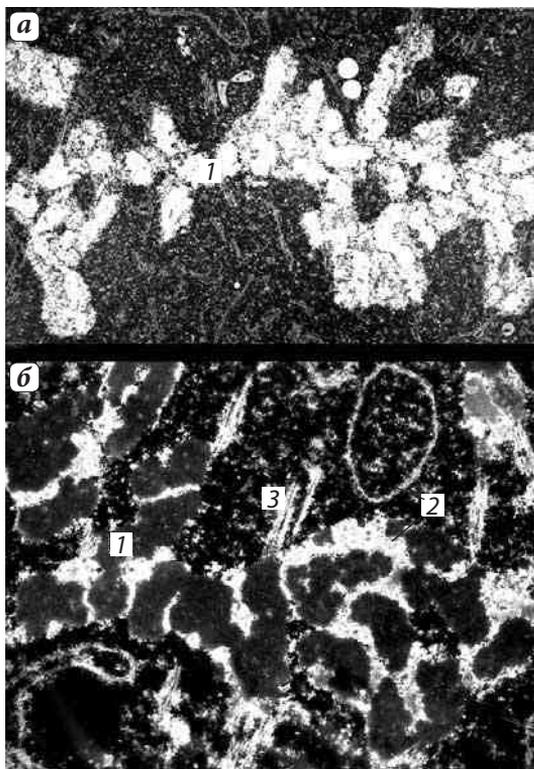
Во время митоза исчезновению подвергается только часть ядрышкового компонента, в то время как аргентофильный компонент сохраняется, постоянно существует во время митоза и переносится на хромосомах в дочерние ядра.

Радиоавтографическими исследованиями было показано, что исчезновение ядрышек совпадает с прекращением синтеза клеточной (в основном рибосомной) РНК, который возобновляется в поздней телофазе, совпадая по времени с появлением новых ядрышек.

Кроме того, было обнаружено, что активность РНК-полимеразы I также исчезает на средних стадиях митоза. Это давало основание считать, что новообразование ядрышек связано с восстановлением синтеза рРНК в дочерних клетках.

Но с другой стороны существуют факты, указывающие на перманентное, постоянное присутствие ядрышковых компонентов в течение всего митотического цикла. Это относится к Ag-фильному материалу ядрышек в первую очередь.

Цитологи начала XX века часто наблюдали во время митоза появление какого-то нехроматинового материала, окружающего каждую хромосому. Этот материал, или «матрикс» митотических хромосом, как считали, мог иметь ядрышковое



**Рис. 8.15.** Периферический хромосомный материал (ПХМ) в делящихся клетках эндосперма пшеницы. Э.м.:

**а** — метафаза, каждая хромосома окружена ПХМ; **б** — то же, при окраске на РНП по Бернхарду (фото В.В. Буракова);

1 — хромосомы; 2 — пхм; 3 — микротрубочки веретена

происхождение и его роль могла заключаться в том, что мог быть источником новых ядрышек в дочерних ядрах после митоза.

Электронная микроскопия показала, что «матрикс» — нехроматиновый компонент митотических хромосом, состоящий из скопления рыхло расположенных фибрилл и гранул, имеющих рибонуклеопротеидную природу, морфологически сходных с компонентами, входящими в состав интерфазных ядрышек, выявляется в условиях конденсации митотических хромосом как растительного, так и животного происхождения. При этом некоторые компоненты ядрышек диссоциируют и уходят в цитоплазму (большая часть РНП-частиц), в то время как другие тесно связываются с поверхностью хромосом, образуя основу «матрикса» или, как этот компонент теперь называют, основу **периферического хромосомного материала (ПХМ)** (рис. 8.15). Этот фибриллярно-гранулярный материал, синтезированный до митоза, переносится хромосомами в дочерние клетки. В ранней телофазе еще в

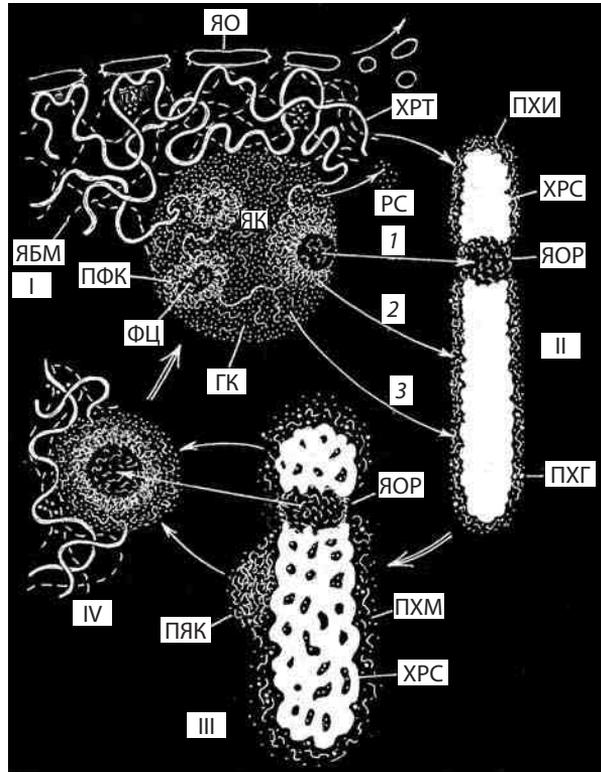
отсутствие синтеза рРНК по мере деконденсации хромосом происходит структурное перераспределение компонентов ПХМ. Его фибриллярные компоненты начинают собираться в мелкие ассоциаты — предъядрышки, которые могут сливаться друг с другом, собираться в зоне ядрышкового организатора хромосом в поздней телофазе, где возобновляется транскрипция рРНК.

При использовании иммуноцитохимических методов выявления ядрышковых белков было показано, что митотические хромосомы действительно участвуют в переносе в дочерние клетки белков ядрышек, белков ядерного остова, так и различных РНП. Так было установлено, что ядрышковые белки, участвующие в транскрипции рРНК (РНК-полимераза I, топоизомераза I, фактор инициации транскрипции UBFi др.), аккумулируются в зоне ядрышкового организатора, в то время как белки, связанные с процессингом пре-рРНК (фибриллин, нуклеолин, В-23), а также некоторая часть пре-рРНК и малые ядрышковые РНП переносятся поверхностью хромосом в составе периферического хромосомного материала.

Кроме того, в состав ПХМ могут входить некоторые негистоновые белки из состава ядерного интерфазного остова.

Следовательно митотические хромосомы участвуют не только в их главной функции — перенос генетического материала в виде ДНК — но, кроме того, участвуют в переносе целого ряда белков и РНК в дочерние клетки (рис. 8.16).

Биологический смысл появления ПХМ на поверхности митотических хромосом может заключаться в том, что переносимые хромосомами белки не являются случайными «пассажирами», а представляют собой комплекс белков разного происхождения: ферменты и факторы ядрышковой транскрипции, процессинга рРНК, сборки рибосом, незрелые предшественники рибосом и, кроме того, белки ядерного и ядрышкового матрикса, также содержащие малые ядерные РНП и все компоненты, связанные с образованием нерибосомных РНК, с их сплайсингом и др. Другими словами, ПХМ переносит в новые ядра многие белковые компоненты и ферменты, что создает условия, необходимые для форсированного возобновления синтеза и созревания как рибосом, так и синтеза информационных РНК. Митотическая хромосома переносит в новое ядро не только генетическую информацию в виде ДНК хроматина, но и необходимые компоненты синтетического аппарата, готового к активации транскрипции в новом клеточном цикле. Хромосома при клеточном делении «все свое несет с собой» — как гласит латинская поговорка.



**Рис. 8.16.** Участие периферического хромосомного материала (ПХМ) в переносе хромосомами компонентов ядрышка и ядерного белкового матрикса на разных стадиях развития:

I — интерфаза; II — метафаза; III — телофаза; IV — ранняя интерфаза; 1 — компоненты транскрипционного комплекса синтеза рРНК (рДНК, РНК-полимераза I, факторы транскрипции); 2 — компоненты процессинга рРНК; 3 — предшественники рибосом и белки матрикса ядрышка

ЯК — ядрышко; ЯОР — ядрышковый организатор хромосомы; ФЦ — фибриллярный центр; ПФК — плотный фибриллярный компонент; ГК — гранулярный компонент ядрышка; РС — рибосомы; ПХМ — периферический хромосомный материал; Пяк — предядрышки; Хрт — хроматин; Хрс — хромосома; ПГ — периферические гранулы; ЯБМ — ядерный белковый матрикс; ЯО — ядерная оболочка

# Глава 9

## Нерибосомные продукты клеточного ядра

### 1. Транскрипция информационных РНК

Информационные РНК образуются при участии РНК-полимеразы II, начинающей синтез со стартовой точки транскрипционной единицы, и кончая его в точке терминации. При этом образуется одна молекула РНК, транскрипт — предшественник информационной РНК. Размер транскрипционных единиц разных генов может значительно варьировать от 6000 до 200 000 нуклеотидов. Поэтому суммарная фракция РНК, синтезированная на разных генах, содержит молекулы различной длины. Эта первично синтезированная РНК или т.н. гетерогенная ядерная РНК (гяРНК), встречается только в ядре и не обнаруживается в цитоплазме. В цитоплазму попадает уже информационная РНК, образующаяся в результате изменений в ядре первичных транскриптов РНК (гяРНК или пре-иРНК).

Величина гяРНК в несколько раз больше той, которая требуется для синтеза белков: для синтеза «среднего белка», состоящего из 400 аминокислот, необходима матричная РНК в 1200 нуклеотидов. Величины информационных РНК в составе синтезирующих белок полисом в несколько раз короче первичных транскриптов. Это укорочение является результатом «созревания» гяРНК, процессинга, но иного характера, чем процессинг рибосомных РНК. Структура гена эукариотов оказалась состоящей из чередующихся последовательностей нуклеотидов, т.н. экзонов и интронов. **Экзоны** — участки ДНК, которые обладают кодирующей информацией и входят в состав информационных РНК, а **интроны** содержат последовательности, не входящие в информационную РНК. Первичный транскрипт РНК содержит полную копию гена, включает все последовательности и экзоны и интроны. Интроны впоследствии вырезаются из первичного транскрипта, концы же фрагментов РНК сшиваются ковалентно, что приводит к общему укорачиванию образовавшейся молекулы информационной РНК.

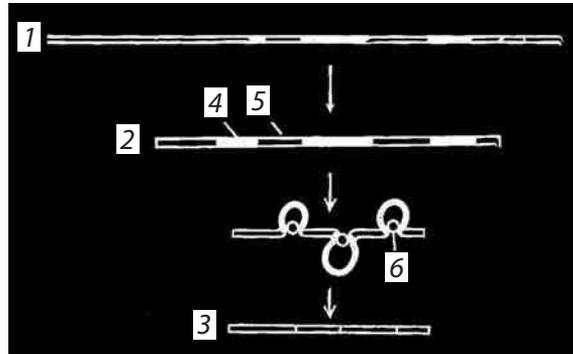
Этот процесс получил название **сплайсинга**. Так как большинство генов млекопитающих содержит большее число интронов, чем экзонов, процесс сплайсинга РНК приводит к тому, что очень длинные молекулы гяРНК (первичных транскриптов, содержащих более чем 50 000 нуклеотидов) укорачиваются до длины цитоплазматических иРНК (обычно от 500 до 3000 нуклеотидов длиной) (рис. 9.1).

По мере синтеза и роста гяРНК, она связывается с рядом ядерных белков, образуя гяРНК-частицы (гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиновые частицы). При этом высокомолекулярная гяРНК в ядрах связывается с глобулярными

белковыми частицами, **информоферами**. На каждый информофер приходится отрезок РНК длиной около 500–600 нуклеотидов. Такой комплекс информофера и РНК образует мономер или 30S частицу. В состав каждого информофера входит более 30 белковых молекул **информатина**. Таким образом первичный транскрипт структурного гена, отвечающего за образование информационной РНК, представляет собой гигантскую молекулу гяРНК, связанную со множеством белковых частиц, информофер.

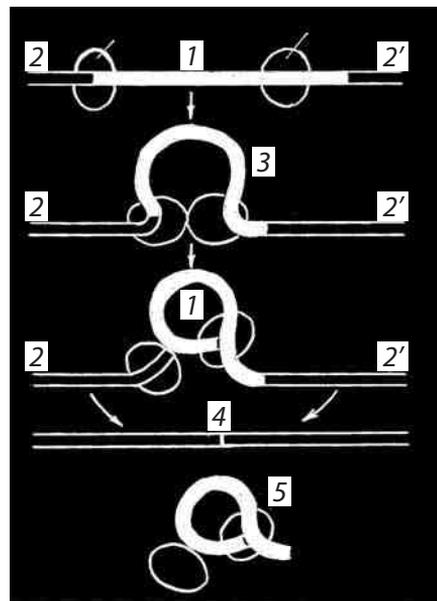
Считается, что участки гяРНК, между информоферами, могут быть использованы для сплайсинга с помощью специальных белковых комплексов — **сплайсосом**. В состав сплайсосом входит 5–7 **малых ядерных рибонуклеопротеидов** (snRNP). Эти особые малые ядерные РНП (мяРНП) представляют собой РНП-частицы (U1, U2, U5, U4, U6 snRNP) с константой седиментации около 10S. В каждой частице содержится одна малая молекула РНК (90–400 нуклеотидов) и около семи молекул белка. Так что сплайсосома представляет собой крупный рибонуклеопротеидный комплекс величиной, сравнимой с рибосомой (константа седиментации около 60S).

При синтезе гяРНК и после него сплайсосомы связываются с цепью РНК в местах на границе между экзонами и интронами, специфически узнавая эти места, производят разрыв в основании петли интрона, сшивают свободные концы (рис. 9.2). Таким способом участки интронных последовательностей вычлняются из состава первичного транскрипта, а затем быстро деградируют в ядре. В результате этого процесса длина результирующей молекулы РНК может укорачиваться в несколько раз. Например, размер гена белка тироглобулина включает 300 000 нуклеотитов, размер же иРНК для этого белка составляет всего 8,7 тыс. нуклеотидов из-за того, что в составе гена включены 36 интронных последовательностей, т.е. происходит укорочение молекул РНК более чем в 30 раз. Размер



**Рис. 9.1.** Созревание (сплайсинг) гетерогенных ядерных (гя) РНК:

1 — матрица ДНК; 2 — гяРНК-первичный транскрипт; 3 — мРНК; 4 — интроны; 5 — экзоны; 6 — сплайсосома



**Рис. 9.2.** Последовательное вырезание интрона и сплайсинга экзонов:

1 — интрон; 2, 2' — экзоны; 3 — образование сплайсосомы; 4 — зрелая иРНК; 5 — вырезанный интрон

гена каталазы равен 34 т.п.н., а размер иРНК — 1,6 т.п.н. Величина овалбуминового гена у птиц составляет 7,5 т.п.н., а соответствующая этому гену зрелая иРНК — всего 1,8 т.п.н. Обычно иРНК в 2,5–10 раз короче первичного транскрипта, гяРНК.

Считается, что после созревания иРНК, при переходе ее из ядра в цитоплазму теряет белки, входящие в состав информофера, «переодевается» в ядерной поре, а белки информофер остаются в ядре.

В цитоплазме иРНК снова одеваются новыми белками, образуя «*информосомы*» — форму хранения иРНК в неактивном состоянии, или связываются с белками, необходимыми для трансляции.

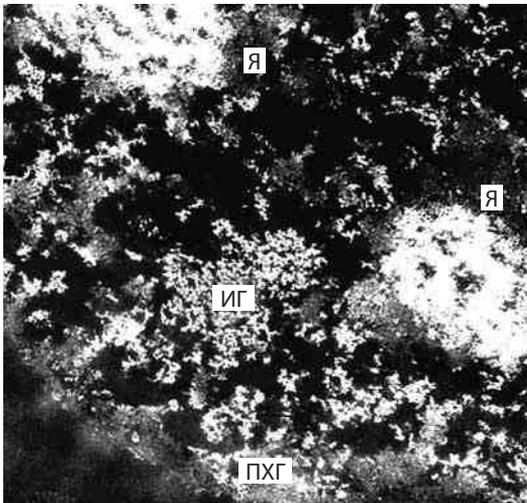
## 2. Морфология РНП-компонентов в ядре

Вся информация, полученная о морфологии транскриптов рРНК и иРНК, об информоферах и сплайсосомах получена на изучении выделенных из ядер этих компонентов, подвергнутых специальной обработке для распластывания их на препаратах для электронной микроскопии. Что же касается морфологии РНП-продуктов *in situ*, в объеме интактных ядер, то здесь информация неполная и противоречивая.

Кроме хорошо выраженного ядрышка, другие продукты ядерной активности при изучении клеток на ультратонких срезах трудно отличить от различных фибрилл (ДНП, матрикс) и каких-то гранул, казалось бы без особого порядка разбросанных в ядре. Все же, используя метод избирательного контрастирования солями урана структур, содержащих РНК, удастся выделить ряд компонентов, кото-

рые можно отнести к неядрышковым продуктам транскрипции. Это — перихроматиновые фибриллы, перихроматиновые гранулы и интерхроматиновые гранулы (рис. 9.3, 9.4).

**Перихроматиновые фибриллы** обнаруживаются по периферии участков конденсированного хроматина (околочембранного или любого другого). Они имеют толщину около 3–5 нм, часто образуют рыхлую неправильную сеть. Оказалось, что этот компонент ядра сильно изменяется при стимуляции синтеза РНК. Так, при возрастании синтеза РНК в клетках печени крыс после голодания и последующего питания или после введения кортизона адреналэктомированным животным



**Рис. 9.3.** РНК-содержащие структуры в ядре печени крысы, окраска по Бернхарду (фото В.Ю. Полякова): ПХГ — перихроматиновые гранулы; ИГ — интерхроматиновые гранулы; Я — ядрышки

зоны перихроматиновых фибрилл значительно увеличиваются. Эти зоны оказались наиболее активными по включению меченых предшественников в РНК, что было показано радиоавтографически с помощью электронного микроскопа. Такие фибриллы могут представлять новосинтезированную гяРНК.

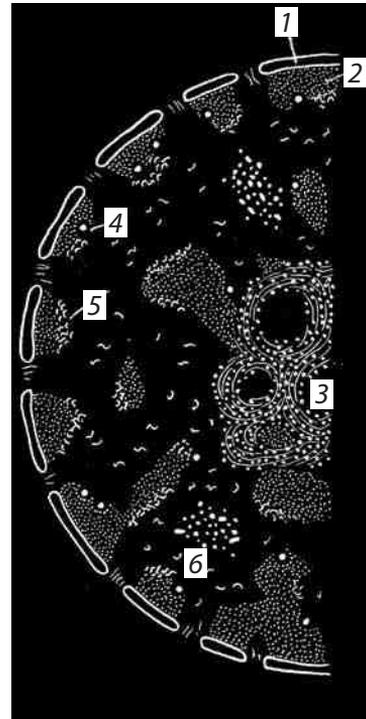
Другой тип РНК-содержащих структур интерфазного ядра — **перихроматиновые гранулы**. Они имеют диаметр около 45 нм и окружены светлым ореолом. Эти гранулы встречаются только на периферии конденсированного хроматина, в диффузном хроматине их нет. Считается, что между этими гранулами и перихроматированными фибриллами существует структурная связь. При больших увеличениях внутри гранул можно видеть тонкие извитые фибриллы 3–5 нм толщиной. Некоторые исследователи делают предположение, что такие рибонуклеопротеидные гранулы могут представлять собой зрелые комплексы из нескольких информофер, рибонуклеопротеидные частицы, содержащие информационную РНК. Однако это предположение нуждается в проверке.

**Интерхроматиновые гранулы** — третий тип РНК-содержащих структур. Они имеют размер 20–25 нм и группируются всегда в форме скоплений между участками хроматина. Эти гранулы не стандартны по величине и переплетены тонкими фибриллами.

В последнее время были получены антитела к мяРНП. Оказалось, что среди них есть и различные сплайсосомы, гранулы размером 20–30 нм. Эти мяРНП располагались в зонах свободных от конденсированного хроматина и по своей локализации совпадали с зонами, где располагались скопления интерхроматиновых гранул. Они могут представлять собой скопление сплайсосом, участвующих в конечных стадиях созревания гяРНК (пре-иРНК).

Кроме скоплений или кластеров (*speckles*) интерхроматиновых гранул в ядрах обнаруживаются «закрученные тельца», или тельца Кахалья. Они содержат специфический для них белок коилин, а также фибрилларин, обычный ядрышковый белок. В состав этих телец входят также мяРНП. Считается, что в тельцах Кахалья происходит окончательное созревание мяРНП.

В таком случае всю картину динамики синтеза гяРНК можно представить себе следующим образом. Деконденсирующиеся участки хроматина (эухроматин) по периферии конденсированных зон хроматина, связываясь с РНК-полимеразой II, транскрибируют гяРНК в виде начальных перихроматированных фибрилл,



**Рис. 9.4.** Схема расположения РНП-продуктов в интерфазном ядре клетки животных:

1 — ядерная оболочка; 2 — хроматин; 3 — ядрышко; 4 — перихроматиновые гранулы; 5 — перихроматиновые фибриллы; 6 — интерхроматиновые гранулы

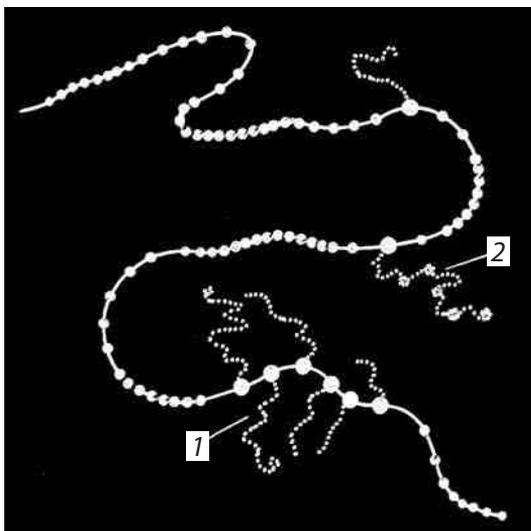


Рис. 9.5. Морфология транскрибирующихся участков интерфазного хроматина:

1 — интенсивная транскрипция; 2 — слабая транскрипция

предшественниками РНК. Активный хроматин на таких препаратах имел вид типичных нуклеосомных фибрилл с редко сидящими одиночными гранулами РНК-полимеразы, от которых отходили транскрипты РНК разной длины и конфигурации (рис. 9.5). Обычно это были изогнутые фибриллы, иногда имеющие на свободном конце глобулярные образования. Чаще всего расстояние между одиночными гранулами РНК-полимеразы доходило до 0,1–0,3 мкм, так что представлялось, что с гена транскрибируется лишь одна копия, в отличие от множественных копий, получаемых с генов рРНК. Но однако, в некоторых случаях обнаруживались участки хроматина с тесно расположенными РНК-полимеразами, от которых отходили в сторону транскрипты разной длины, образуя «елочко»-подобные структуры.

Недавно был предложен более прогрессивный подход для исследования морфологии транскрипции индивидуальных структурных (кодирующих полипептидные цепи) генов. Для этого были использованы ооциты *X. laevis*, в ядрах которых с помощью микроинъекций можно вводить любые молекулы, в том числе и ДНК. Если же для такого введения взять клонированные гены, то получая препараты по Миллеру, можно обнаружить отдельные от ядрышек и хромосом молекулы ДНК, которые в условиях высокой транскрипционной активности в ядрах ооцитов, в свою очередь вовлекаются в процесс транскрипции. Это и дает возможность наблюдать за транскрипционной активностью индивидуального гена.

Так, в ядра ооцитов были инъецированы небольшие циклические молекулы клонированных генов овальбумина кур. Оказалось, что 80–90% инъецированного материала неактивны. В этом случае индивидуальные циклические молекулы генов были сплошь покрыты нуклеосомами и не содержали транскрипционных комплексов (РНК-полимераза вместе с цепочкой синтезированной РНК).

связывающихся с белками информер, которые затем подвергаются созреванию с участием сплайсосома (интерхроматиновые гранулы), дают начало зрелым формам иРНК-комплексам или перихроматиновым гранулам. Вероятно, не все зрелые иРНК могут переходить в крупные (45–60 нм) перихроматиновые гранулы, а последние, вероятно, характерны для РНК с высоким молекулярным весом.

Были сделаны попытки изучить морфологию транскрипции нерибосомных генов на тотальных плоскостных препаратах. Для этого из гомогенатов ядер осаждали фракцию диффузного хроматина, обогащенного включенными мечеными

Небольшая часть инъецированных генов, однако, обладала типичными транскрипционными комплексами. Среди таких активированных генов встречается, по крайней мере, три морфологических класса. В первом случае это были циркулярные молекулы со слабой транскрипцией (3–10 транскриптов на 1 мкм длины хроматина), транскрипты были разной длины и не обладали линейным градиентом. В другом случае наблюдали интенсивно транскрибируемые циклические участки хроматина, покрытые транскрипционными комплексами по всей длине молекулы ДНК (30–50 транскриптов на 1 мкм хроматина). Здесь транскрипты достигали длины до 1,2 мкм. РНК на интенсивно транскрибируемых участках всегда была расположена по градиенту длины, образуя участки, напоминающие «елочки» на транскрипционных единицах ядрышковых ДНК. Первичный транскрипт с клонированного гена овальбумина кур содержит участки кодирующих последовательностей (экзоны) и интроны. На подобных препаратах в тесной ассоциации с нитчатыми транскриптами бывают видны также глобулярные сплайсосомы.

Таким образом, удастся наблюдать за работой любых индивидуальных генов.

Гены транспортных РНК относятся к умеренно повторяющимся (10–100) последовательностям в геноме. Они также как р-гены, располагаются тандемно. Длина разных тРНК колеблется от 74 до 95 нуклеотидов (примерно 30 нм), уложенных в сложную трехмерную фигуру. Отдельный ген тРНК состоит из двух крайних экзонов и одного центрального интрона. Во время процессинга интрон удаляется, а два экзона с помощью фермента лигазы соединяются в зрелую молекулу.

# Глава 10

## Ядерная оболочка

Структура, ограничивающая параметр клеточного ядра, ядерная оболочка, характерна для эукариотических клеток. Она разделяет два внутриклеточных компартмента друг от друга, цитоплазму от ядра. Значение такого разделения структур в пространстве очень важно: это приводит к обособлению процессов синтеза белка и процессов синтеза нуклеиновых кислот, что создает дополнительные, по сравнению с прокариотами, возможности для регуляции генной активности и ее реализации в виде синтеза специфических белков. Активная регуляция транспорта из цитоплазмы в ядро и из ядра в цитоплазму, через специальные комплексы пор создает систему избирательного транспорта веществ, делая ядерную оболочку «генными воротами» со специальными «превратниками» (контрольными пунктами), регулируемыми потоки ядерного импорта и экспорта. Кроме того, как уже описывалось, ядерная оболочка играет большую роль в организации трехмерной структуры интерфазного ядра, элементы ядерной оболочки являются частью ядерного белкового матрикса.

Ядерная оболочка состоит из двух мембран, внешней и внутренней, между которыми располагается *перинуклеарное пространство* (рис. 10.1). Внутренняя мембрана ядерной оболочки структурно связана с *ламиной* — фиброзным периферическим слоем ядерного белкового матрикса. В общем виде ядерная оболочка

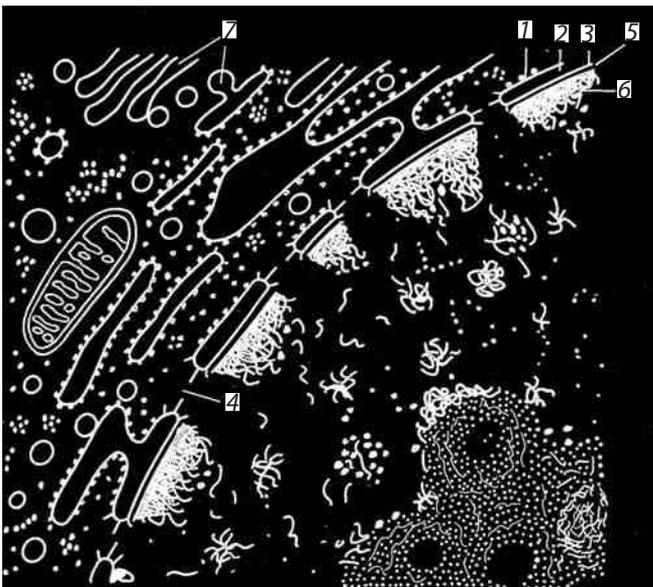


Рис. 10.1. Участок периферии ядра:

1 — внешняя мембрана ядерной оболочки; 2 — перинуклеарное пространство; 3 — внутренняя мембрана ядерной оболочки; 4 — ядерные поры; 5 — ламины; 6 — хроматин; 7 — мембраны цитоплазмы

может быть представлена как двухслойный мешок, отделяющий содержимое ядра от цитоплазмы. Однако ядерная оболочка имеет характерную особенность, отличающую ее от других двухмембранных структур клетки (митохондрии и пластиды). Это наличие особых ядерных пор, которые образуются за счет многочисленных зон слияния двух ядерных мембран и представляют собой как бы округлые, сквозные перфорации всей ядерной оболочки.

## 1. Компоненты ядерной оболочки

**Внешняя мембрана ядерной оболочки**, непосредственно контактирующая с цитоплазмой клетки, имеет ряд структурных особенностей, позволяющих отнести ее к собственно мембранной системе эндоплазматического ретикулула (ЭПР). Так, на внешней ядерной мембране обычно располагается большое количество рибосом, как и на мембранах эргастоплазмы. Существуют многочисленные наблюдения о непосредственном переходе внешней ядерной мембраны в систему каналов эндоплазматического ретикулула, что особенно подчеркивает структурную идентичность этих мембран.

Так, у клеток, бедных эндоплазматическим ретикулулом, внешняя ядерная мембрана может представлять собой «минимальный» объем эндоплазматического ретикулула, который может участвовать в синтезе белкового и липидного компонентов мембран. Описаны случаи, когда от внешней ядерной мембраны отщепляются мембранные вакуоли, направляющиеся в проксимальный отдел аппарата Гольджи. Состав липидов и белков внешней ядерной мембраны очень схож с таковым ретикулула, что, возможно, и определяет их общие биохимические функции, что особенно подчеркивается наличием рибосом на поверхности мембран, обращенной в гиалоплазму. Эти рибосомы синтезируют, как мембранные, так и секретируемые белки, которые могут транспортироваться в перинуклеарное пространство, а оттуда — в полости цистерн ЭПР. Например, при стимуляции образования  $\gamma$ -глобулинов в плазмочитах первые продукты клеточной активности локализуются в перинуклеарном пространстве, а потом начинают появляться в полостях ЭПР. У большинства животных и растительных клеток внешняя мембрана ядерной оболочки не представляет собой идеально ровную поверхность — она может образовывать различной величины выпячивания или выросты в сторону цитоплазмы.

**Внутренняя мембрана ядерной оболочки** рибосом на своей поверхности не имеет, но связана с фиброзным слоем — **ядерной ламиной** (*Lamina nucleum limitans*), которая, в свою очередь, заякоревает хроматин на ядерной оболочке. Связь хроматина с внутренней мембраной оболочка является ее характерной особенностью, хотя существуют примеры, когда эти связи нарушаются при сохранении целостности ядерной оболочки. Например, в ооцитах амфибий на стадии дипло-тены все хромосомы собираются в центре ядра и полностью теряют связь с ядерной оболочкой. С другой стороны, при делении клеток с т.н. закрытым типом митоза большая часть внутренней ядерной мембраны теряет связь с хроматином.

О специфичности белков ламины уже говорилось в разделе «Ядерный белковый матрикс», здесь же необходимо еще раз подчеркнуть, что эти фибриллярные белки не образуют неизменную структуру. Фиброзный слой ламины все время перестраивается, особенно в связи с ростом поверхности ядра, во время клеточного цикла. Характерные для внутренней ядерной мембраны белки ламины А, С и В относятся к фибриллярным белкам V типа промежуточных филаментов (см. ниже), их фибриллярные мономеры могут образовывать димеры, тетрамеры, а последние образуют фибриллы толщиной около 10 нм. Со стороны кариоплазмы под внутренней ядерной мембраной такие фибриллы образуют ортогональные структуры, чередующиеся с рыхло расположенной сетью этих же фибрилл.

Белки ламины с мембраной связаны двояким образом. Так, ламин В после синтеза модифицируется добавлением гидрофобной изопентильной группы вблизи С-конца. Эта липофильная группа встраивается в слой мембраны и как бы закоревает ламину на мембране. Кроме того целый ряд интегральных белков внутренней ядерной мембраны (LBR, LAR, эмерин и др.) также закрепляют ламины, входящие в состав этого фиброзного слоя. Эти же белки участвуют в связывании ядерной мембраны с хроматином.

Некоторые мутации по генам ламин А и С связаны с развитием мышечной дистрофии Эмери–Дрейфуса, возникающей, вероятно, вследствие нарушений взаимосвязи между ядерной оболочкой и некоторыми генами хроматина, связанными с ней.



Рис. 10.2. Вид в э.м. поверхности клеточного ядра (метод замораживания-скальвания)

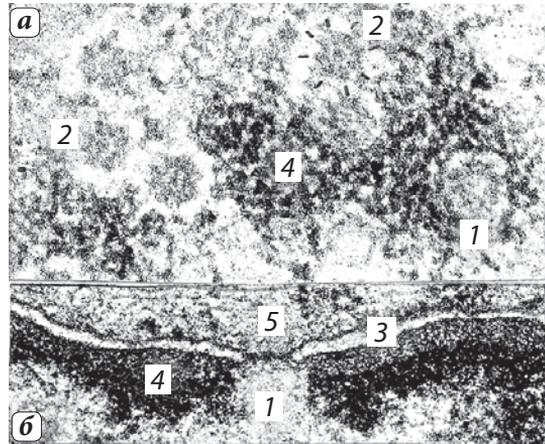
Наиболее характерной и бросающейся в глаза структурой в составе ядерной оболочки является **ядерная пора**. Поры в оболочке образуются за счет слияния двух ядерных мембран в виде округлых сквозных отверстий или перфораций с диаметром около 100 нм. При альдегидной фиксации или при использовании метода замораживания и скальвания в электронном микроскопе видно, что округлое сквозное отверстие в ядерной оболочке заполнено сложно организованными глобулярными и фибриллярными структурами (рис. 10.2). Совокупность мембранных перфораций и этих структур называют **комплексом пор ядра**. Тем самым подчеркивается, что ядерная пора не просто сквозная дыра в ядерной оболочке, через которую непосредственно вещества ядра и цитоплазмы могут сообщаться. Компоненты комплекса пор имеют белковую природу.

**Ядерный поровый комплекс** (ЯПК или NPC—nuclear pore complex) представляет собой супрамолекулярную структуру с м.в.

более  $125 \cdot 10^6$  Да, состоящую из более 1000 белков, масса которых в 30 раз больше чем рибосома. Белки ЯПК носят название **нуклеопоринов**. Насчитывается примерно 50–100 видов этих белков, собранных в 12 субкомплексов.

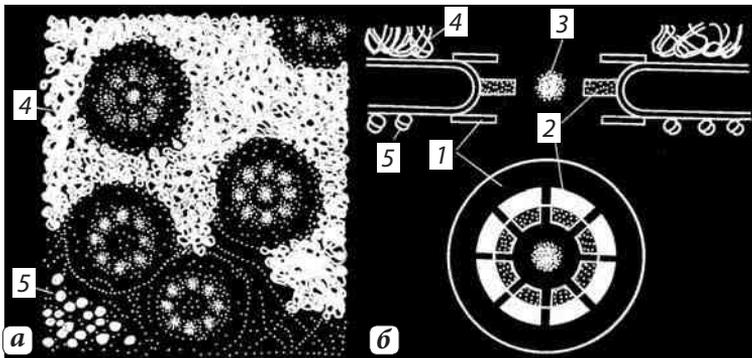
В последнее время удалось получить отчетливые изображения ЯПК в электронном микроскопе, что дает возможность понять их структурную организацию. Внешний диаметр порового комплекса составляет около 100 нм, а высота — 75 нм. В целом он представляет собой цилиндрическую фигуру с признаками октогональной симметрии. Несмотря на очень впечатляющие изображения выделенных ЯПК, разные авторы дают разные схемы строения этого сложного комплекса, обладающего симметрией восьмого порядка.

Если посмотреть на ЯПК в плане на ультратонком срезе, то бросается в глаза, что его периферия представлена восьмью глобулами (рис. 10.3, 10.4). На выделенных же ЯПК в первую очередь видны кольчатые структуры. От периферических компонентов ЯПК в сторону цитоплазмы простираются фибриллярные выросты. Со стороны ядра тоже фибриллярные выросты образуют корзинкоподобную структуру, связанную терминальным кольцом. В большинстве моделей центр цилиндрической фигуры ЯПК содержит «пробку» (центральную гранулу, или транспортер). По одной из моделей (рис. 10.5) цитоплазматические филаменты отходят



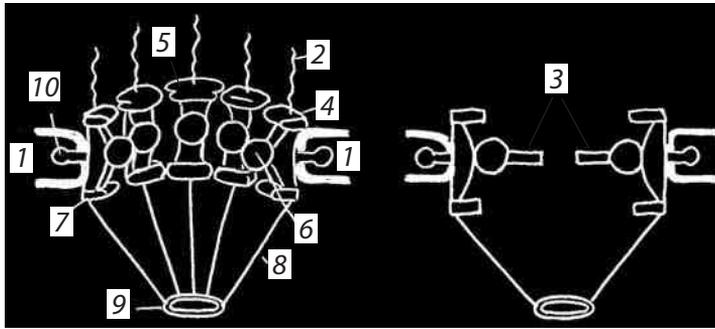
**Рис. 10.3.** Комплексы ядерных пор (КЯП) на ультратонких срезах:

**а** — вид в плане; **б** — поперечный срез; 1 — КЯП; 2 — видны 8 периферических субъединиц (глобул); 3 — ядерная оболочка; 4 — хроматин; 5 — центральная гранула («пробка» или «транспортер»)



**Рис. 10.4.** Общая схема строения ядерных пор:

**а** — внешний вид ядерных пор в ядре ооцитов; **б** — схема строения ядерной поры; 1 — кольцо; 2 — спицы; 3 — центральная гранула; 4 — хроматин; 5 — рибосома



**Рис. 10.5.** Модель строения комплекса ядерной поры по Alberts и др., 1994. Справа — трехмерная модель, слева — пора в разрезе:

1 — ядерная оболочка; 2 — цитоплазматические филаменты; 3 — центральная пробка, транспортер; 4 — цитоплазматическое кольцо; 5 — цитоплазматическая субъединица; 6 — спица; 7 — ядерное кольцо; 8 — фибриллы корзинки; 9 — терминальное кольцо; 10 — аннулярные субъединицы

от цитоплазматического кольца, состоящего из 8 субъединиц. Между ним и внешней ядерной мембраной располагается тонкое кольцо, а затем звездчатое кольцо. Цитоплазматическое кольцо связано внутренними филаментами с транспортером, который находится в центре и заполняет пространство между внешней и внутренней ядерной мембраной. Сходная структура находится на внутренней мембране: нуклеоплазматическое кольцо поддерживает филаменты «корзины».

Весь ЯПК в стенке мембранной перфорации закрепляется интегральными белками, гликопротеидами gp 210 и POM 121.

По своей сложности организации и, главное, по функциональной значимости комплекс ядерной поры можно было бы отнести к органеллам клетки, т.к. их роль заключается в контроле за ядерно-цитоплазматическими связями.

Размер ядерных пор и их структура стандартны не только для данной клетки, но и для всех клеток данного организма, более того, для всех эукариот.

Число ядерных пор зависит от метаболической активности клеток: чем выше синтетические процессы в клетках, тем больше пор на единицу поверхности клеточного ядра (табл. 13).

Так, у эритробластов (клетки-предшественники ядерных эритроцитов) низших позвоночных животных во время интенсивного синтеза и накопления

**Таблица 13.** Количество ядерных пор в различных объектах

Объект	Число ядерных пор на 1 мкм <sup>2</sup>	Число пор на 1 ядро
Ксенопус, почки	10,05	3400
Ксенопус, ооцит	51,0	37,6 · 10 <sup>6</sup>
Мышь, культура ткани	10,83	5050
Человек, культура ткани	11,24	3930
Крыса, гепатоцит	16,1	3800
Мышь, лимфоцит	3,3	400
Человек, лимфоцит	4,47	700

гемоглобина обнаруживается в ядре около 30 ядерных пор на  $1 \text{ мкм}^2$ . После того как эти процессы заканчиваются, в ядрах зрелых клеток-эритроцитов прекращаются синтезы ДНК и РНК, и количество пор падает до 5 на  $1 \text{ мкм}^2$ . В ядерных оболочках полностью зрелых сперматозоидов поры не обнаруживаются, так же как у микронуклеусов некоторых инфузорий. Количество пор может изменяться в течение клеточного цикла. Первое возрастание числа пор наблюдается при реконструкции и росте ядер после митоза, второй этап увеличения числа пор происходит во время синтеза ДНК.

По поверхности ядра поры располагаются более или менее равномерно, но их число резко падает в местах ассоциации с ядерной оболочкой участков гетерохроматина, ядрышкового организатора, теломерных участков.

Поровые комплексы могут встречаться и в других мембранных компонентах клетки, но гораздо реже, чем в ядерной оболочке. Иногда поровые комплексы видны в составе мембран гранулярного эндоплазматического ретикулума. Они обнаруживаются в составе окончатых мембран цитоплазмы, которые представляют собой тесно расположенные пачки замкнутых плоских мембранных мешков, сплошь пронизанных поровыми комплексами, имеющими такую же структуру, как и поры в ядерной оболочке. Функциональное значение окончатых мембран не известно.

## 2. Роль ядерной оболочки в ядерно-цитоплазматическом обмене

Со времени открытия ядерной оболочки и описания ее строения делалось заключение о том, что ядерная оболочка может служить регулятором в ядерно-цитоплазматическом обмене и главная роль в этих процессах отводилась ядерным порам. Обмен продуктами между ядром и цитоплазмой в самом деле очень велик: все ядерные белки поступают в ядро из цитоплазмы и все формы РНК выводятся из ядер. И в этом процессе комплекс поры выступает как супрамолекулярный комплекс, выполняющий роль не только транслокатора, механизма переноса, но и роль сортировщика, узнающего и отбирающего специальным образом переносимые молекулы.

В процессе ядерно-цитоплазматического транспорта ядерные поры функционируют как некоторое молекулярное сито, пропуская частицы определенного размера пассивно, по градиенту концентрации. Так, ионы, сахара, нуклеотиды, АТФ, стероидные гормоны — свободно поступают в ядра. С другой стороны, ядерные поры осуществляют избирательный транспорт.

Через ядерную оболочку беспрепятственно в обе стороны происходит пассивный транспорт высоко молекулярных соединений, имеющих массу не более  $5 \cdot 10^3$  Да. Для определения размеров частиц, могущих пройти сквозь пору, используются гранулы декстрана или коллоидного золота, которые путем микроинъекции вводятся в цитоплазму живой клетки. Было обнаружено, что максимальный размер частиц, способных транспортироваться в ядро, составляет 8,5–10 нм. При

этом сначала частицы собираются в зоне поровых комплексов, а затем оказываются в ядре. Неядерные белки с массой большей, чем 20 000–40 000 дальтон проникают в ядро медленнее, если вообще проникают. Так, инъецированные белки с массой 17 кДа могут проникнуть в ядро довольно быстро, за 2–3 мин, белки 40 кДа — за 30 мин, белки 60 кДа — вообще не проникают в ядра. Считается, что белки с гидродинамическим радиусом больше 3,5 нм (что соответствует глобулярному белку с массой 65 кДа), не могут просто механически проходить через ядерную пору. В этих случаях ядерная пора выступает в качестве реального молекулярного сита.

Но дело осложняется тем, что многие белки поступают как в ядро, так и выходят из него против градиента концентраций. Например, концентрация гистонов в ядре значительно выше, чем в цитоплазме. Но, несмотря на это, во время синтеза ДНК происходит транспорт огромного количества ( $10^6$  молекул каждые три минуты, или по 100–500 молекул через одну пору за 1 мин) гистонов из цитоплазмы в ядро. С другой стороны, через ядерные поры реально могут проходить некоторые белки и даже макромолекулярные комплексы с массой значительно большей, чем 60 кДа.

Через ядерные поры из цитоплазмы в ядро транспортируются крупные молекулы белков, например, белок нуклеоплазмин, пентамер с молекулярной массой 125 кДа. Из ядра через поры выходят в цитоплазму субъединицы рибосом и другие рибонуклеопротеиды, меньшие из которых могут иметь массу 250 кДа. Эти данные показывают, что комплексы ядерных пор не представляют собой просто механические сита, которые ограничивают транспорт молекул в зависимости от их размеров.

Работы последнего времени показывают, что многие ядерные белки проходят через ядерные поры с помощью специальных механизмов, включающих узнавание и связывание крупных ядерных белков, а затем только их транслокацию, перенос через поры. Было найдено, что белки, транспортируемые в ядро, имеют определенные последовательности аминокислот — **последовательности ядерной локализации** (NLS- nuclear localization sequences), которые узнаются рецепторами ядерных пор. Такие NLS характерны для кариофильных белков, т.е. для белков ядерной локализации, которые синтезируются на рибосомах в цитоплазме, а затем транспортируются в ядро.

### 3. Импорт кариофильных белков

Впервые аминокислотные последовательности ядерной локализации были обнаружены на С-конце субъединиц молекулы нуклеоплазмина (ядерный белок, принимающий участие в структуризации хроматина). Эти эксперименты были проведены на бесклеточной системе, когда выделенные ядра помещались в цитоплазматический экстракт ооцитов ксенопуса, куда добавляли нативные или измененные молекулы нуклеоплазмина. Это крупный белок (125 кДа), состоящий из пяти субъединиц, каждая из которых обладает глобулярной и фибриллярной,

С-концевой, частями. Если удалить путем протеолиза примерно 50 аминокислот с С-конца, то ни пентамер, ни мономеры в ядро не попадают, в то время как отщепленные фибриллярные участки через поры проходят свободно, так как содержат NLS-участок.

Более того, при смешивании неядерных белков с этими NLS-фрагментами, такие комплексы способны транспортироваться в ядро. Даже крупные частицы декстрана (20 нм), неспособные проникать в ядро, при связывании с ними NLS-последовательностей нуклеоплазматина транспортировались из цитоплазматического экстракта в ядро.

Подробно строение NLS изучено у белка Т антигена вируса SV40. Кариофильный сигнал состоял из последовательности: Pro-Lys-<sup>128</sup>Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Одна лишь аминокислотная замена (<sup>128</sup>Lys на Thr или Asp) полностью лишают этот фрагмент кариофильных свойств. Оказалось, что можно создавать химерные белки с этим аминокислотным доменом, что позволяет необычные для ядер белки (альбумин плазмы, иммуноглобулин G, и даже ферритин с мол. массой 465 кДа) транспортировать через ядерные поры.

Было показано, что белок с NLS проходит в ядро через несколько этапов (рис. 10.6). Импорт начинается с того, что NLS-белок связывается с гетеродимером рецептора NLS, с белками импортинами  $\alpha$  и  $\beta$ , локализованными в цитоплазме. Возникший белковый комплекс (импортируемый белок с NLS, связанный с импортинами  $\alpha$  и  $\beta$ ) подходит к внешней ядерной мембране и закрепляется на цитоплазматических филаментах порового комплекса. Затем этот комплекс входит в ядерную пору и проходит через «транспортёр». Считается, что транспортёр состоит из множества извитых белковых филаментов, обогащенных аланином и глицином (FG-филаменты), представляющих собой барьер для транспорта некариофильных белков. Комплекс же, имеющий NLS как бы разрушает эту сеть и проходит через канал транспортера. После перехода комплекса в нуклеоплазму импортин  $\beta$  связывается с белком RAN, представляющего собой малую GTP-азу, что приводит к распаду комплекса. Импортируемый белок освобождается и остается в ядре, импортин  $\alpha$  возвращается в цитоплазму, так же как и импортин  $\beta$ , но в связи с RAN-GDP, где

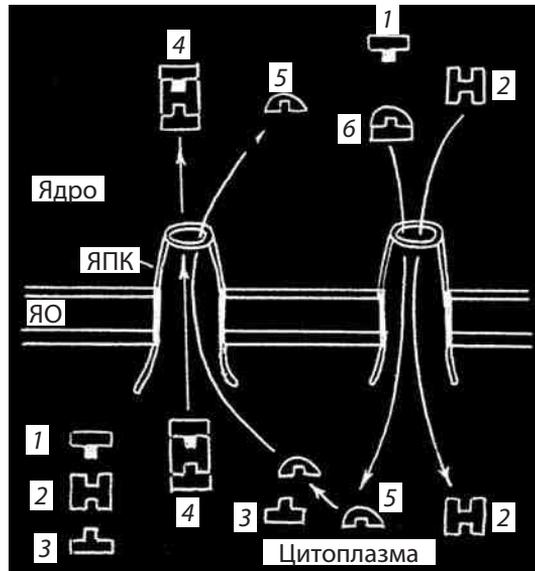


Рис. 10.6. Схема импорта цитоплазматических белков в ядро:

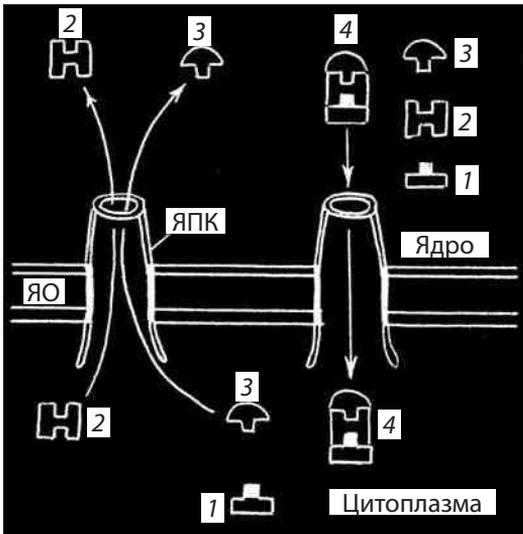
ЯПК — комплекс ядерной поры; ЯО — ядерная оболочка; 1 — импортируемый белок с NLS; 2 — импортин  $\alpha$ ; 3 — импортин  $\beta$ ; 4 — импортируемый комплекс; 5 — белок Ran; 6 — комплекс Ran-импортин  $\beta$

последние также диссоциируют. Тем самым только белок с NLS остается в составе ядра (см. рис. 10.6).

#### 4. Экспорт из ядра в цитоплазму

Из ядра в цитоплазму также существует поток как белков, так и ядерных транскриптов в виде рибонуклеопротеидов. В принципе этот экспорт по своей организации сходен с процессом импорта кариофильных белков. Так было обнаружено, что гликопротеидные молекулы, связывающие лиганды, локализируются в месте поровых комплексов и со стороны ядра. Одна и та же пора может принимать участие как в импорте, так и в экспорте макромолекул. В пользу этого говорит то, что частички коллоидного золота, связанного с нуклеоплазмином, сорбируются на ядерной поре со стороны цитоплазмы, одновременно с сорбцией частичек, связанных с РНК, инъецированных в ядро ооцитов. Подобные эксперименты показали, что многие РНК (тРНК, 5S РНК, поли-У и поли-А), связанные с коллоидным золотом, аккумулируются в зоне ядерных пор, а затем переносятся в цитоплазму. Более того, РНК способствует переносу через ядерную пору крупных частиц золота размером до 20 нм. Обратного переноса не происходит: аналогичные частички, инъецированные в цитоплазму ооцита, в ядро не проникают.

Что касается естественных видов РНП, то комплексы ядерных пор также должны узнавать специфический сигнал на экспорт. Белковые компоненты РНП несут аминокислотные последовательности, сигналы ядерного экспорта (NES), которые дают возможность различным РНП проходить через ядерную оболочку



**Рис. 10.7.** Схема экспорта ядерных белков в цитоплазму:

ЯПК — комплекс ядерной поры; ЯО — ядерная оболочка; 1 — экспортируемый белок с NES; 2 — экспортин; 3 — белок Ran; 4 — экспортируемый комплекс

в цитоплазму.

В этом случае также образуется сложный комплекс, состоящий из переносимого белка с NES-последовательностью (связанного с РНК или свободного), ассоциированного с белком экспортином 1, который в свою очередь связан с белком RAN-GTP. Этот комплекс проходит через центральный канал, создаваемый транспортером, в цитоплазму, где и диссоциирует. При этом освобождается белок с NES-участком (или РНП), который остается в цитоплазме. Экспортин 1 и RAN после гидролиза GTP снова возвращаются в ядро (рис. 10.7).

В процессе экспорта РНП ядерная пора контролирует не только белковый компонент. Ядерные поры

узнают и не экспортируют короткие (100 нуклеотидов) тРНК, если в их структуре есть хоть одна замена. Транспорт незрелых форм рРНК, имеющих интронные участки, не происходит. Вообще в цитоплазме не обнаруживаются незрелые рРНК. Вероятно, для экспорта некоторых рРНК необходима их связь с особыми белками.

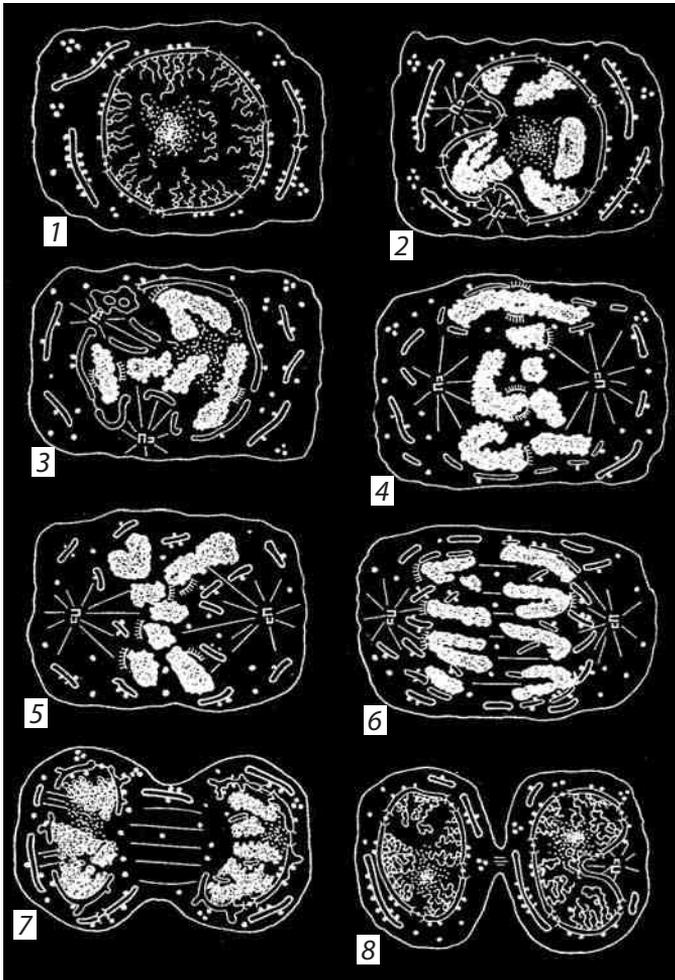
Мало изучен вопрос о транспорте в цитоплазму крупных РНП-комплексов, таких как субъединицы рибосом, информосомы и малые ядерные РНП. Возможно, все они под действием каких-то факторов разворачиваются, меняют свою конформацию и проходят через поровый комплекс. В пользу этого говорят наблюдения гантелевидных рРНК-содержащих частиц, в просвете пор ядер гигантских слюнных желез насекомых. Считается, что эта картина отражает момент выхода из ядер РНП-частиц 60 нм в диаметре, относимых к информоферам. Интересно, что состав белков в цитоплазматических информационных РНП иной, это может говорить о том, что в зоне поровых комплексов происходит «переодевание» информационных рРНК, связь их с иными белками.

## 5. Динамика ядерной оболочки в митозе

Большей частью, но не у всех видов (исключение составляют амёбы, эвгленовые, инфузории, динофлагелляты, многие водоросли, некоторые грибы), ядерная оболочка разрушается при митозе и снова возникает после деления клеток. Это так называемый *открытый тип митоза* (рис. 10.8). При этом в профазе по мере конденсации хромосом ядерная оболочка теряет с ними связь, а затем в ней появляются разрывы. Она приобретает вид плоских мембранных вакуолей, цистерн. В это время ядерные поры еще видны. Позднее они исчезают. Во время митоза комплекс ядерной поры с молекулярной массой 120 мДа разбирается на субкомплексы примерно по 1 мДа. Разборка пор начинается с фосфорилирования ряда нуклеопоринов митотической *cdc2/циклин В*-киназой (см. ниже).

Ядерная оболочка превращается в скопление мелких мембранных пузырьков, окружающих зону бывшего интерфазного ядра. Такие пузырьки морфологически нельзя отличить от других мелких вакуолей в цитоплазме, они, вероятно, сливаются с вакуолями эндоплазматического ретикулума. В метафазе мембранные элементы цитоплазмы отесняются к периферическим зонам клеток микротрубочками веретена деления.

В конце анафазы, когда прекращается движение хромосом к противоположным полюсам клетки, мембранные пузырьки цитоплазмы, и в первую очередь мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулума (см. ниже), начинают контактировать с поверхностью хромосом. Эти контакты происходят сначала в небольшом числе точек, но затем начинается перестройка и рост этих первичных зачатков ядерной оболочка. Они из мелких пузырьков превращаются в плоские вакуоли, которые растут в ширину и обволакивают поверхность деконденсирующихся хромосом. Участки таких растущих плоских мембранных мешков сливаются, замыкая и отгораживая содержимое нового интерфазного ядра. Интересно, что ядерные



**Рис. 10.8.** Поведение ядерной оболочки при митозе животной клетки:

1 — интерфаза; 2, 3 — профаза; 4 — прометафаза; 5 — метафаза; 6 — анафаза; 7 — телофаза;

8 — реконструкция дочерних ядер. Хромосомы в профазе теряют контакт с ядерной оболочкой и в конце анафазы вступают в объединение с мембранами цитоплазмы (по О.В. Зацепиной и др., 1976)

Было показано, что если вызвать преждевременную деконденсацию метафазных хромосом, то они очень быстро контактируют с мембранными пузырьками и одеваются каждая своей отдельно ядерной оболочкой, вследствие чего в клетке возникает множество так называемых микроядер, каждое из которых возникло из одной хромосомы.

С другой стороны, можно экспериментально вызвать разборку ядерной оболочки у интерфазного ядра. Это происходит, если слить в культуре ткани две клетки на разных стадиях клеточного цикла и получить т.н. гетерокарион, где

поры появляются на самых ранних этапах реконструкции ядерной оболочки, когда двойные мембранные цистерны еще не сомкнулись и фактически ничего не разделяют.

При реконструкции ядерной оболочки происходит сборка ядерных пор. Она начинается с образования ямки при слиянии внешней и внутренней ядерной мембраны, которая затем превращается в отверстие. В этом процессе принимают участие интегральные белки gp 210 и POM 121, которые впоследствии будут закреплять ЯПК на мембранах.

За этим следует появление внутренних структур ЯПК: комплекс кольца, спиц, добавление звездчатого кольца и других структур, и, наконец, филаментов.

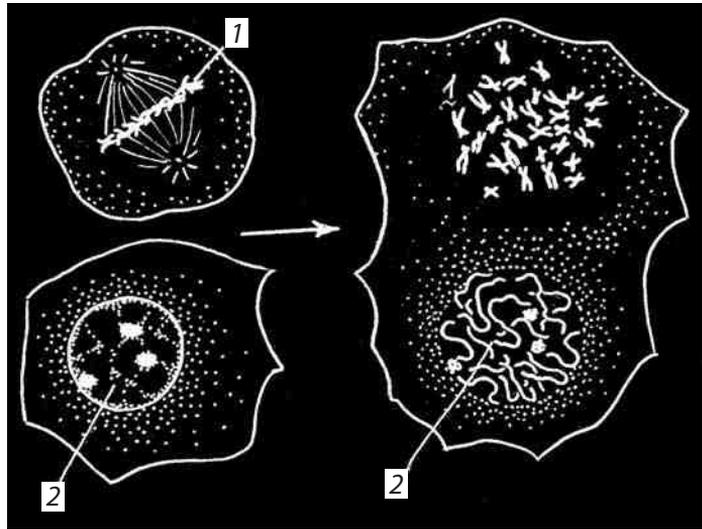
По-видимому, для реконструкции ядерной оболочки необходимым условием является деконденсация хромосом.

одно из ядер будет находиться в интерфазе, а другое быть в виде митотических хромосом в метафазе. В этом случае в интерфазном ядре начинает конденсироваться хроматин, образуются преждевременно конденсированные хромосомы, а ядерная оболочка исчезнет так же как во время нормального митоза (рис. 10.9). Эти данные говорят о том, что в цитоплазме митотической клетки существуют какие-то факторы, вызывающие как

конденсацию хромосом, так и параллельный этому процесс распада ядерной оболочки (см. раздел «Регуляция клеточного цикла».)

Сходная динамика совпадения процессов перестройки хромосом и ядерной оболочки наблюдается и в другой системе, в цитоплазме ооцитов или в бесклеточных цитоплазматических экстрактах ооцитов. Так, если в цитоплазму ооцита амфибий на стадии метафазы инъецировать выделенные интерфазные ядра, то их ядерная оболочка разбирается, а хроматин конденсируется в виде митотических хромосом. Если же в ооцит на стадии интерфазы ввести митотические хромосомы, то они начинают деконденсироваться, появляются множественные мелкие вакуоли, которые сливаясь друг с другом, образуют ядерные оболочки. Интересно, что в цитоплазму интерфазного ооцита можно ввести даже чужеродную чистую ДНК, которая, связываясь с гистонами в цитоплазме, образует хроматиновые глыбки, которые в свою очередь одеваются ядерными оболочками и превращаются в микроядра.

Эти экспериментальные приемы вместе с методом иммунофлуоресценции позволили проследить судьбу многих белков ядерной оболочки во время митоза. Подробно изучена судьба ламинов. Было найдено, что фиброзный слой ламинов деполимеризуется параллельно распаду ядерных мембран и конденсации хроматина. Этому предшествует обильное (в 7 раз выше, чем в интерфазе) фосфорилирование ламинов. Ламины А и С при этом деполимеризуются до димеров и тетрамеров и, переходя в растворимое состояние, равномерно распределяются в цитоплазме вне связи с другими структурами. Ламин В тоже деполимеризуется до олигомеров, но остается связанным с мембранными пузырьками, возникшими из ядерной оболочки.



**Рис. 10.9.** Преждевременная конденсация хромосом и растворение ядерной оболочки в гетерокарионе:

1 — митотические хромосомы донорской клетки; 2 — ядро клетки-реципиента

При сборке ядерной оболочки в телофазе белки ламинины иммунохимически начинают выявляться в центромерных и теломерных участках хромосом. Там же обнаруживаются первые признаки образования новой ядерной оболочки и накапливаются антитела к белкам порового комплекса. В бесклеточной системе цитоплазматического экстракта ооцитов было показано, что ассоциация растворимых в митозе ламин А и С происходит независимо от ламин В. Оказалось, что если систему реконструкции ядерной оболочки лишить ламин В, то ламин А и С связываются с поверхностью хромосом, но сборки ядерной оболочки не происходит. В экстракте, лишенном ламин А и С, ламин В связывается с хромосомами, но нормальная ядерная оболочка так же не формируется.

В патологически измененных клетках в интерфазе ядерная оболочка ведет себя как большинство мембранных вакуолярных компонентов: перинуклеарное пространство может расширяться при общем клеточном набухании, может образовывать пузырчатые выросты, терять рибосомы на внешней ядерной мембране. При фрагментации митотических хромосом ядерная оболочка одевает каждый фрагмент, что приводит к образованию микроядер. Например, при подавлении расхождения хромосом в т.н. К-метафазе (см. ниже) хромосомы превращаются в отдельные микроядра, которые потом могут сливаться друг с другом при возникновении полиплоидной клетки. Если же клетка с микроядрами все же подвергнется делению, то образуются клетки с нарушенным кариотипом — анеуплоидные клетки, которые быстро погибают или же могут дать начало опухолевым клеткам.

# Часть III

## СТРОЕНИЕ И ХИМИЯ ЦИТОПЛАЗМЫ

*Цитоплазма — это тот компонент клетки, который остается, если исключить ядро.*

Цитоплазма может занимать у разных типов клеток различные объемы. Так у лимфоцитов ее объем примерно равен объему ядра, у гепатоцита, наоборот, ядро занимает всего около 6% от общего объема клетки, у нейронов эта доля в 600 раз меньше.

Так же как и ядро цитоплазма многокомпонентна. Уже в световой микроскоп в цитоплазме живой клетки видны какие-то вкрапления, неоднородности, частички. Особенно неоднородность цитоплазмы видна при изучении ее в электронном микроскопе. Формально структуру цитоплазмы подразделяют на три части: **органеллы, включения, гиалоплазма** (основная плазма, цитозоль). Органеллы — обязательные для любой клетки компоненты, без которых клетка просто не может поддерживать свое существование; включения — необязательные компоненты, которые представляют собой или отложения запасных веществ (гликоген, желточные гранулы, капли жира или скопление продуктов метаболизма). И органеллы и включения погружены в гиалоплазму — жидкую фазу цитоплазмы клетки. Важно напомнить, что клетка как таковая представляет собой мембранный мешочек, заполненный водным раствором белка. Вот примерный химический состав клетки: вода — 85%, белок — 10, ДНК — 0,4, РНК — 0,7, липиды — 2, неорганические соли — 1, органические соединения — 1%. Примерно 25% от сухого веса клеточных белков приходится на белки жидкой фазы эукариотической клетки, на гиалоплазму. В бактериальных клетках, бедных мембранными элементами, на долю белков гиалоплазмы приходится около половины всех белков клетки.

# Глава 11

## Гиалоплазма и органеллы

Термин *гиалоплазма* (от *hyaline* — прозрачный), *основная плазма*, — *матрикс цитоплазмы или цитозоль* обозначают очень важную часть клетки, ее истинную внутреннюю среду. Гиалоплазму достаточно просто получить в виде фракции. Для этого путем дифференциального центрифугирования осаждают из гомогенатов клеток все тяжелые компоненты вплоть до рибосом. Надосадочная жидкость в этом случае и представляет собой растворимый компонент цитоплазмы, **цитозоль или гиалоплазму**. Цитозоль — не просто разбавленный водный раствор; его состав весьма сложен, а консистенция приближается к гелю (желе).

**Гели** — это структурированные коллоидные системы с жидкой дисперсной средой. Частицы *дисперсной* фазы соединены между собой в рыхлую пространственную сетку, которая содержит в своих ячейках *дисперсную* среду, лишая текучести систему в целом. Гель гиалоплазмы или цитозоль относится к т.н. тиксотропным гелям, которые под воздействием внешних условий (температура, давление) или внутренних факторов (факторов стабилизации или деполимеризации) могут менять свое агрегатное состояние и переходить в менее вязкую, более жидкую фазу — в золь (раствор). Такие гель-золь переходы очень характерны для гиалоплазмы. Так, например, при высоких гидростатических давлениях цитоплазма не уплотняется, а обратимо разжижается. Отдельные зоны гиалоплазмы могут менять свое агрегатное состояние в зависимости от условий или от функциональной задачи. Так, известно, что отдельные молекулы белков-тубулинов могут быть диспергированы в гиалоплазме, но в определенные моменты они начинают собираться и строить длинные трубчатые структуры — микротрубочки. Этот процесс самосборки микротрубочек обратим: при изменении условий жизни клетки (повышение давления или изменение проницаемости мембран клетки) микротрубочки распадаются до мономерных молекул тубулинов. Таким же образом в бесструктурной на первый взгляд гиалоплазме могут возникать и распадаться различные фибриллярные, нитчатые комплексы белковых молекул.

Подобные гель-золь переходы могут определяться также другими белками, например, актином, количество которого в некоторых немышечных клетках может достигать 10%. При взаимодействии фибриллярного актина с белками типа фимбрина происходит стабилизация геля, а при связывании с белками, активность некоторых зависит от концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  (гельзолин), происходит фрагментация фибрилл и переход всей системы в жидкое состояние (золь). Таким путем может меняться состояние цитоплазмы в различных участках клетки, что обеспечивает движение всей клетки или отдельных ее внутриклеточных компонентов.

Функциональное значение гиалоплазмы очень велико. Здесь локализованы ферменты, участвующие в синтезе аминокислот, нуклеотидов, жирных кислот, метаболизма сахаров. В гиалоплазме происходит синтез и отложение запасного полисахарида гликогена, накопление запасных жировых капель, состоящих из триацилглицероидов. Здесь же происходят процессы гликолиза и синтез части АТФ. В гиалоплазме на рибосомах и полирибосомах, несвязанных с мембранами, происходит синтез белков, необходимых клетке для поддержания ее жизнедеятельности, для построения ее органелл. Здесь же происходит активация аминокислот с помощью специфических ферментов и связывание их с трансферными РНК. В цитозоле также происходит модификация ферментов (например, фосфорилирование), приводящее к их активации или к инактивации, происходит деградация, расщепление белков, с помощью специфических протеиназ и др.

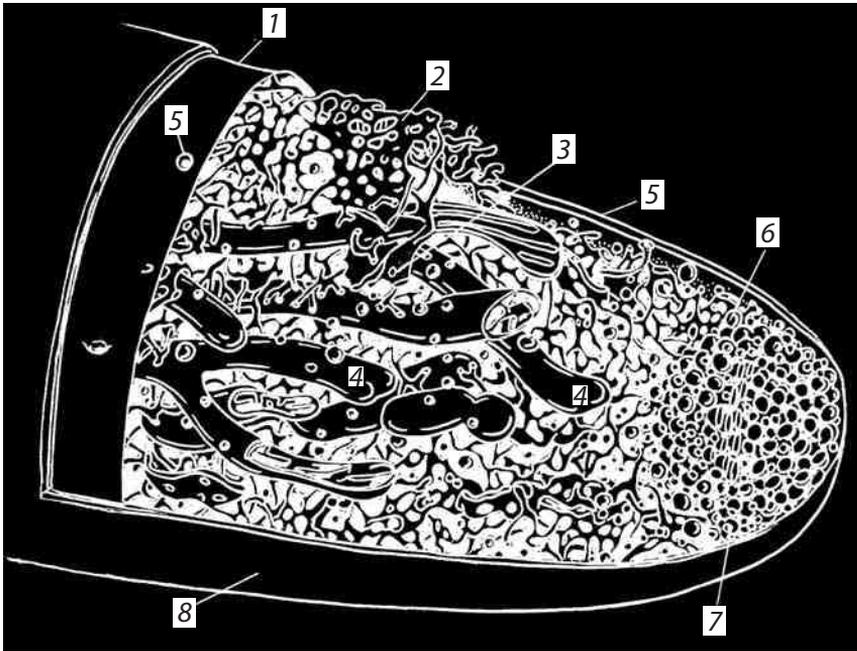
В цитозоле на расположенных там рибосомах синтезируются белки, транспортируемые в различные участки клетки. Здесь же осуществляется синтез всех белков клеточного ядра, большая часть белков митохондрий и пластид, основные белки пероксисом. Эти группы белков имеют свои сигнальные аминокислотные последовательности, которые узнаются соответственно ядерными порами, или мембранами, что позволяет этим белкам транспортироваться через мембраны и попадать внутрь митохондрий, пероксисом.

Синтез секреторных белков, белков лизосом, внеклеточного матрикса также начинается в гиалоплазме, но после контакта с мембранами гранулярного эндоплазматического ретикулама комплекс рибосома-информационная РНК-пептид оказывается связанным с мембранами, а синтезирующийся белок ко-трансляционно переносится через мембрану и оказывается в полости мембранных вакуолей.

Кроме структурных белков и ферментов в цитозоле в растворенном состоянии содержится огромное количество аминокислот, нуклеотидов и других строительных блоков биополимеров, а также множество метаболитов — промежуточных продуктов, возникающих при синтезе и распаде макромолекул.

Гиалоплазма содержит большое количество ионов, неорганических соединений, таких как  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  и др. При этом концентрация этих ионов строго детерминирована и регулируется мембранными компонентами клетки.

Формально, по морфологическим признакам, обязательные компоненты цитоплазмы, **органеллы или органоиды**, можно разделить на две группы: мембранные и немембранные (см. рис. 1.5). Мембранные органеллы так же представлены двумя вариантами: одномембранные и двумембранные. К первым относятся органеллы вакуолярной системы — эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы, пероксисомы и другие специализированные вакуоли, а также плазматическая мембрана. К двумембранным органеллам относятся митохондрии, а также клеточное ядро. К немембранным органеллам принадлежат рибосомы, клеточный центр животных клеток, постоянно присутствующие в клетках. Что же касается элементов клеточного скелета, цитоскелета, постоянной компоненты клетки, его выраженность может значительно меняться в течение клеточного цикла, от полного исчезновения одного компонента (например, цитоплазматические микротрубочки во время митоза), до появления новых структур (веретено митоза).



**Рис. 11.1.** Модель апикального района гифа гриба:

1 — плазматическая мембрана; 2 — эндоплазматический ретикулум; 3 — мембраны аппарата Гольджи; 4 — митохондрии; 5 — впячивания плазматической мембраны; 6 — апикальные вакуоли; 7 — микропузырьки; 8 — слой клеточной стенки (по Girbardt, 1969)

Общим свойством мембранных органелл является то, что они построены из липопротеидных пленок, или перепонок, тонких слоев, замыкающихся сами на себя так, что они образуют замкнутые полости и тем самым разделяют цитоплазму на группу различных отсеков. Внутреннее содержимое этих отсеков или вакуолей всегда отличается от содержимого гиалоплазмы. Толщина таких пленок-мембран очень мала — около 7–10 нм, по весу они занимают около 4% от веса клетки, но очень значительна площадь клеточных биомембран. Так, гепатоцит, имеющий в поперечнике около 20 мкм и занимающий объем около 5000 мкм<sup>3</sup>, окружен плазматической мембраной с общей площадью 2200 мкм<sup>2</sup>. Общая же площадь его внутриклеточных мембран в 50 раз больше и составляет 110 000 мкм<sup>2</sup> (!). В электронном микроскопе цитоплазма клеток представляется как бы заполненной пеной из замкнутых мембранных пузырьков, имеющих разную форму: округлые вакуоли, плоские замкнутые мешочки, извитые трубки и т.д. В гепатоците на долю плазматической мембраны приходится примерно 2% от всех клеточных мембран, на вакуолярную систему — 58%, на митохондрии — 40%, на внутреннюю мембрану ядра — около 0,2%. Из приведенных выше данных видно, что мембраны клетки, или как их называют биомембраны, занимают одно из ведущих мест в структурной и функциональной организации клетки (рис. 11.1).

# Глава 12

## Общие свойства биологических мембран – липопротеидных комплексов

Все без исключения клеточные мембраны построены по общему принципу: это тонкие липопротеидные пленки, состоящие из двойного слоя липидных молекул, в который включены молекулы белка. В весовом отношении в зависимости от типа мембран на долю липидов приходится 25–60%, на долю белков 40–75%. В состав многих мембран входят углеводы, количество которых может достигать 2–10%.

### 1. Структурной основой мембран является двойной слой липидов

К липидам относится большая группа органических веществ, обладающих плохой растворимостью в воде (гидрофобность) и хорошей растворимостью в органических растворителях (липофильность). Состав липидов, входящих в мембраны клетки, очень разнообразен (рис. 12.1). Характерные представители липидов,

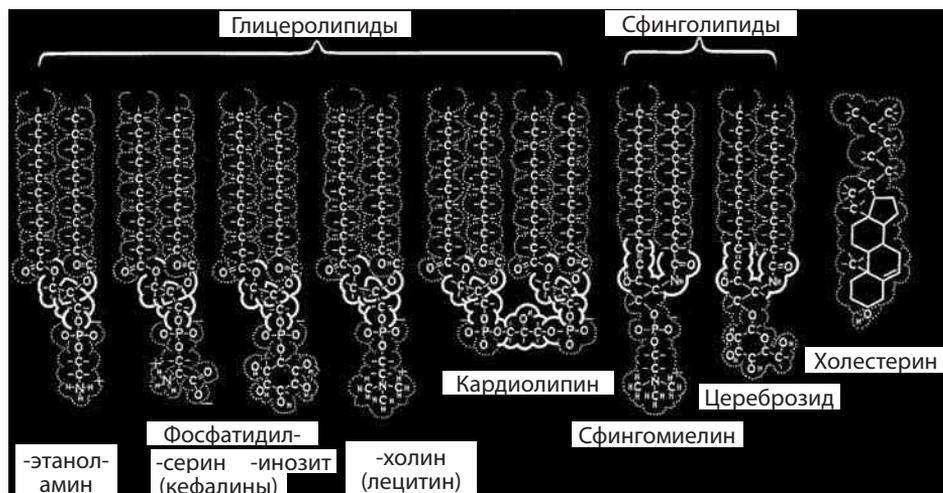


Рис. 12.1. Структурные формулы некоторых важнейших липидов

встречающиеся в клеточных мембранах, — **фосфолипиды** (глицерофосфатиды), **сфингомиелины** и из стероидных липидов — **холестерин**.

Глицерофосфатиды, или глицеролипиды, представляют собой сложные эфиры трехатомного спирта глицерина с двумя жирными кислотами и с фосфорной кислотой, которая в свою очередь может быть связана с различными химическими группами (холин, серин, инозит, этаноламин и др.). Например, в структуру наиболее часто встречающегося в мембранах глицеролипида лецитина входят участки двух жирных кислот, глицерина, фосфорной кислоты и холина.

Другая группа мембранных липидов называется сфингомнелиновой, в ней глицерин замещен аминокислотой сфингозином.

Из липидов, относящихся к стероидам, больше всего в мембранах холестерина. В растительных клетках холестерин не обнаружен, его там заменяют фитостерины. У бактерий стерины отсутствуют.

Характерной особенностью липидов мембран является разделение их молекулы на две функционально различные части: неполярные (не несущие зарядов) хвосты, состоящие из жирных кислот, и заряженные полярные головки (рис. 12.2). Полярные головки несут на себе отрицательные заряды или могут быть нейтральными (в случае, если они имеют одновременно положительные и отрицательные заряды). Наличие неполярных хвостов липидов объясняет их хорошую растворимость в жирах и органических растворителях.

Если полярные липиды смешать с водой, то образуется эмульсия, состоящая из мицелл. При этом незаряженные (гидрофобные) хвосты будут стремиться образо-

вывать однородную фазу в центре мицеллы, и заряженные, гидрофильные, головки будут торчать в водную фазу. Холестерин сам по себе мицелл не образует, но легко включается в мицеллы полярных липидов, в результате чего образуются мицеллы смешанного типа. Если, наоборот, к липидам добавить немного масла, то образуются мицеллы, как бы вывернутые наизнанку: их гидрофобные хвосты будут торчать в масляную фазу, а заряженные (гидрофильные) головки будут располагаться внутри мицеллы (рис. 12.3).

На поверхности воды растворы полярных липидов, растекаясь, образуют мономолекулярную пленку, в которой в водную фазу будут направлены

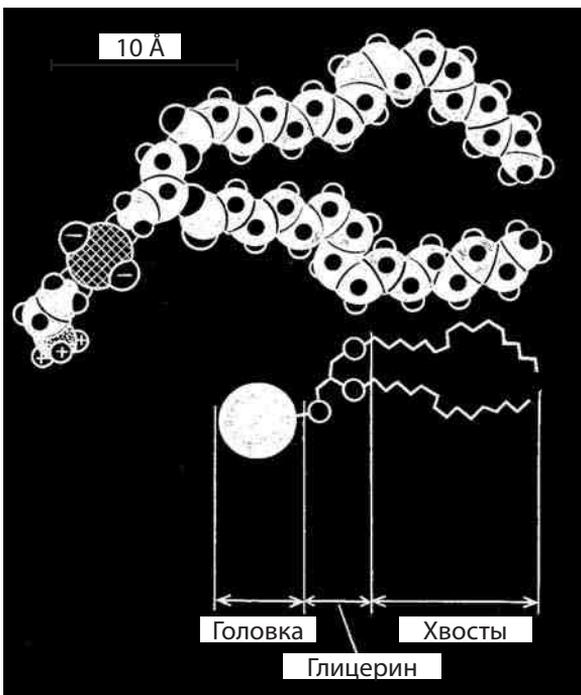


Рис. 12.2. Схема строения молекул фосфолипидов

заряженные (гидрофильные) головки, а неполярные хвосты будут обращены в сравнительно гидрофобную воздушную фазу. Смешивая с водой экстрагированные из мембран липиды или беря смеси разных липидов, можно получить бимолекулярные слои или мембраны толщиной около 7,5 нм, где периферические зоны слоя, смотрящие в водную фазу, будут содержать исключительно полярные головки, а незаряженные хвосты будут образовывать общую гидрофобную центральную зону такой образовавшейся мембраны (рис. 12.4).

Эта способность липидов самопроизвольно образовывать мембранные структуры определяется свойствами самих липидов, а именно наличием в их структуре полярных головок и неполярных хвостов.

В таких искусственных системах липидные мицеллы и мембраны могут взаимодействовать с белками своими полярными зонами или гидрофобными хвостами, при этом образуются искусственные липопротеидные мембраны, сходные с теми мембранами, которые можно выделить из клеток. Они имеют толщину около 7,5 нм. При окраске четырехокисью осмия искусственные мембраны обнаруживают в электронном микроскопе трехслойную структуру: два темных периферических слоя по 2,5 нм и светлый, центральный, примерно такой же толщины. Естественные клеточные мембраны имеют такое же строение.

Необходимо подчеркнуть, что как искусственные, так и естественные мембраны не представляют собой плоские слои, они всегда **замкнуты сами на себя**, образуя полые вакуоли, пузырьки, везикулы, плоские замкнутые мешки или трубчатые образования.

Образовавшиеся искусственные липидные мембраны служат непроницаемым барьером для любых заряженных молекул, даже для ионов солей. Это определяет основное функциональное свойство мембран - служить преградой для свободной диффузии через слой липидов. Это свойство может быть использовано для практических целей. Так при смешивании липидов в водной среде образуется масса

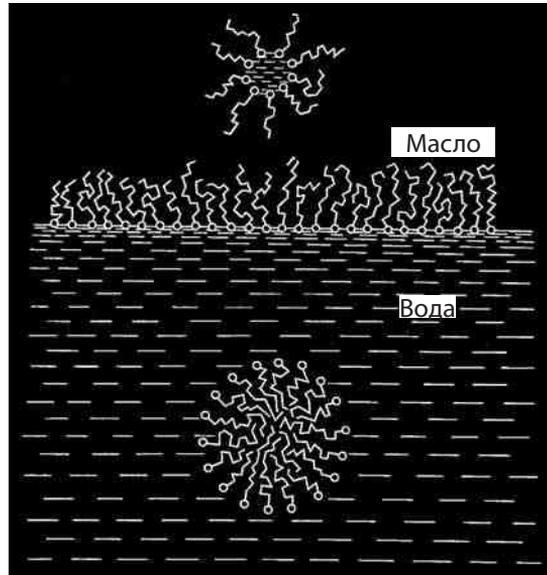


Рис. 12.3. Мономолекулярный слой липидов на поверхности раздела фаз вода–масло и мицеллы липидов в масле и воде

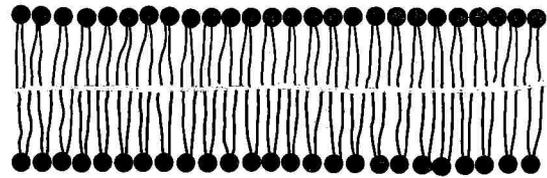
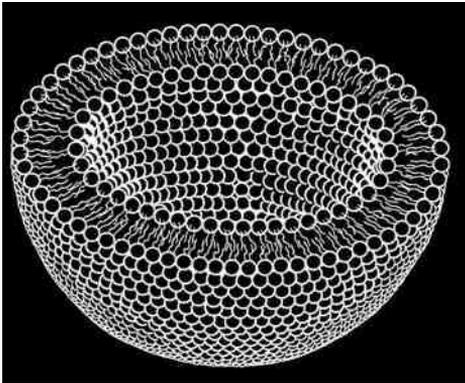


Рис. 12.4. Сплошной билипидный слой, образующийся в воде при высокой концентрации липидов



**Рис. 12.5.** Липосома: замкнутый билипидный слой в виде вакуоли

полых мембранных пузырьков, липосом (рис. 12.5). Жидкость, попавшая внутрь этих пузырьков, уже не может свободно обмениваться с жидкостью, находящейся снаружи. Таким образом искусственные мембраны липосом можно «загрузить» лекарственными веществами, которые могут в нужных концентрациях поступать к клеткам.

## 2. Мембранные белки встроены в билипидный слой

В среднем в липопротеидных мембранах белки по весу составляют 50%. Но количество белков в разных мембранах может быть различным. Так, в мембранах митохондрий на долю белков приходится около 75%, а в плазматической мембране клеток миелиновой оболочки — около 25%. Но так как липидные молекулы имеют небольшой размер (около 0,5 нм) и молекулярный вес, их число по отношению к числу белковых молекул выше в 50 раз. Поэтому белковые молекулы как бы вкраплены в билипидный слой мембраны. Часть из них связана с липидными головками с помощью ионных (солевых) связей и поэтому легко экстрагируется из мембран растворами солей. Другие образуют солевые связи с полярными участками липидов через взаимодействие с ионами  $Mg^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ , такие белки экстрагируются с помощью хелатных соединений, таких, как версен (ЭДТА). Такие легко экстрагируемые белки большей частью расположены на мембранах со стороны цитоплазмы. В цитоплазматической мембране эти белки тесно связаны с белковыми структурами цитоскелета.

Большая часть белков взаимодействует с липидами в составе мембран на основе гидрофобных связей. Оказалось, что многие мембранные белки состоят как бы из двух частей: из участков, богатых полярными (несущими заряд) аминокислотами, и участков, обогащенных неполярными аминокислотами (глицином, аланином, валином, лейцином). Такие белки в липидных слоях мембран располагаются так, что их неполярные участки как бы погружены в «жирную» часть мембраны, где находятся гидрофобные участки липидов (рис. 12.6). Полярная (гидрофильная) же часть таких белков взаимодействует с головками липидов и обращена в сторону водной фазы (рис. 12.7), поэтому такие белки, связанные с липидами путем

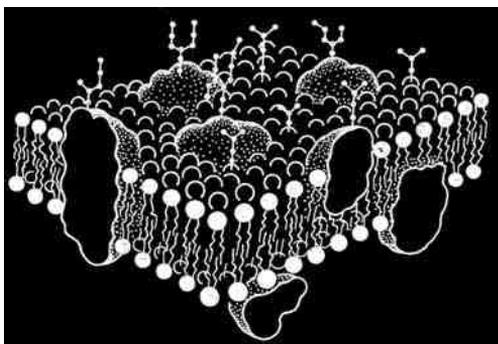


Рис. 12.6. Мозаичная модель («липидное озеро») клеточных мембран

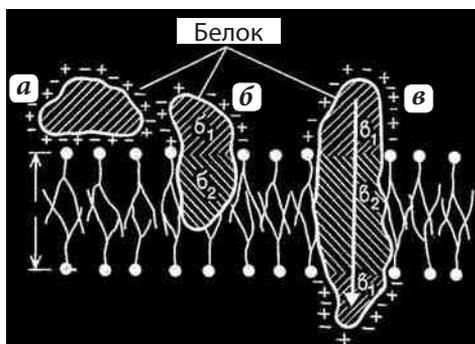


Рис. 12.7. Взаимодействие белков с липидными слоями:

а — ионные связи; б, в — гидрофильно-гидрофобные взаимодействия белков с билипидным слоем

гидрофобных взаимодействий, практически не экстрагируются в водных фазах. Их можно выделить, лишь разрушая мембрану, экстрагируя из нее липиды или органическими растворителями, или детергентами. Поэтому эти белки мембран и называют **интегральными**.

Размер интегральных мембранных белков в среднем равен 8 нм, но встречаются крупные белки — до 35 нм величиной. Обычно это очень асимметричные по своей природе белки и соответственно асимметрично локализованы в мембране: их разные функциональные части локализованы по обе стороны мембраны, и все белки данного типа расположены одинаково. С цитоплазматической стороны мембраны интегральные белки связаны с периферическими белками.

Эти представления, полученные при изучении химии клеточных мембран, были блестяще подтверждены морфологическими исследованиями. При использовании метода замораживания-скалывания, скол через мембраны может идти через центральную, липидную, зону. В этом случае обнажается масса глобул, белковой природы, находящихся в составе липидного слоя. Размер таких глобул около 4–8 нм. Эти и другие биохимические данные послужили основой для создания модели мембраны с мозаичной укладкой: мембрана состоит из неплотно упакованных белковых глобулярных белков, свободное пространство между которыми заполнено липидными молекулами (рис. 12.8). При этом часть белков может быть связана только с полярными группами липидов и может находиться на поверхности

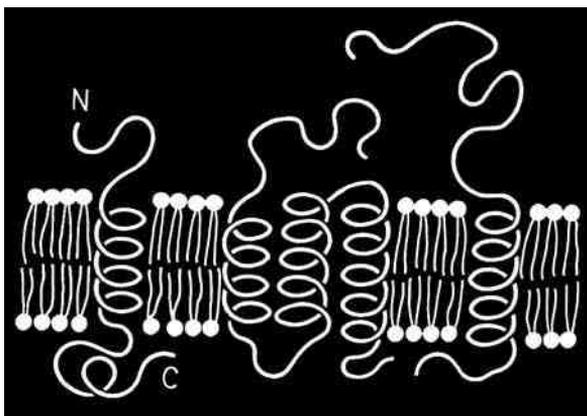


Рис. 12.8. Асимметричное расположение молекул белков в мембранах, определяемое расположением С и N-концевых и  $\alpha$ -спиральных участков полипептидных цепей

билипидного слоя; другие белки могут частично или даже полностью погружены из-за гидрофобных свойств своих участков в липидный слой; третьи — могут пронизывать мембрану насквозь. Интересно, что большая часть липидных молекул (70%) не связана с белками, так что белковые молекулы как бы плавают в «липидном озере».

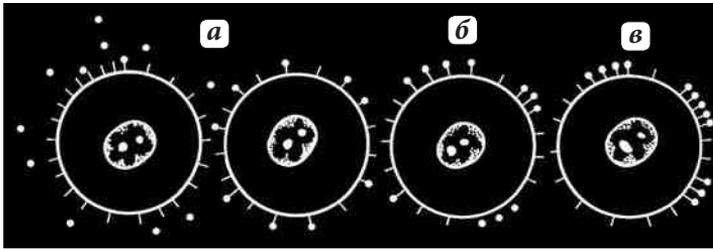
### 3. Липиды и белки мембран обладают латеральной подвижностью

Исследование искусственных липидных бислоев показало, что эти мембраны представляют собой двумерную жидкость, обладающую вязкостью, сравнимую с вязкостью оливкового масла. В составе таких и естественных мембран молекулы липидов постоянно движутся с огромной скоростью (коэффициент диффузии для них равен  $10^{-8} \text{ см}^2 \times \text{с}^{-1}$ ), достигающей 2 мкм за 1 с.

Липидные молекулы двигаются вдоль липидного слоя, могут вращаться вокруг своей оси, а также переходить из слоя в слой, что происходит редко и с помощью специальных переносчиков. Белки, плавающие в «липидном озере», также обладают латеральной, продольной подвижностью, но скорость их перемещения в десятки и сотни раз ниже. Изучать перемещение белковых молекул в составе мембран на живых клетках проще на примере плазматической мембраны. Белки плазматической мембраны, гликопротеины, часто имеют олигосахаридные цепочки, смотрящие на внеклеточную среду.

Для исследования свойств плазматической мембраны широко используются **лектины**, белки растительного происхождения, которые специфически связываются с олигосахаридами мембранных белков. Так, лектин конканавалин А (КонА), выделенный из растения канавалии мечевидной, связывается с олигосахаридами, имеющими на концах глюкозу или маннозу. Лектин из бобов сои связывается с N-ацетилглюкозамином, а лектин из проростков пшеницы, кроме того, и с галактозой. На поверхности белков-лектинов имеются два или более района специфического связывания с углеводами. Если лектины добавлять к взвеси эритроцитов, то это вызывает их осаждение, сопровождающееся слипанием — **агглютинация**. Поэтому лектины еще называют агглютининами.

Удобно регистрировать лектины на поверхности клеток с помощью иммунофлуоресцентного метода (см. выше). Использование этого метода позволило исследовать расположение белков в плоскости мембран. Так, оказалось, что при добавлении к клеткам, поверхность которых связана с КонА, антител против КонА, меченных флуорохромом, обнаруживается свечение по всей поверхности клетки. Это значит, что мембранные белки-гликопротеиды, полисахаридные цепи которых образуют слой, равномерно разбросаны по поверхности клеток. Однако через некоторое время на поверхности клетки видно не сплошное свечение, а отдельные множественные пятна или точки (их называли «заплатками», по-английски *patch*). Затем эти пятна собираются в одну зону — «колпачок». Следовательно, белки, связанные с лектинами, могут быстро перемещаться в плоскости плазматической



**Рис. 12.9.** Перемещение вдоль плазматической мембраны связанных лектинов: **а** — первичная посадка; **б** — объединение в мелкие сгустки; **в** — образование «колпачков»

мембраны. Интересно, что «колпачок» всегда формируется над тем местом клетки, где находятся центриоли и аппарат Гольджи. Дальнейшая судьба этого колпачка может быть у разных клеток различной: у фибробластов колпачки могут отделяться и отрываться от тела при движении клетки, у других (лимфоциты) происходит поглощение этих участков внутрь клетки (эндоцитоз) и переваривание их там (рис. 12.9).

#### 4. Асимметричность клеточных мембран

Состав липидов по обе стороны мембраны различен, что определяет асимметричность в строении билипидного слоя. Так, с помощью химического маркирования было найдено, что 80% сфингомиелина и 75% фосфатидилхолина, и 20% фосфатидилэтаноламина локализованы на наружной поверхности плазматической мембраны, на внутренней же располагается весь фосфатидилсерин и 80% фосфатидилэтаноламина. Примерно такую же композицию имеют мембраны эндоплазматического ретикулаума (для них наружной надо считать ту поверхность, которая обращена внутрь полости).

Особенно выражена асимметрия мембран в отношении интегральных белков. В составе естественных мембран белки строго ориентированы. Большинство их N-концы смотрят в полость вакуолей или в случае плазматической мембраны, во внешнюю для клетки среду. Такое полярное расположение цепи белковой молекулы в липидном бислое создается в процессе синтеза мембранного белка на рибосоме (см. ниже). Полуинтегральные и примембранные белки также асимметрично расположены в мембранах. Так, в эндоплазматическом ретикулауме белки-ферменты, синтезирующие липиды, расположены на цитозольной стороне мембран, а ферменты, пришивающие сахара к белковым цепочкам, гликозидазы, локализованы на внешней стороне мембраны.

Наличие углеводного компонента характерно для мембран вакуолярной системы и плазматической мембраны. Углеводный компонент мембран представлен главным образом гликопротеинами — молекулами белков, ковалентно (в отличие от нуклеопротеидов) связанных с цепочками углеводов. Как правило, цепочки углеводов расположены в наружных слоях мембран (для цитоплазматических

вакуолей наружными считают слои, обращенные не к матриксу цитоплазмы, а в полость везикул или вакуолей). Они имеют ковалентные связи с интегральными белками, образуя гликопротеиды, или с липидами (гликолипиды). Углеводы мембран представляют собой короткие линейные или разветвленные цепочки, в состав которых входят галактоза, манноза, фруктоза, сахароза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, пентозы - арабиноза и ксилоза, а также нейраминовая (сиаловая) кислота. Значение этого компонента очень велико для функционирования плазматической мембраны, эндоплазматического ретикулула, аппарата Гольджи, лизосом и эндосом.

## 5. Различные мембраны имеют различные свойства

Несмотря на поразительную схожесть строения различных мембран, построенных по принципу липидного бислоя с вмонтированными в него белками, физические и химические свойства разных мембран различны. Это связано с тем, что в разных мембранах общий состав липидов значительно различается, что определяет особые свойства мембран.

Разные мембраны клетки могут отличаться друг от друга по количеству липидов. Так, плазматическая мембрана содержит 35–40% липидов, а мембраны митохондрий — 27–29%. Самое высокое содержание липидов в плазматической мембране шванновских клеток, образующих миелиновую оболочку нервов, — до 80%.

Было обнаружено, что клеточные мембраны сильно отличаются друг от друга по составу липидов. Так, плазматические мембраны клеток животных богаты холестерином (до 30%) и в них мало лецитина, в то время как мембраны митохондрий, наоборот, богаты фосфолипидами и бедны холестерином. Из общего количества липидов содержание фосфатидилхолина (лецитина) во фракциях эндоплазматической сети составляет 60–70% от всех фосфолипидов, в то время как в плазматической мембране его может быть 25–35%.

В целом для плазматической мембраны характерно высокое содержание холестерина и сфинголипидов, а также преобладание насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов, тогда как в митохондриях, эндоплазматической сети и во многих других цитоплазматических мембранах содержится мало холестерина и сфинголипидов и сравнительно много полиненасыщенных жирных кислот. Видимо, в связи с этим мембраны цитоплазмы менее жесткие, чем плазматическая мембрана, они более «легкоплавки».

Особенно отличаются мембраны по составу белков, которые, главным образом, определяют функциональные свойства мембран.

По биологической роли мембранные белки можно разделить на три группы: ферменты, рецепторные белки и структурные белки.

Набор ферментов в составе мембран может быть очень велик и разнообразен (например, в плазматической мембране клеток печени обнаружено не менее 24 различных ферментов). В разных мембранах существует характерный набор

ферментов. Например, в плазматической мембране, как и во многих других, локализуется  $K^+-Na^+$ -зависимая АТФаза, участвующая в транспорте ионов. В митохондриях специфическим является набор белков — переносчиков электронов и фермент АТФ-синтетаза, обеспечивающие окислительное фосфорилирование и синтез АТФ.

Рецепторные белки специфически связываются с теми или иными веществами и как бы их узнают. Это белки-рецепторы для гормонов, для узнавания поверхности соседних клеток, вирусов, фагов у бактерий и т.д. К этой группе относятся фоторецепторные белки. Вообще же рецепторные белки входят в состав любых мембран. Так, на внешней мембране митохондрий расположены рецепторы, участвующие в узнавании и транспорте митохондриальных белков, переносимых из цитозоля в митохондрии. На мембранах эндоплазматического ретикулума находятся рецепторы, узнающие и связывающие рибосомы, на ядерной оболочке — рецепторы кариофильных белков и т.д. На плазматической мембране расположены как рецепторы, узнающие соседние клетки или даже отдельные ионы солей (переносчики), так и белки, узнающие белки цитоскелета в цитоплазме.

## 6. Связь мембран с цитоплазматическими белками

Со стороны цитоплазмы мембраны связаны через примембранные или собственно мембранные интегральные белки с разнообразными белковыми структурами цитоплазмы. К ним относятся в первую очередь компоненты цитоскелета. Это позволяет не только сделать мембраны более жесткими, но и обеспечивает подвижность мембран, создавая возможности для их транспортных функций. Например, жесткость плазматической мембраны безъядерных эритроцитов создается за счет связывания сети цитоплазматических белков с интегральными белками плазмалеммы. В ее состав входит белок, т.н. «белок полосы III», который обеспечивает транспорт ионов через бислой, но одновременно через ряд белков связывается с сетью **белков-спектринов**, которые создают жесткую подмембранную сеть (рис. 12.10). Во многих эпителиальных клетках специальные белки плазматической мембраны связываются с элементами цитоскелета и участвуют в образовании целого ряда межклеточных соединений (десмосомы, адгезивный контакт и др.). С элементами цитоскелета связаны также оболочки клеточного ядра: внешняя ядерная мембрана тесно ассоциирована с промежуточными фи-

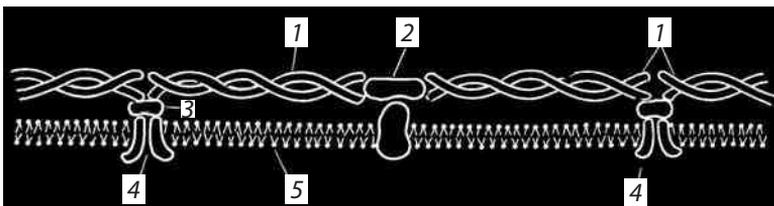


Рис. 12.10. Примембранные белки эритроцитов:

1 — спектрин; 2 — актин; 3 — анкирин; 4 — белок III полосы; 5 — плазмалемма

ламентами, которые фиксируют ядро в объеме цитоплазмы. Внутриклеточные вакуоли могут перемещаться в клетке только при взаимодействии с фибриллярными компонентами, такими как микротрубочки и микрофиламенты. Митохондрии перемещаются в клетке также за счет ассоциации с элементами цитоскелета.

## 7. Рост некоторых мембран происходит за счет встраивания готовых мембранных пузырьков

После деления клеток происходит увеличение объемов растущих дочерних клеток и тем самым рост клеточной поверхности, увеличение площади плазматической мембраны. Но это не единственный пример быстрого роста объема и поверхности. С большой скоростью растут отростки фибробластов и нейронов в культуре ткани. Такую большую скорость роста плазматической мембраны можно объяснить только тем, что происходит быстрое встраивание, интеркаляция, пузырьков в растущую плазматическую мембрану. Здесь, внутриклеточные мембранные пузырьки подходят к внутренней стороне плазматической мембраны (возможно, их подгоняют к себе микрофиламенты кортикального слоя), происходит слияние мембран и тем самым увеличение поверхности плазматической мембраны (рис. 12.11).

Откуда же берутся эти готовые блоки, мембранные пузырьки? Удалось проследить (см. ниже), что первичный генезис мембран происходит в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме, который является источником всех клеточных мембран, кроме мембран митохондрий и пластид. От мембран гранулярного ЭПР отщепляются мелкие вакуоли, которые сливаются с мембранами аппарата Гольджи, от которого в свою очередь, отщепляются мелкие мембранные вакуоли, сливающиеся или с лизосомами, или с плазматической мембраной, или с секреторными вакуолями.

Таким образом, наблюдается последовательный каскад переходов одних мембран в другие. Первичные же мембранные вакуоли строятся за счет синтеза белка и липидов на мембранах гранулярного ЭПР.

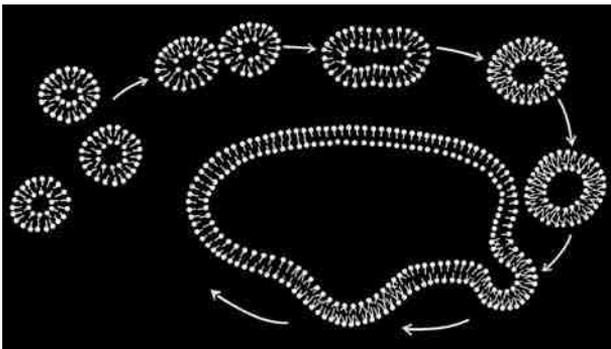


Рис. 12.11. Слияние клеточных мембран с мембранными вакуолями

Рост мембран митохондрий и пластид иного характера. Увеличение площади мембран митохондрий происходит за счет синтеза основной массы белков и липидов в гиалоплазме клетки, вслед за чем эти митохондриальные белки и липиды транспортируются через мембранную оболочку митохондрий и встраиваются в их компоненты.

# Глава 13

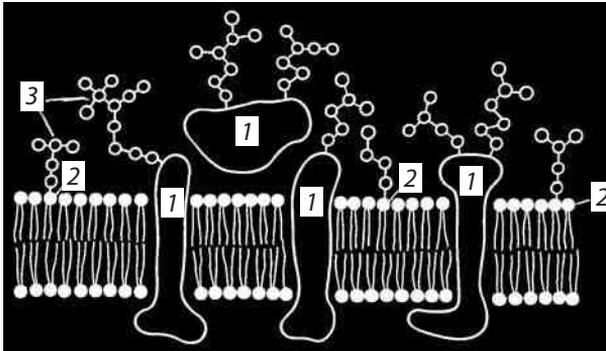
## Плазматическая мембрана, плазмолемма

**Плазматическая мембрана**, или **плазмолемма**, среди различных клеточных мембран занимает особое место. Это поверхностная периферическая структура, ограничивающая клетку снаружи, что обуславливает ее непосредственную связь с внеклеточной средой, а следовательно, со всеми веществами и стимулами, воздействующими на клетку. Необходимо отметить, что кроме как с эндосомами и секреторными везикулами плазматическая мембрана ни с какими внутриклеточными мембранами не контактирует. Поэтому плазматической мембране принадлежит роль быть барьером, преградой между сложно организованным внутриклеточным содержимым и внешней средой. В этом случае плазмолемма выполняет не только роль механического барьера, но, главное, ограничивает свободный поток низко- и высокомолекулярных веществ в обе стороны через мембрану. Более того, плазмолемма выступает как структура «узнающая», рецептирующая, различные химические вещества и регулирующая избирательно транспорт этих веществ в клетку и из нее. Другими словами, плазматическая мембрана осуществляет функции, связанные с регулируемым избирательным трансмембранным транспортом веществ и выполняет роль первичного клеточного анализатора. Плазмолемму можно считать клеточным органоидом, входящим в вакуолярную систему клетки. Как и другие мембраны этой системы (мембраны лизосом, эндосом, аппарата Гольджи и др.) она возникает и обновляется за счет синтетической активности эндоплазматического ретикулума и имеет сходную композицию. Плазматическую мембрану можно уподобить мембране внутриклеточной вакуоли, но вывернутой наизнанку: она не окружена гиалоплазмой, а окружает ее.

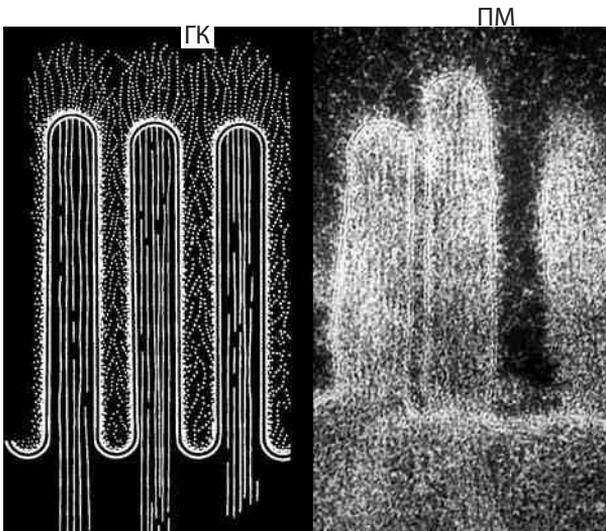
Морфологические патологические изменения плазматической мембраны проявляются в основном при изменении ее проницаемости для водных растворов, что приводит к набуханию всей клетки. При этом падает число микроворсинок, их длина уменьшается. В ряде случаев на поверхности клеток возникают вздутия, пузыри, которые в процессе гибели клеток при апоптозе отрываются от тела клетки (апоптотические тельца). При этом может нарушаться целостность межклеточных контактов в эпителиальных пластах, что приводит к отделению клеток друг от друга.

### 1. Барьерно-транспортная роль плазмалеммы

Окружая клетку со всех сторон, плазматическая мембрана выполняет роль механического барьера. Для того чтобы проколоть ее с помощью микроигл или



**Рис. 13.1.** Схема строения плазматической мембраны: часть белков (гликопротеиды) (1) и липидов (гликолипиды) (2) связана с полисахаридами, образуя слой гликокаликса



**Рис. 13.2.** Гликокаликс (ГК) на поверхности плазматической мембраны (ПМ) микроворсинок щеточной каемки энтероцита:

**а** — схема; **б** — ЭМ-фото

микропипеток, требуется довольно большое усилие. При давлении на нее микроиглы она сначала сильно прогибается, а лишь затем прорывается. Искусственные липидные мембраны менее устойчивы. Эта механическая устойчивость плазматической мембраны может определяться дополнительными компонентами, такими как гликокаликс и кортикальный слой цитоплазмы (рис. 13.1).

**Гликокаликс** представляет собой внешний слой плазматической мембраны, содержащий полисахаридные цепочки мембранных интегральных белков — гликопротеидов. Эти цепочки содержат такие углеводы как манноза, глюкоза, N-ацетилглюкозамин, сиаловая кислота и др. Такие углеводные гетерополимеры образуют ветвящиеся цепочки, между которыми могут располагаться выделенные из клетки гликолипиды и протеогликаны. Слой гликокаликса сильно обводнен, имеет желеподобную консистенцию, что значительно снижает в этой зоне скорость диффузии различных веществ. Здесь же могут «застревать» выделенные клеткой гидролитические ферменты, участвующие во внеклеточном расщеплении полимеров (внеклеточное пищеварение) до мономерных молекул, которые затем транспортируются в цитоплазму через плазматическую мембрану.

В электронном микроскопе, особенно при специальных методах контрастирования полисахаридов, гликокаликс имеет вид рыхлого волокнистого слоя, толщиной 3–4 нм, покрывающего всю поверхность клетки. Особенно хорошо гликокаликс выражен в щеточной каемке клеток всасывающего эпителия кишечника (энтероциты), однако он обнаружен практически у всех животных клеток, но степень его выраженности различна (рис. 13.2).

В электронном микроскопе, особенно при специальных методах контрастирования полисахаридов, гликокаликс имеет вид рыхлого волокнистого слоя, толщиной 3–4 нм, покрывающего всю поверхность клетки. Особенно хорошо гликокаликс выражен в щеточной каемке клеток всасывающего эпителия кишечника (энтероциты), однако он обнаружен практически у всех животных клеток, но степень его выраженности различна (рис. 13.2).

Механическая устойчивость плазматической мембраны, кроме того, обеспечивается структурой примыкающего к ней со стороны цитоплазмы кортикального слоя и внутриклеточных фибриллярных структур. **Кортикальный** (от слова *cortex* — кора, кожа) слой цитоплазмы, лежащий в тесном контакте с внутренней поверхностью плазматической мембраны, имеет ряд особенностей. Здесь в толщине 0,1–0,5 мкм отсутствуют рибосомы и мембранные пузырьки, но в большом количестве встречаются фибриллярные элементы цитоплазмы — микрофиламенты и часто микротрубочки. Основным фибриллярным компонентом кортикального слоя является сеть актиновых микрофибрилл. Здесь же располагается ряд вспомогательных белков, необходимых для движения участков цитоплазмы (подробнее о скелетно-двигательной системе клеток см. ниже). Роль этих связанных с актином белков очень важна, так как она объясняет их участие в связи, в «заякорении» интегральных белков плазматической мембраны.

Барьерная роль плазмолеммы заключается также в ограничении свободной диффузии веществ. Модельные опыты на искусственных липидных мембранах показали, что они проницаемы для воды, газов, малых неполярных молекул жирорастворимых веществ, но совершенно не проницаемы для заряженных молекул (ионы) и для крупных незаряженных (сахара) (рис. 13.3).

Естественные мембраны так же ограничивают скорость проникновения низкомолекулярных соединений в клетку. Однако именно через такие мембраны происходит транспорт низко- и высокомолекулярных соединений.

## 2. Трансмембранный перенос ионов и низкомолекулярных соединений

Плазматическая мембрана, так же как и другие липопротеидные мембраны клетки, является полупроницаемой. Это значит, что через нее с различной скоростью проходят разные молекулы и чем больше размер молекул, тем меньше скорость прохождения их через мембрану. Это свойство определяет плазматическую мембрану как осмотический барьер. Максимальной проникающей способностью обладает вода и растворенные в ней газы, значительно медленнее проникают сквозь мембрану ионы (примерно в  $10^4$  раз медленнее). Поэтому если клетку, например эритроцит, поместить в среду, где концентрация солей будет ниже, чем

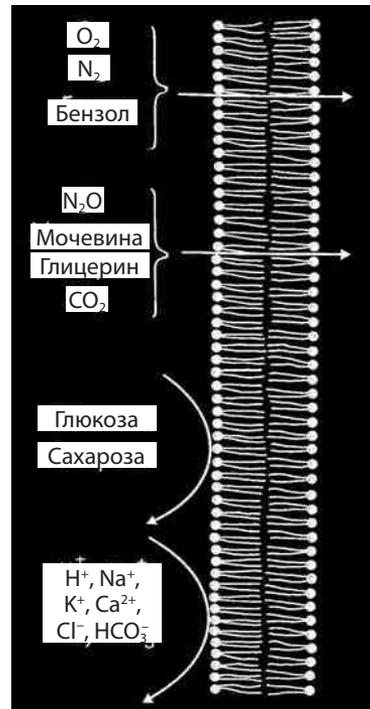


Рис. 13.3. Проницаемость искусственного билипидного слоя для различных молекул

в клетке (гипотония), то вода снаружи устремится внутрь клетки, что приведет к увеличению объема клетки и к разрыву плазматической мембраны («гипотонический шок»). Наоборот, при помещении эритроцита в растворы солей более высокой концентрации, чем в клетке, произойдет выход воды из клетки во внешнюю среду. Клетка при этом сморщится, уменьшится в объеме.

Такой пассивный транспорт воды из клетки и в клетку все же идет с низкой скоростью. Скорость проникновения воды через мембрану составляет около  $10^{-4}$  см/с, что в 100 000 раз меньше скорости диффузии молекул воды через водный слой толщиной 7,5 нм. Суммарная площадь плазматической мембраны, способной к пассивной диффузии внутрь клетки, составляет 0,06% от всей клеточной поверхности.

В отличие от искусственных бислоевых липидных мембран, естественные мембраны, и в первую очередь плазматическая мембрана, все же способны транспортировать ионы и многие мономеры, такие как сахара, аминокислоты и др. Проницаемость для ионов мала, причем скорость прохождения разных ионов неодинакова. Более высокая скорость прохождения для катионов ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) и значительно ниже для анионов ( $Cl^-$ ).

Транспорт ионов через плазмалемму проходит за счет участия в этом процессе мембранных транспортных белков — *пермеаз*. Эти белки могут вести транспорт в одном направлении одного вещества (унипорт) или нескольких веществ одновременно (симпорт), или же вместе с импортом одного вещества выводить из клетки другое (антипорт). Так, глюкоза может входить в клетки симпортно вместе с ионом  $Na^+$ .

Транспорт ионов может происходить по *градиенту концентрации* — пассивно без дополнительной затраты энергии. Например, в клетку проникает ион  $Na^+$  из внешней среды, где его концентрация выше, чем в цитоплазме. В случае пассивного транспорта некоторые мембранные транспортные белки образуют молекулярные комплексы, *каналы*, через которые растворенные молекулы проходят через мембрану за счет простой диффузии по градиенту концентрации. Часть этих каналов

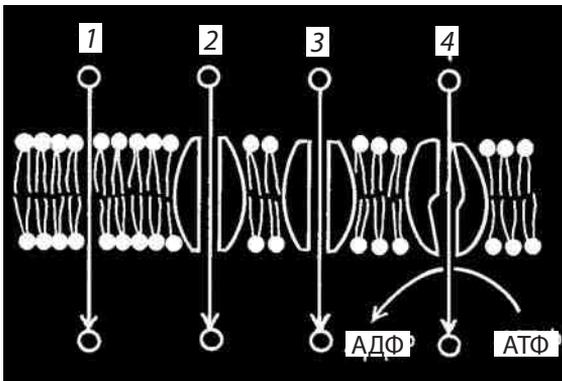


Рис. 13.4. Схема переноса ионов и молекул через плазматическую мембрану:

1 — простая диффузия; 2 — облегченная диффузия; 3 — каналобразующий белок; 4 — белок-переносчик

открыта постоянно, а другая часть может закрываться или открываться в ответ либо на связывание с сигнальными молекулами, либо на изменение внутриклеточной концентрации ионов. В других случаях специальные мембранные *белки-переносчики* избирательно связываются с тем или иным ионом и переносят его через мембрану (облегченная диффузия) (рис. 13.4).

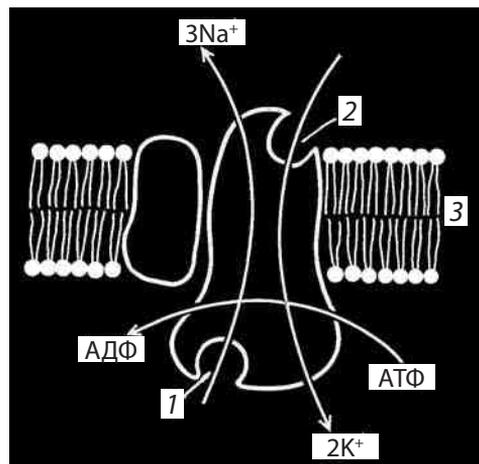
Наличие таких белковых транспортных каналов и переносчиков казалось бы должно

Таблица 14. Концентрация ионов внутри и снаружи клетки

Ион	Внутриклеточная концентрация, мМ	Внеклеточная концентрация, мМ
$K^+$	139	4
$Na^+$	12	145
$Cl^-$	4	116
$HCO_3^-$	12	29
$Mg^{2+}$	0,8	1,5
$Ca^{2+}$	<0,0002	1,8

приводить к уравниванию концентраций ионов и низкомолекулярных веществ по обе стороны мембраны. На самом же деле это не так: концентрация ионов в цитоплазме клеток резко отличается не только от таковой во внешней среде, но даже от плазмы крови, омывающей клетки в организме животных. На табл. 14 показана концентрация ионов внутри и снаружи клетки.

Как видно, в этом случае суммарная концентрация одновалентных катионов как внутри клеток, так и снаружи практически одинаковы (150 мМ), *изотонична*. Но оказывается в цитоплазме концентрация  $K^+$  почти в 50 раз выше, а  $Na^+$  ниже, чем в плазме крови. Причем это различие поддерживается только в живой клетке: если клетку убить или подавить в ней метаболические процессы, то через некоторое время ионные различия по обе стороны плазматической мембраны исчезнут. Можно просто охладить клетки до +2 °С, и через некоторое время концентрация  $K^+$  и  $Na^+$  по обе стороны от мембраны станут одинаковыми. При нагревании клеток это различие восстанавливается. Это явление связано с тем, что в клетках существуют мембранные белковые переносчики, которые работают против градиента концентрации, затрачивая при этом энергию за счет гидролиза АТФ. Такой тип работы носит название *активного транспорта*, и он осуществляется с помощью белковых *ионных насосов*. В плазматической мембране находится двухсубъединичная молекула ( $K^+$  +  $Na^+$ )-насоса, которая одновременно является АТФазой. Этот насос при работе откачивает за один цикл 3 иона  $Na^+$  и закачивает в клетку 2 иона  $K^+$  против градиента концентрации. При этом затрачивается одна молекула АТФ, идущая на фосфорилирование АТФазы, в результате чего  $Na^+$  переносится через мембрану из клетки, а  $K^+$  получает возможность связаться с белковой молекулой и затем переносится в клетку (рис. 13.5). В результате активного транспорта с помощью мембранных насосов происходит также регуляция в клетке концентрации и двухвалентных катионов  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ , также с затратой АТФ.

Рис. 13.5. ( $K^+$ - $Na^+$ )-насос:

1 — участок связывания  $Na^+$ ; 2 — участок связывания  $K^+$ ; 3 — мембрана

Такая постоянная работа пермеаз и насосов создает в клетке постоянную концентрацию ионов и низкомолекулярных веществ, создает т.н. гомеостаз, постоянство концентраций осмотически активных веществ. Надо отметить, что примерно 80% всей АТФ клетки тратится на поддержание гомеостаза.

В сочетании с активным транспортом ионов через плазматическую мембрану происходит транспорт различных сахаров, нуклеотидов и аминокислот.

Так активный транспорт глюкозы, которая симпортно (одновременно) проникает в клетку вместе с потоком пассивно транспортируемого иона  $\text{Na}^+$ , будет зависеть от активности  $(\text{K}^+ + \text{Na}^+)$ -насоса. Если этот  $(\text{K}^+ - \text{Na}^+)$ -насос заблокировать, то скоро разность концентрации  $\text{Na}^+$  по обе стороны мембраны исчезнет, сократится при этом диффузия  $\text{Na}^+$  внутрь клетки, и одновременно прекратится поступление глюкозы в клетку. Как только восстановится работа  $(\text{K}^+ - \text{Na}^+)$ -АТФазы и создается разность концентрации ионов, то сразу возрастает диффузный поток  $\text{Na}^+$  и одновременно транспорт глюкозы. Подобно этому осуществляется через мембрану и поток аминокислот, которые переносятся специальными белками-переносчиками, работающими как системы симпорта, перенося одновременно ионы.

Само по себе участие специальных мембранных белков, участвующих в пассивном или активном транспорте низкомолекулярных соединений, указывает на высокую специфичность этого процесса. Даже в случае пассивного ионного транспорта белки «узнают» данный ион, взаимодействуют с ним, связываются специфически, меняют при этом свою конформацию и функционируют. Следовательно, уже на примере транспорта простых веществ мембраны выступают как анализаторы, как рецепторы. Особенно такая рецепторная роль проявляется при поглощении клеткой биополимеров.

### 3. Везикулярный перенос: эндоцитоз и экзоцитоз

Макромолекулы, такие как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липопротеидные комплексы и другие сквозь клеточные мембраны не проходят, в противовес тому, как транспортируются ионы и мономеры. Транспорт микромолекул, их комплексов, частиц внутрь клетки и из нее происходит совершенно иным путем — посредством везикулярного переноса. Этот термин означает, что различные макромолекулы, биополимеры или их комплексы не могут попадать в клетку сквозь плазматическую мембрану. И не только сквозь нее: любые клеточные мембраны не способны к трансмембранному переносу биополимеров, за исключением мембран, имеющих особые белковые комплексные переносчики — порины (ядерная оболочка, мембраны митохондрий, пластид, пероксисом). В клетку же или из одного мембранного компартмента в другой макромолекулы попадают заключенными внутри вакуолей или везикул. Такой **везикулярный перенос** можно разделить на два вида: **экзоцитоз** — вынос из клетки макромолекулярных продуктов, и **эндоцитоз** — поглощение клеткой макромолекул (рис. 13.6).

При эндоцитозе определенный участок плазмалеммы захватывает, как бы обволакивает внеклеточный материал, заключает его в мембранную вакуоль,

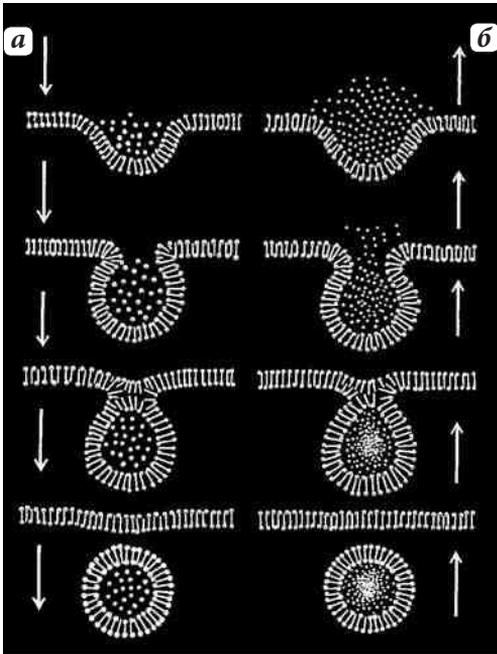


Рис. 13.6. Сравнение эндоцитоза (а) и экзоцитоза (б)

клеток или их частей) — был впервые описан И.И. Мечниковым. Фагоцитоз встречается среди клеток животных как одноклеточных (например, амебы, некоторые хищные инфузории), так и для специализированных клеток многоклеточных животных. Специализированные клетки — фагоциты — характерны как для беспозвоночных животных (амебоциты крови или полостной жидкости), так и для позвоночных (нейтрофилы и макрофаги). **Пиноцитоз** вначале определялся как поглощение клеткой воды или водных растворов разных веществ. Сейчас известно,

возникшую за счет впячивания плазматической мембраны. В такую первичную вакуоль, или **в эндосому**, могут попадать любые биополимеры, макромолекулярные комплексы, части клеток или даже целые клетки, где затем и распадаются, деполимеризуются до мономеров, которые путем трансмембранного переноса попадают в гилоплазму. Основное биологическое значение эндоцитоза — это получение строительных блоков за счет **внутриклеточного переваривания**, которое осуществляется на втором этапе эндоцитоза после слияния первичной эндосомы с лизосомой, вакуолью, содержащей набор гидролитических ферментов (см. ниже).

Эндоцитоз формально разделяют на **пиноцитоз** и **фагоцитоз** (рис. 13.7). **Фагоцитоз** — захват и поглощение клеткой крупных частиц (иногда даже

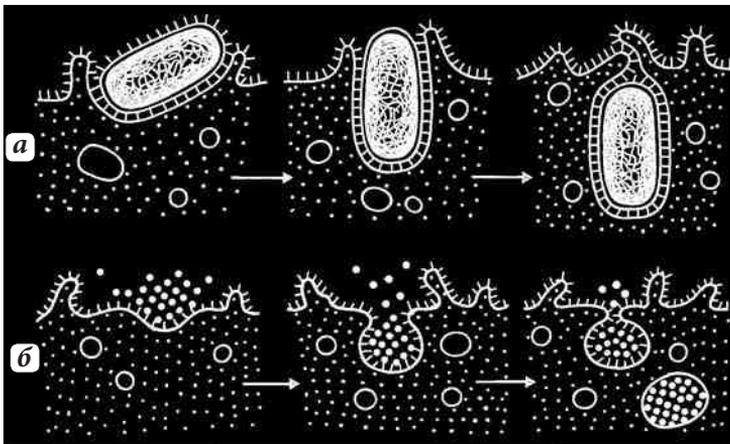


Рис. 13.7. Схема фагоцитоза (а) и пиноцитоза (б)

что как фагоцитоз, так и пиноцитоз протекают очень сходно, поэтому употребление этих терминов может отражать лишь различия в объемах, массе поглощенных веществ. Общее для этих процессов то, что поглощенные вещества на поверхности плазматической мембраны окружаются мембраной в виде вакуоли — эндосомы, которая перемещается внутрь клетки.

К пиноцитозу, хотя и в меньшей степени по сравнению с фагоцитами, способны практически все клетки позвоночных. Так пиноцитоз обнаруживается у гепатоцитов, энтероцитов, клеток извитых канальцев почек и других клеток эпителия. Встречается эндоцитоз у гладко-мышечных клеток, в синаптических окончаниях нейронов и у др.

Эндоцитоз, включая пиноцитоз и фагоцитоз, может быть неспецифическим или конститутивным, постоянным и специфическим, опосредуемым рецепторами (рецепторным). **Неспецифический эндоцитоз** (пиноцитоз и фагоцитоз), так называется потому, что он протекает как бы автоматически и часто может приводить к захвату и поглощению совершенно чуждых или безразличных для клетки веществ, например, частичек сажи или красителей.

Неспецифический эндоцитоз часто сопровождается первоначальной сорбцией захватываемого материала гликокаликсом плазмолеммы. Гликокаликс из-за кислых групп своих полисахаридов имеет отрицательный заряд и хорошо связывается с различными положительно заряженными группами белков. При таком адсорбционном неспецифическом эндоцитозе поглощаются макромолекулы и мелкие частицы (кислые белки, ферритин, антитела, вирионы, коллоидные частицы). Жидкофазный пиноцитоз приводит к поглощению вместе с жидкой средой растворимых молекул, которые не связываются с плазмолеммой.

На следующем этапе происходит изменение морфологии клеточной поверхности: это или возникновение небольших впячиваний плазматической мембраны, инвагинации, или же это появление на поверхности клетки выростов, складок или «оборок» (по-английски *ruffle*), которые как бы захлестываются, складываются, отделяя небольшие объемы жидкой среды (рис. 13.8, 13.9). Первый тип

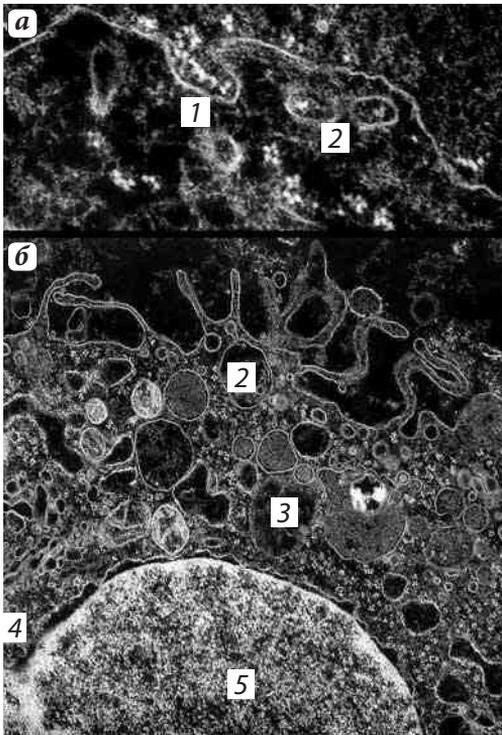
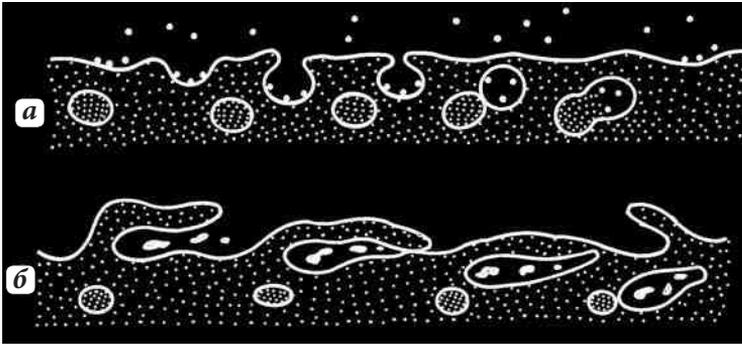


Рис. 13.8. Эндоцитоз:

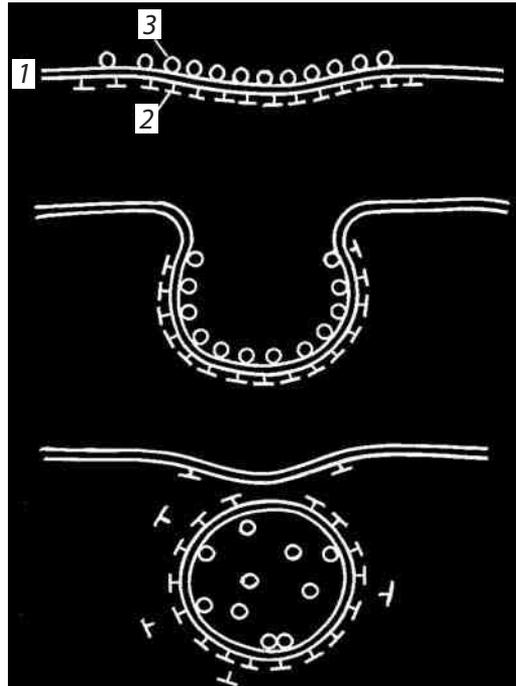
**а** — пиноцитозная ямка и вакуоли; **б** — пиноцитоз на поверхности макрофага, видны выросты цитоплазмы, образующие складки (рафлы); 1 — пиноцитозные вакуоли; 2, 3 — эндосомы; 4 — аппарат Гольджи; 5 — ядро (фото С.М. Коломиной)



**Рис. 13.9.** Последовательные стадии пиноцитоза: образование вакуолей при впячивании мембраны (а) и при участии выростов типа оборок («рафлы») (б)

возникновения пиноцитозного пузырька, пиносомы, характерен для клеток кишечного эпителия, эндотелия, для амёб, второй — для фагоцитов и фибробластов. Эти процессы зависят от поступления энергии: ингибиторы дыхания блокируют эти процессы.

Вслед за такой перестройкой поверхности следует и процесс слипания и слияния контактирующих мембран, который приводит к образованию пиноцитозного пузырька (пиносомы), отрывающегося от клеточной поверхности и уходящего вглубь цитоплазмы. Как неспецифический, так и рецепторный эндоцитоз, приводящий к отщеплению мембранных пузырьков, происходит в специализированных участках плазматической мембраны. Это так называемые **окаймленные ямки**. Они называются так потому, что со стороны цитоплазмы плазматическая мембрана покрыта, одета, тонким (около 20 нм) волокнистым слоем, который на ультратонких срезах как бы окаймляет, покрывает небольшие впячивания, ямки (рис. 13.10). Эти ямки есть почти у всех клеток животных, они занимают около 2% клеточной поверхности. Окаймляющий слой состоит в основном из белка **клатрина**, ассоциированного с рядом дополнительных белков. Три молекулы клатрина вместе с тремя молекулами низкомолекулярного белка образуют структуру трискелиона, напоминающего трехлучевую свастику



**Рис. 13.10.** Окаймленные ямки и вакуоли: последовательные стадии связывания лигандов и образования вакуолей:

1 — плазматическая мембрана; 2 — клатриновый слой («кайма»); 3 — сорбированные лиганды

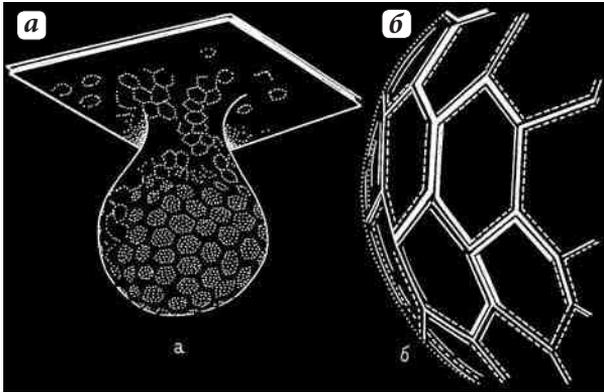
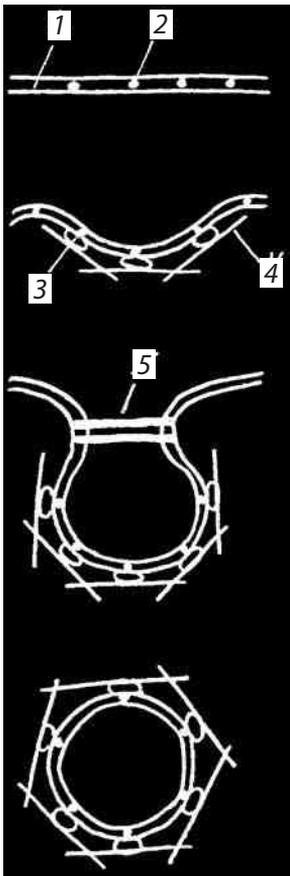


Рис. 13.11. Окаймленные пузырьки:

**а** — вид со стороны цитозоля; **б** — трискелеоны на поверхности пузырька

ются с интегральными белками-рецепторами со стороны цитоплазмы и образуют одевающий слой по периметру возникающей пиносомы, первичного эндосомного пузырька — «окаймленного» пузырька. В отделении первичной эндосомы участвуют также белки **динамины**, которые полимеризуются вокруг шейки отделяющегося пузырька (рис. 13.12).



После того, как окаймленный пузырек отделится от плазмолеммы и начнет переноситься вглубь цитоплазмы, клатриновый слой распадается, диссоциирует, мембрана эндосом (пиносом) приобретает обычный вид. После потери клатринового слоя эндосомы начинают сливаться друг с другом.

Было найдено, что мембраны окаймленных ямок содержат сравнительно мало холестерина, что может определять снижение жесткости мембран и способствовать образованию пузырьков. Биологический смысл появления клатриновой «шубы» по периферии пузырьков, возможно, заключается в том, что он обеспечивает сцепление окаймленных пузырьков с элементами цитоскелета и последующий их транспорт в клетке, и препятствует их слиянию друг с другом.

Интенсивность жидкофазного неспецифического пиноцитоза может быть очень высокой. Так клетка эпителия тонкого кишечника образует до 1000 пиносом в

Рис. 13.12. Последовательные стадии образования и отщепления окаймленного пузырька:

1 — плазматическая мембрана; 2 — интегральные белки; 3 — кэпирующие белковые частицы; 4 — клатрин; 5 — динамин

(рис. 13.11). Клатриновые трискелионы на внутренней поверхности ямок плазматической мембраны образуют рыхлую сеть, состоящую из пяти- и шестиугольников, в целом напоминающую корзинку. Клатриновый слой одевает весь периметр отделяющихся первичных эндоситозных вакуолей, окаймленных пузырьков.

Клатрин относится к одному из видов т.н. «одевающих» белков (СОР — *coated proteins*). Эти белки связываются

секунду, а макрофаги образуют около 125 пиносом в мин. Размер пиносом невелик, их нижний предел составляет 60–130 нм, но обилие их приводит к тому, что при эндоцитозе плазмолемма быстро замещается, как бы «тратится» на образование множества мелких вакуолей. Так, у макрофагов вся плазматическая мембрана заменяется за 30 мин, у фибробластов — за 2 ч.

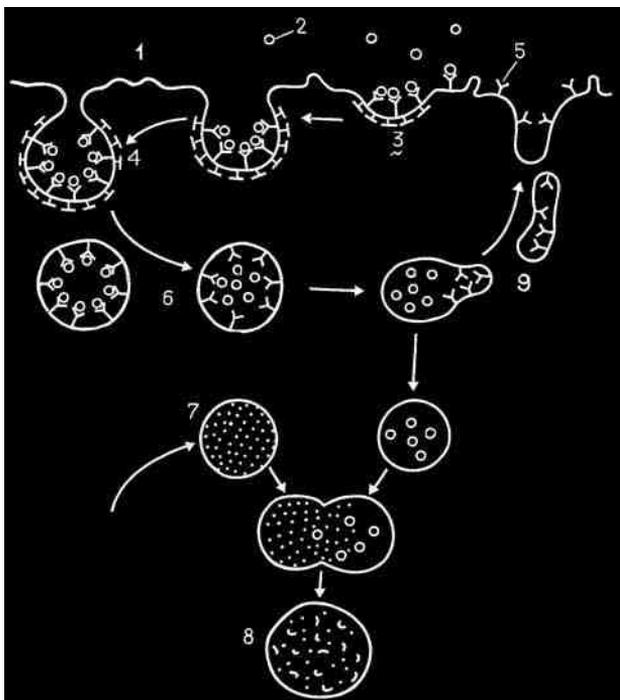
Дальнейшая судьба эндосом может быть различной, часть из них может возвращаться к поверхности клетки и сливаться с ней, но большая часть вступает в процесс внутриклеточного пищеварения. Первичные эндосомы содержат в основном захваченные в жидкой среде чужеродные молекулы и не содержат гидролитических ферментов. Эндосомы могут сливаться друг с другом при этом увеличиваясь в размере. Они затем сливаются с первичными лизосомами (см. ниже), которые вводят в полость эндосом ферменты, гидролизующие различные биополимеры. Действие этих лизосомных гидролаз и вызывает внутриклеточное пищеварение — распад полимеров до мономеров.

Как уже указывалось, в ходе фагоцитоза и пиноцитоза клетки теряют большую площадь плазмолеммы (см. макрофаги), которая однако довольно быстро восстанавливается при рециклизации мембран, за счет возвращения вакуолей и их встраивания в плазмолемму. Это происходит вследствие того, что от эндосом или вакуолей, так же как и от лизосом могут отделяться небольшие пузырьки, которые вновь сливаются с плазмолеммой. При такой рециклизации происходит как бы «челночный» перенос мембран: плазмолемма — пиносома — вакуоль — плазмолемма. Это ведет к восстановлению исходной площади плазматической мембраны. Найдено, что при таком возврате, рециклизации мембран, в оставшейся эндосоме удерживается весь поглощенный материал.

**Специфический, или опосредуемый рецепторами, эндоцитоз** имеет ряд отличий от неспецифического. Главное в том, что поглощаются молекулы, для которых на плазматической мембране есть специфические рецепторы, ассоциирующиеся только с данным типом молекул. Часто такие молекулы, связывающиеся с белками-рецепторами на поверхности клеток, называют **лигандами**.

Впервые опосредуемый рецепторами эндоцитоз был описан при накоплении белков в ооцитах птиц. Белки желточных гранул, вителлогенины, синтезируются в различных тканях, но затем с током крови попадают в яичники, где связываются со специальными мембранными рецепторами ооцитов и затем с помощью эндоцитоза попадают внутрь клетки, где и происходит отложение желточных гранул.

Другой пример избирательного эндоцитоза представляет собой транспорт в клетку холестерина. Этот липид синтезируется в печени и в комплексе с другими фосфолипидами и белковой молекулой образует т.н. липопротеид низкой плотности (ЛНП), который секретируется клетками печени и кровеносной системой разносится по всему телу (рис. 13.13). Специальные рецепторы плазматической мембраны, диффузно расположенные на поверхности различных клеток, узнают белковый компонент ЛНП, и образуют специфический комплекс рецептор-лиганд. Вслед за этим такой комплекс перемещается в зону окаймленных ямок и интернализуется — окружается мембраной и погружается в глубь цитоплазмы. Показано, что мутантные рецепторы могут связывать ЛНП, но не аккумулируются в зоне



**Рис. 13.13.** Поступление в клетку ЛНП с помощью опосредованного рецепторами эндоцитоза:

1 — плазмолемма; 2 — частица ЛНП; 3 — окаймленная ямка; 4 — окаймленный пузырек; 5 — рецептор ЛНП; 6 — эндосома; 7 — первичная лизосома; 8 — вторичная лизосома; 9 — рециклизация рецепторов ЛНП

вакуоль, содержащую поглощенные ЛНП-частицы, связанные еще с рецепторами на поверхности мембраны. Затем происходит диссоциация комплекса лиганд-рецептор, от эндосомы отщепляются мелкие вакуоли, мембраны которых содержат свободные рецепторы. Эти пузырьки рециклируются, включаются в плазматическую мембрану, и тем самым, рецепторы возвращаются на поверхность клетки. Судьба же ЛНП состоит в том, что после слияния с лизосомами, они гидролизуются до свободного холестерина, который может включаться в клеточные мембраны.

Эндосомы характеризуются более низким значением рН (рН 4–5), более кислой средой, чем другие клеточные вакуоли. Это связано с наличием в их мембранах белков протонного насоса, закачивающих ионы водорода с одновременной затратой АТФ ( $H^+$ -зависимая АТФаза). Кислая среда внутри эндосом играет решающую роль в диссоциации рецепторов и лигандов. Кроме того, кислая среда является оптимальной для активации гидролитических ферментов в составе лизосом, которые активируются при слиянии лизосом с эндосомами и приводят к образованию *эндолизосомы*, в которой и происходит расщепление поглощенных биополимеров.

окаймленных ямок. Кроме рецепторов к ЛНП обнаружено более двух десятков других, участвующих в рецепторном эндоцитозе различных веществ, все они используют один и тот же путь интернализации через окаймленные ямки. Вероятно, их роль заключается в накоплении рецепторов: одна и та же окаймленная ямка может собрать около 1000 рецепторов разного класса.

Дальнейшая судьба поглощенной частицы ЛНП заключается в том, что она подвергается распаду в составе *вторичной лизосомы*. После погружения в цитоплазму окаймленного пузырька, нагруженного ЛНП, происходит быстрая потеря клатринового слоя, мембранные пузырьки начинают сливаться друг с другом, образуя эндосому — ва-

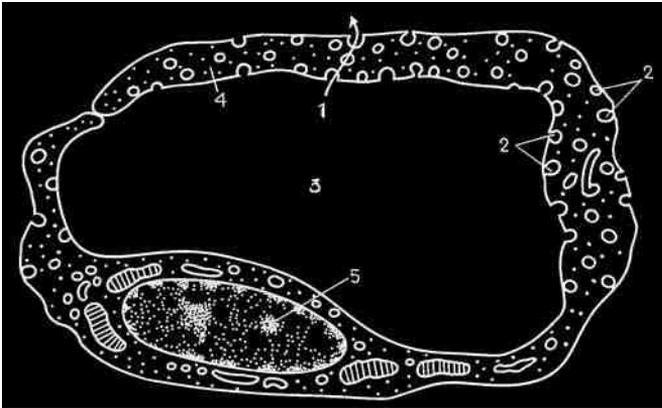


Рис. 13.14. Трансцитоз:

1 — перенос веществ мембранными вакуолями сквозь стенку эндотелиальной клетки; 2 — пиноцитозные вакуоли; 3 — просвет капилляра; 4 — цитоплазма; 5 — ядро

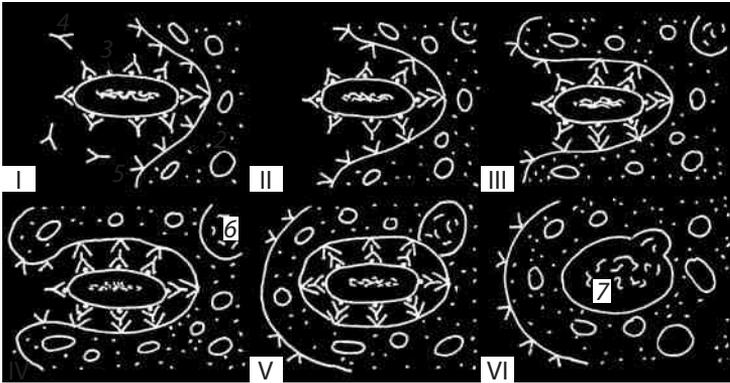
В некоторых случаях судьба диссоциированных лигандов не связана с лизосомным гидролизом. Так, в некоторых клетках после связывания рецепторов плазмолеммы с определенными белками, покрытые клатрином вакуоли погружаются в цитоплазму и переносятся к другой области клетки, где сливаются снова с плазматической мембраной, а связанные белки диссоциируют от рецепторов. Так осуществляется перенос, **трансцитозис**, некоторых белков через стенку эндотелиальной клетки из плазмы крови во межклеточную среду (рис. 13.14). Другой пример трансцитоза — перенос антител. Так, у млекопитающих антитела матери могут передаваться детенышу через молоко. В этом случае комплекс рецептор-антитело остается в эндосоме без изменений.

Как уже говорилось, **фагоцитоз** является вариантом эндоцитоза и связан с поглощением клеткой крупных агрегатов макромолекул вплоть до живых или мертвых клеток. Так же, как и пиноцитоз, фагоцитоз может быть неспецифическим (например, поглощение фибробластами или макрофагами частичек коллоидного золота или полимера декстрана) и специфическим, опосредуемым рецепторами на поверхности плазматической мембраны фагоцитирующих клеток. При фагоцитозе происходит образование больших эндоцитозных вакуолей — **фагосом**, которые, затем сливаясь с лизосомами, образуют **фаголизосомы**.

На поверхности клеток, способных к фагоцитозу (у млекопитающих это нейтрофилы и макрофаги) существует набор рецепторов, взаимодействующих с белками-лигандами. Так, при бактериальных инфекциях антитела к белкам бактерий связываются с поверхностью бактериальных клеток, образуя слой, в котором F<sub>c</sub>-области антител смотрят наружу. Этот слой узнается специфическими рецепторами на поверхности макрофагов и нейтрофилов, и в местах их связывания начинается поглощение бактерии путем обволакивания ее плазматической мембраной клетки (рис. 13.15).

Плазматическая мембрана принимает участие в выведении веществ из клетки с помощью **экзоцитоза** — процесса, обратного эндоцитозу (см. рис. 13.6).

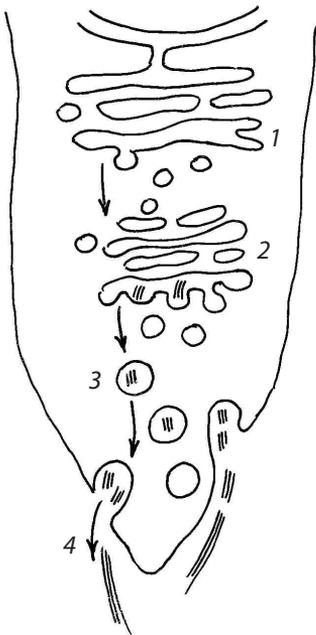
В случае экзоцитоза, внутриклеточные продукты, заключенные в вакуоли или пузырьки и отграниченные от гиалоплазмы мембраной, подходят к плазматической мембране. В местах их контактов плазматическая мембрана и мембрана



**Рис. 13.15.** Последовательность (I–VI) захвата макрофагом бактериальной клетки:

1 — бактерия; 2 — макрофаг; 3 — антиген поверхности бактерии; 4 — антитела; 5 — рецепторы на плазматической мембране макрофага; 6 — лизосома; 7 — деградация бактериальной клетки в лизосоме

внешнюю среду, клетки могут вырабатывать и выбрасывать низкомолекулярные соединения (ацетилхолин, биогенные амины и др.), а также в большинстве случаев макромолекулы (пептиды, белки, липопротеиды, пептидогликаны и др.). Экзоцитоз или секреция в большинстве случаев происходит



**Рис. 13.16.** Внутриклеточные и внеклеточные стадии образования коллагеновых фибрилл:

1 — ЭПР; 2 — аппарат Гольджи; 3 — секреторная вакуоль; 4 — внеклеточная самосборка коллагеновых фибрилл

в ответ на внешний сигнал (нервный импульс, гормоны, медиаторы и др.). Хотя в ряде случаев экзоцитоз происходит постоянно (секреция фибронектина и коллагена фибробластами) (см. рис. 13.16).

Выделенные из клеток путем экзоцитоза гидролитические ферменты могут сорбироваться в слое гликокаликса и обеспечивать примембранное внеклеточное расщепление различных биополимеров и органических молекул. Огромное значение примембранное неклеточное пищеварение имеет для животных. Было обнаружено, что в кишечном эпителии млекопитающих в зоне так называемой щеточной каемки всасывающего эпителия, особенно богатой гликокаликсом, обнаруживается огромное количество разнообразных ферментов. Часть этих же ферментов имеет панкреатическое происхождение (амилаза, липазы, различные протеиназы и др.), а часть выделяется собственно клетками эпителия (экзогидролазы, расщепляющие преимущественно олигомеры и димеры с образованием транспортируемых продуктов).

Большинство секретируемых веществ используется другими клетками многоклеточных организмов (секреция молока, пищеварительных соков,

вакуоли сливаются, и пузырек опустошается в окружающую среду. С помощью экзоцитоза происходит процесс рециклизации мембран, участвующих в эндоцитозе.

С экзоцитозом связано выделение синтезированных в клетке разнообразных веществ. Секретирующие, выделяющие вещества во

гормонов и др.). Но часто клетки секретируют вещества и для собственных нужд. Так, рост плазматической мембраны осуществляется за счет встраивания участков мембраны в составе экзоцитозных вакуолей, часть элементов гликокаликса выделяется клеткой в виде гликопротеидных молекул. Выделение фибробластами фибронектина необходимо для обеспечения их подвижности и т.д.

Как хорошо известно, в состав многоклеточных организмов кроме клеток входят внеклеточные «промежуточные» вещества, особенно в составе рыхлой соединительной ткани, хрящей, кости и т.п. Т. Шванн (1839) смотрел на эти межклеточные компоненты как на род образовательной жидкости (*Cytoblastema*), назначенной для развития новых клеток. Это ошибочное представление в 1930–1950-х гг. вновь всплыло в примитивных взглядах ряда отечественных ученых о «живом веществе». Как ни парадоксально, но еще 150 лет тому назад Р. Вирхов писал: «... целый ряд патологических фактов привел меня, наоборот, к убеждению, что межклеточное вещество находится в известной зависимости от клеток».

Теперь нет никакого сомнения, что компоненты внеклеточного матрикса или межклеточного вещества представляют собой продукты секреции (экзоцитоза или экскреции) специальных клеток, главным образом фибробластов. Общее для внеклеточного матрикса — наличие двух компонентов: полисахаридных агрегатов и фибриллярных белков.

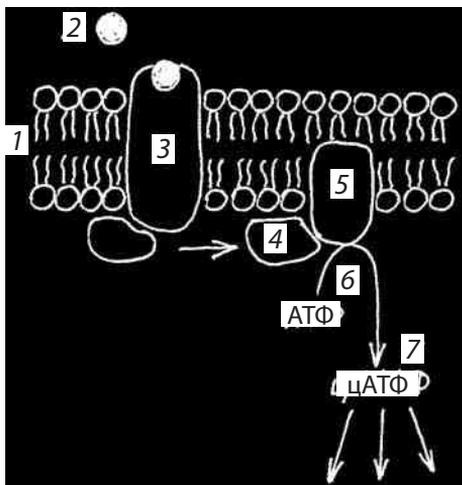
К полисахаридам относятся **глюкозаминогликаны** (ГАГ), обычно ковалентно связанные с белком в форме **протеогликанов**. Фибриллярные белки относятся к двум функциональным типам: структурные (коллагены I–XXVII типа и эластины) и адгезивные (фибронектин и ламинин). Молекулы глюкозаминогликанов и протеогликанов образуют сильно гидратированное гелеподобное основное вещество, в которое погружены фибриллярные структурные белки, которые укрепляют и упорядочивают матрикс. Адгезивные белки служат для прикрепления клеток к внеклеточному матриксу.

Существует несколько типов внеклеточного матрикса (в составе рыхлой соединительной ткани, хряща, костей, сухожилий). Одним из этих типов является **базальная ламина** (старое название **базальная мембрана**), в состав которой входит кроме глюкозаминогликанов разветвленная сеть коллагена IV типа. Базальная ламина подстилает пласты эпителиальных клеток, но также окружает поверхность мышечных клеток, клеток жировой ткани и периферические нервные отростки.

## 4. Рецепторно-сигнальная роль плазмолеммы

Мы уже встречались с этой особенностью плазматической мембраны при ознакомлении с ее транспортными функциями. Белки-переносчики и насосы являются кроме всего также рецепторами, узнающими и взаимодействующими с определенными ионами. Рецепторные белки связываются с лигандами и участвуют в отборе молекул, поступающих в клетки.

В качестве таких рецепторов на поверхности клетки могут выступать белки мембраны или элементы гликокаликса — гликопротеиды. Такие чувствительные



**Рис. 13.17.** Участие цАМФ в активации каскада ферментов:

1 — плазматическая мембрана; 2 — гормон; 3 — рецептор; 4 — G-белок; 5 — активированная аденилатциклаза; 6 — образование цАМФ; 7 — активация каскада протеин киназ, действующих на различные внутриклеточные мишени

ругой белок, лежащий уже в цитоплазматической части плазматической мембраны, — аденилатциклазу (рис. 13.17). Этот фермент синтезирует молекулу циклического АМФ из АТФ. Роль циклического АМФ (цАМФ) заключается в том, что он является вторичным мессенджером — активатором ферментов — **киназ**, вызывающих модификации других белков-ферментов. Так, при действии на печеночную клетку гормона поджелудочной железы глюкагона, вырабатываемого А-клетками островков Лангерганса, гормон связывается со специфическим рецептором, что стимулирует активацию аденилатциклазы. Синтезированный цАМФ активирует протеинкиназу А, которая в свою очередь активирует каскад ферментов, в конечном счете расщепляющих гликоген (запасной полисахарид животных) до глюкозы. Действие инсулина заключается в обратном — он стимулирует вхождение глюкозы в печеночные клетки и отложение ее в виде гликогена.

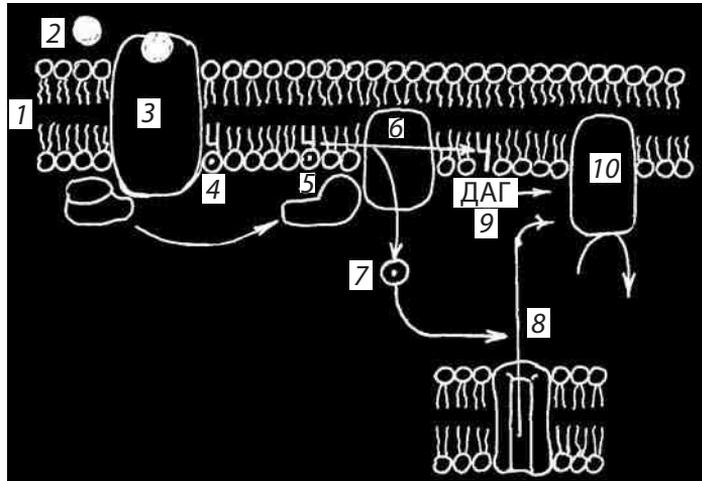
В целом цепь событий разворачивается следующим образом: гормон взаимодействует специфически с рецепторной частью этой системы и, не проникая внутрь клетки, активирует аденилатциклазу, которая синтезирует цАМФ, активирующий или ингибирующий внутриклеточный фермент или группу ферментов. Таким образом, команда, сигнал от плазматической мембраны передается внутрь клетки. Эффективность этой аденилатциклазной системы очень высока. Так, взаимодействие одной или нескольких молекул гормона может привести за счет синтеза множества молекул цАМФ к усилению сигнала в тысячи раз. В данном случае аденилатциклазная система служит преобразователем внешних сигналов.

участки к отдельным веществам могут быть разбросаны по поверхности клетки или собраны в небольшие зоны.

Разные клетки животных организмов могут обладать разными наборами рецепторов или же разной чувствительностью одного и того же рецептора.

Роль многих клеточных рецепторов заключается не только в связывании специфических веществ или способности реагировать на физические факторы, но и в передаче межклеточных сигналов с поверхности внутрь клетки. В настоящее время хорошо изучена система передачи сигнала клеткам с помощью некоторых гормонов, в состав которых входят пептидные цепочки. Было найдено, что эти гормоны связываются со специфическими рецепторами на поверхности плазматической мембраны клетки. Рецепторы, после связи с гормоном активируют

Существует и другой путь, при котором используются другие вторичные мессенджеры, — это т.н. **фосфатидилинозитольный путь**. Под действием соответствующего сигнала (некоторые нервные медиаторы и белки) активируется фермент фосфолипаза С, которая расщепляет фосфолипид фосфатидилинозитолдифосфат, который входит в состав плазматической мембраны. Продукты гидролиза этого липида, с одной стороны, активируют протеинкиназу С, которая вызывает активацию каскада киназ, что приводит к определенным клеточным реакциям, а с другой - приводит к освобождению ионов кальция, который регулирует целый ряд клеточных процессов (рис. 13.18).



**Рис. 13.18.** Фосфатидилинозитольный путь активации:

1 — плазматическая мембрана; 2 — гормон; 3 — рецептор; 4 — PI-липид фосфатидилинозитол; 5 — PIP-фосфатидилинозитол дифосфат; 6 — фосфолипаза С; 7 — IP3- инозитол трифосфат, стимулирует выход ионов Ca из ЭПР; 8, 9 — DAG-диацилглицерол, стимулирует протеинкиназу С (10), модифицирующую ряд ферментов

Другой пример рецепторной активности — рецепторы ацетилхолина, важного нейромедиатора. Ацетилхолин, освобождаясь из нервного окончания, связывается с рецептором на мышечном волокне, вызывает импульсное поступление Na<sup>+</sup> в клетку (деполяризация мембраны), открывая сразу около 2000 ионных каналов в зоне нервно-мышечного окончания.

Разнообразие и специфичность наборов рецепторов на поверхности клеток приводит к созданию очень сложной системы маркеров, позволяющих отличать свои клетки (той же особи или того же вида) от чужих. Сходные клетки вступают друг с другом во взаимодействия, приводящие к слипанию поверхностей (конъюгация у простейших и бактерий, образование тканевых клеточных комплексов). При этом клетки, отличающиеся набором детерминантных маркеров или не воспринимающие их, либо исключаются из такого взаимодействия, либо у высших животных уничтожаются в результате иммунологических реакций (см. ниже).

С плазматической мембраной связана локализация специфических рецепторов, реагирующих на физические факторы В плазматической мембране светочувствительных клеток животных расположена специальная система фоторецепторных белков (родопсин), с помощью которых световой сигнал превращается в химический, что, в свою очередь, приводит к генерации электрического импульса.

## 5. Межклеточное узнавание

У многоклеточных организмов за счет межклеточных взаимодействий образуются сложные клеточные ансамбли, поддержание которых может осуществляться разными путями. В зародышевых, эмбриональных тканях, особенно на ранних стадиях развития, клетки остаются в связи друг с другом за счет способности их поверхностей слипаться. Это свойство **адгезии** (соединения, сцепления) клеток может определяться свойствами их поверхности, которые специфически взаимодействуют друг с другом. Механизм этих связей достаточно хорошо изучен, он обеспечивается взаимодействием между гликопротеидами плазматических мембран. При таком межклеточном взаимодействии клеток между плазматическими мембранами всегда остается щель шириной около 20 нм, заполненная гликокаликсом. Обработка ткани ферментами, нарушающими целостность гликокаликса (муказы, действующие гидролитически на муцины, мукополисахариды) или повреждающие плазматическую мембрану (протеазы), приводит к обособлению клеток друг от друга, к их диссоциации.

Было найдено, что за агрегацию однородных клеток отвечают трансмембранные гликопротеиды. Непосредственно за соединение, адгезию, клеток отвечают молекулы т.н. САМ-белков (*cell adhesion molecules*). Некоторые из них связывают клетки друг с другом за счет межмолекулярных взаимодействий, другие образуют специальные межклеточные соединения или контакты.

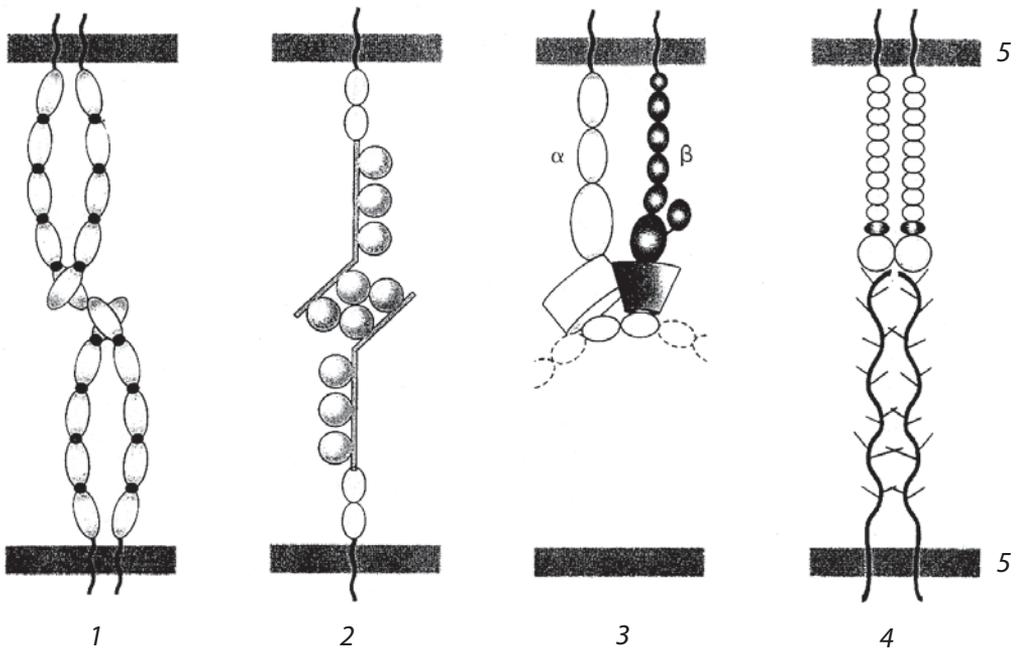


Рис. 13.19. Классы адгезивных (САМ) белков:

1 — кадгерины; 2 — иммуноглобулины (N-CAM); 3 — интегрины; 4 — селектины; 5 — плазматические мембраны соседних клеток

Адгезия — связь клеток друг с другом за счет межмолекулярных взаимодействий осуществляется несколькими классами САМ-белков. Это кадгеринами, иммуноглобулино-подобными N-САМ (молекулы адгезии нервных клеток), селектинами, интегринами (рис. 13.19).

**Кадгерины** представляют собой интегральные фибриллярные мембранные белки, которые образуют параллельные гомодимеры. Отдельные домены этих белков связаны с ионами  $Ca^{2+}$ , что придает им определенную жесткость. Кадгеринов насчитывают более 40 видов. Так, E-кадгерин характерен для клеток преимплантированных эмбрионов и для эпителиальных клеток взрослых организмов. P-кадгерин характерен для клеток трофобласта, плаценты и эпидермиса, N-кадгерин располагается на поверхности нервных клеток, клеток хрусталика, на сердечных и скелетных мышцах.

**Молекулы адгезии нервных клеток** (N-САМ) принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов, они образуют связи между нервными клетками. Некоторые из N-САМ участвуют в соединении синапсов, а также при адгезии клеток иммунной системы.

**Селектины** также интегральные белки плазматической мембраны участвуют в адгезии эндотелиальных клеток, в связывании кровяных пластинок, лейкоцитов.

**Интегрины** представляют собой гетеродимеры, с  $\alpha$  и  $\beta$ -цепями. Интегрины в первую очередь осуществляют связь клеток с внеклеточными субстратами, но могут участвовать и в адгезии клеток друг с другом.

Как уже указывалось, на попавшие в организм чужеродные макромолекулы (антигены), развивается сложная комплексная реакция — иммунная реакция. Суть ее заключается в том, что часть лимфоцитов вырабатывает специальные белки — антитела, которые специфически связываются с антигенами. Например, макрофаги своими поверхностными рецепторами узнают комплексы антиген–антитело и поглощают их (например, поглощение бактерий при фагоцитозе).

В организме всех позвоночных, кроме того, существует система рецепции чужеродных клеток или же своих, но с измененными белками плазматической мембраны, например при вирусных инфекциях или при мутациях, часто связанных с опухолевым перерождением клеток.

На поверхности всех клеток позвоночных располагаются белки, т.н. **главного комплекса гистосовместимости** (*major histocompatibility complex* — МНС). Это интегральные белки гликопротеины, гетеродимеры. Очень важно запомнить, что каждый индивидум имеет свой набор таких белков МНС. Это связано с тем, что они очень полиморфны, т.к. в каждом индивидуме имеется большое число альтернативных форм одного и того же гена (более 100), кроме того, имеется 7–8 локусов, кодирующих молекулы МНС. Это приводит к тому, что каждая клетка данного организма, имея набор белков МНС, будет отличаться от клеток индивидума этого же вида. Специальная форма лимфоцитов, Т-лимфоциты, узнают МНС своего организма, но малейшие изменения в структуре МНС (например, связь с вирусом или результат мутации в отдельных клетках) приводят к тому, что Т-лимфоциты узнают такие изменившиеся клетки и их уничтожают, но не путем фагоцитоза. Они выделяют из секреторных вакуолей специфические **белки-перфорины**,

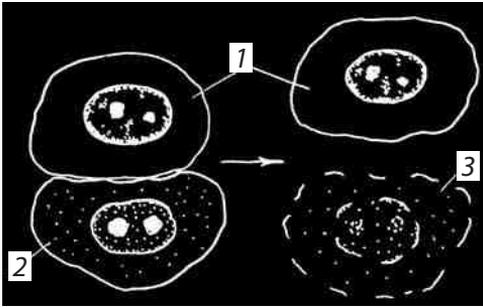


Рис. 13.20. Атака Т-лимфоцита (1) на чужеродную клетку (2), которая подвергается лизису (3)

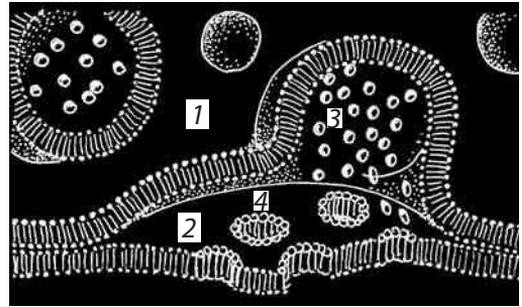


Рис. 13.21. Т-лимфоцит (1) выделяет белки-перфорины (3), которые встраиваются в плазматическую мембрану клетки-мишени (2) и образуют в ней каналы (4)

которые встраиваются в цитоплазматическую мембрану измененной клетки, образуют в ней трансмембранные каналы, делая плазматическую мембрану проницаемой, что и приводит к гибели измененной клетки (рис. 13.20, 13.21).

## 6. Специальные структурные межклеточные соединения

Кроме таких сравнительно простых адгезивных (но специфических) связей (рис. 13.22) существует целый ряд специальных межклеточных структур, контактов или соединений, которые выполняют определенные функции. Это запирающие, заякоряющие и коммуникационные соединения (рис. 13.23).

**Запирающее** или **плотное соединение** характерно для однослойных эпителиев. Это зона, где внешние слои двух плазматических мембран максимально сближены. Часто видна трехслойность мембраны в этом контакте: два внешних осмофильных слоя обеих мембран как бы сливаются в один общий слой толщиной 7–8 нм. Слияние мембран происходит не по всей площади плотного контакта, а представляет собой ряд точечных сближений мембран (рис. 13.24, 13.25).

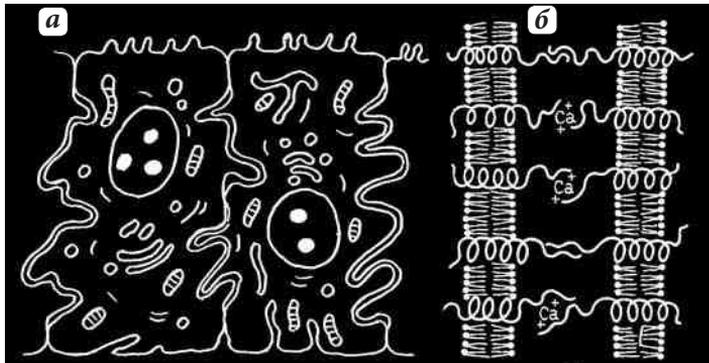


Рис. 13.22. Схема простого межклеточного соединения:

**а** — простое соединение, без участия специальных структур; **б** — трансмембранные гликопротеиды определяют связывание двух соседних клеток

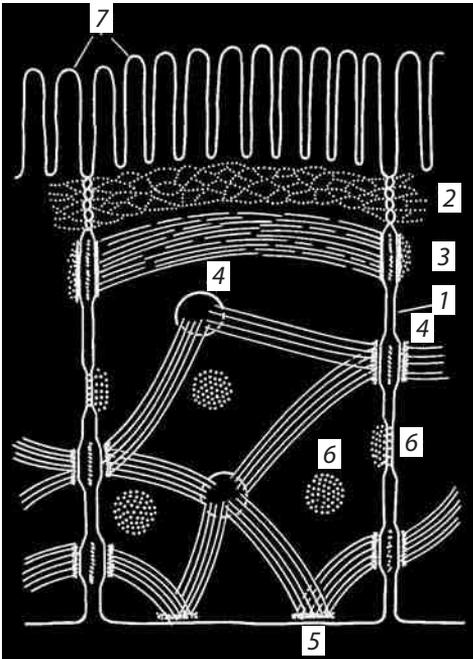


Рис. 13.23. Расположение различных адгезивных соединений в энтероците:

1 — простое соединение; 2 — плотное соединение; 3 — адгезивный пояс; 4 — десмосома; 5 — полудесмосома; 6 — щелевое соединение; 7 — микроворсинки

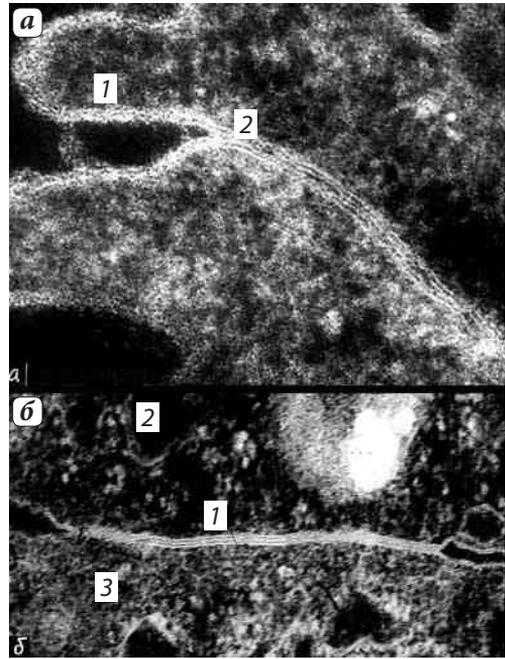


Рис. 13.24. Межклеточные специальные соединения (контакты). Э. М.:

**a** — плотный запирающий контакт (*tight junction*); 1 — плазматическая мембрана одной из соединяющихся клеток; 2 — сближение мембран в зоне контакта; **б** — нексус, щелевой контакт (1) между двумя (2 и 3) кардиомиоцитами

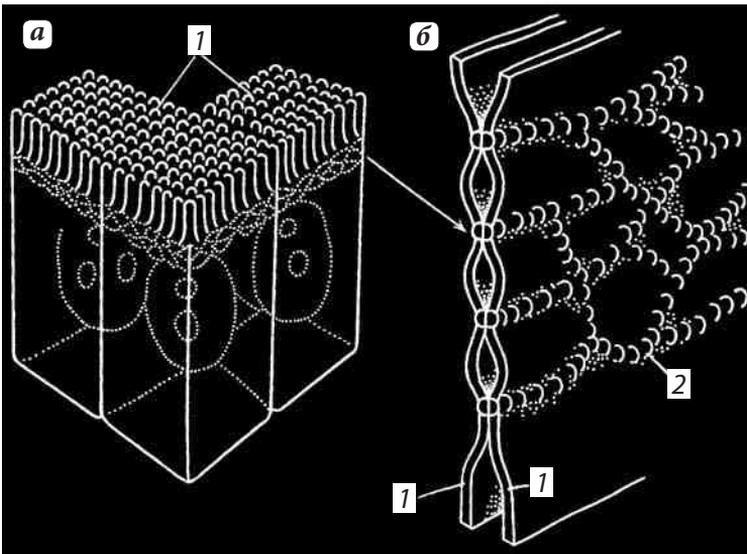


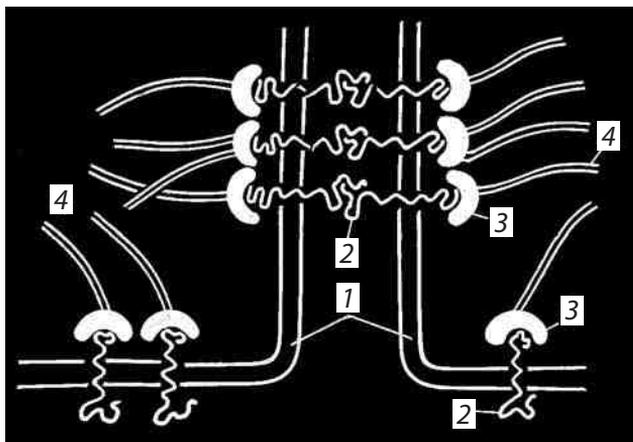
Рис. 13.25. Плотное соединение:

**a** — расположение плотного соединения (вставочная пластинка) на клетках кишечного эпителия: 1 — микроворсинки; **б** — трехмерная схема участка плотного соединения: 1 — плазматические мембраны, 2 — интегральные белки (окклюдины и клаудины)

На плоскостных препаратах разломов плазматической мембраны в зоне плотного контакта с помощью метода замораживания и скалывания было обнаружено, что точки соприкосновения мембран представляют собой ряды глобул. Это белки *окклюдин* и *клаудин*, специальные интегральные белки плазматической мембраны, встроенные рядами. Такие ряды глобул или полоски могут пересекаться так, что образуют на поверхности скола как бы решетку, или сеть. Очень характерна эта структура для эпителиев, особенно железистых и кишечных. В последнем случае плотный контакт образует сплошную зону слияния плазматических мембран, опоясывающую клетку в апикальной (верхней, смотрящей в просвет кишечника) ее части (см. рис. 13.25). Таким образом, каждая клетка пласта как бы обведена лентой этого контакта. Такие структуры при специальных окрашиваниях можно видеть и в световом микроскопе. Они получили у морфологов название *закрывающих пластинок*. Оказалось, что в данном случае роль замыкающего плотного контакта заключается не только в механическом соединении клеток друг с другом. Эта область контакта плохо проницаема для макромолекул и ионов, и тем самым она запирает, перегораживает межклеточные полости, изолируя их (и вместе с ними собственно внутреннюю среду организма) от внешней среды (в данном случае — просвет кишечника). Плотные контакты являются барьерами не только для макромолекул, но и непроницаемы для жидкостей и ионов.

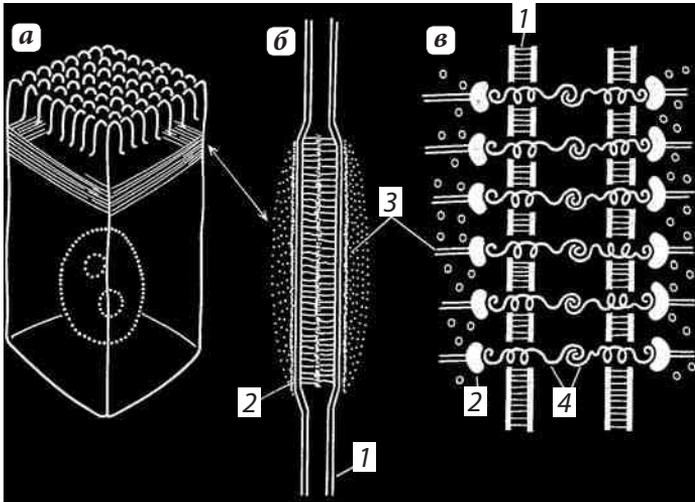
Нарушения плотных контактов приводит к тяжелым последствиям. Так, наследственные изменения клаудина 16 при гипомагниемии нарушают нормальный отток магния в почках, мутации клаудина 14 ведут к глухоте. Токсин холерного вибриона также нарушает барьер проницаемости кишечного эпителия: при этом происходит массивная потеря ионов и воды, что приводит к диарее и летальному обезвоживанию.

*Закорявающие*, или *сцепляющие соединения* или контакты, так называются из-за того, что они соединяют не только плазматические мембраны соседних клеток, но и связываются с фибриллярными элементами цитоскелета (рис. 13.26). Для этого рода соединений характерно наличие двух типов белков. Первый — это



**Рис. 13.26.** Схема строения закорявающих адгезивных соединений:

1 — плазматическая мембрана; 2 — трансмембранные линкерные гликопротеиды; 3 — внутриклеточные белки сцепления; 4 — элементы цитоскелета



**Рис. 13.27.** Адгезивный (сцепляющий) пояс (лента):

**а** — расположение его в клетке; **б** — вид на ультратонком срезе; **в** — схема: 1 — плазматическая мембрана; 2 — слой винкулина; 3 — актиновые микрофиламенты; 4 — линкерные гликопротеиды

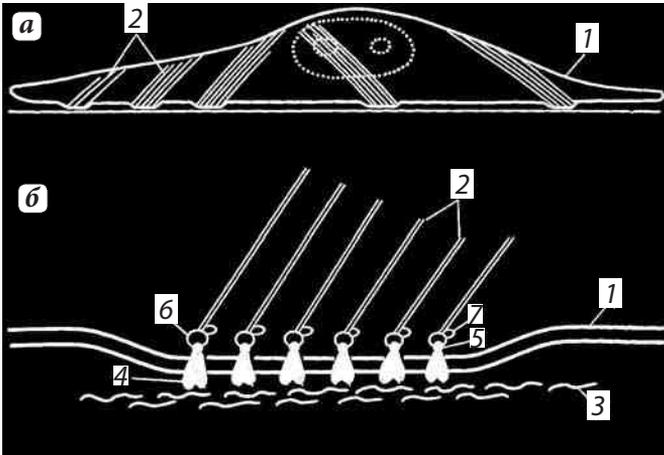
трансмембранные линкерные связующие САМ-белки, которые участвуют или в собственно межклеточном соединении или в соединении плазмолеммы с компонентами внеклеточного матрикса (базальная мембрана эпителиев, внеклеточные структурные белки соединительной ткани).

Второй — внутриклеточные белки, соединяющие или заякоряющие за мембранные элементы такого контакта цитоплазматические фибриллы цитоскелета.

К заякоряющим соединениям относятся межклеточные сцепляющие точечные контакты, сцепляющие ленты, фокальные контакты или бляшки сцепления — все эти контакты связываются внутри клеток с актиновыми микрофиламентами.

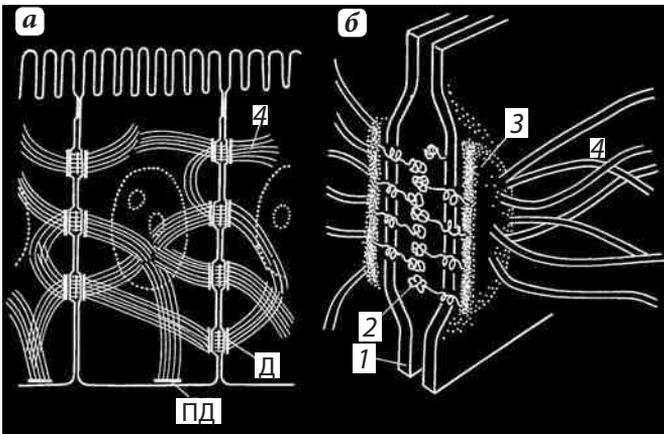
Другая группа заякоряющих межклеточных соединений — **десмосомы** и **полу-десмосомы** — связываются с другими элементами цитоскелета, а именно с промежуточными филаментами.

Межклеточные точечные сцепляющие соединения обнаружены у многих неэпителиальных тканей, но более отчетливо описана структура **специальных (адгезивных) лент** в однослойных эпителиях (рис. 13.27). Это структура опоясывает весь периметр эпителиальной клетки, подобно тому как это происходит в случае плотного соединения. Чаще всего такой пояс или лента лежит ниже плотного соединения (см. рис. 13.28). В этом месте плазматические мембраны не сближены, а даже несколько раздвинуты на расстояние 25–30 нм, и между ними видна зона повышенной плотности. Это ничто иное как места взаимодействия трансмембранных гликопротеидов, которые специфически сцепляются друг с другом и обеспечивают механическое соединение мембран двух соседних клеток. Эти линкерные белки относятся к Е-кадгеринам — белкам, обеспечивающим специфическое узнавание клетками однородных мембран. Разрушение этого слоя гликопротеидов приводит к обособлению отдельных клеток и разрушению эпителиального пласта. С цитоплазматической стороны около мембраны видно скопление какого-то



**Рис. 13.28.** Фокальный контакт:

**а** — расположение в фибробласте; **б** — молекулярная схема; 1 — плазматическая мембрана; 2 — микрофиламенты; 3 — фибронектин; 4 — интегрин; 5 — талин; 6 — винкулин; 7 —  $\alpha$ -актинин



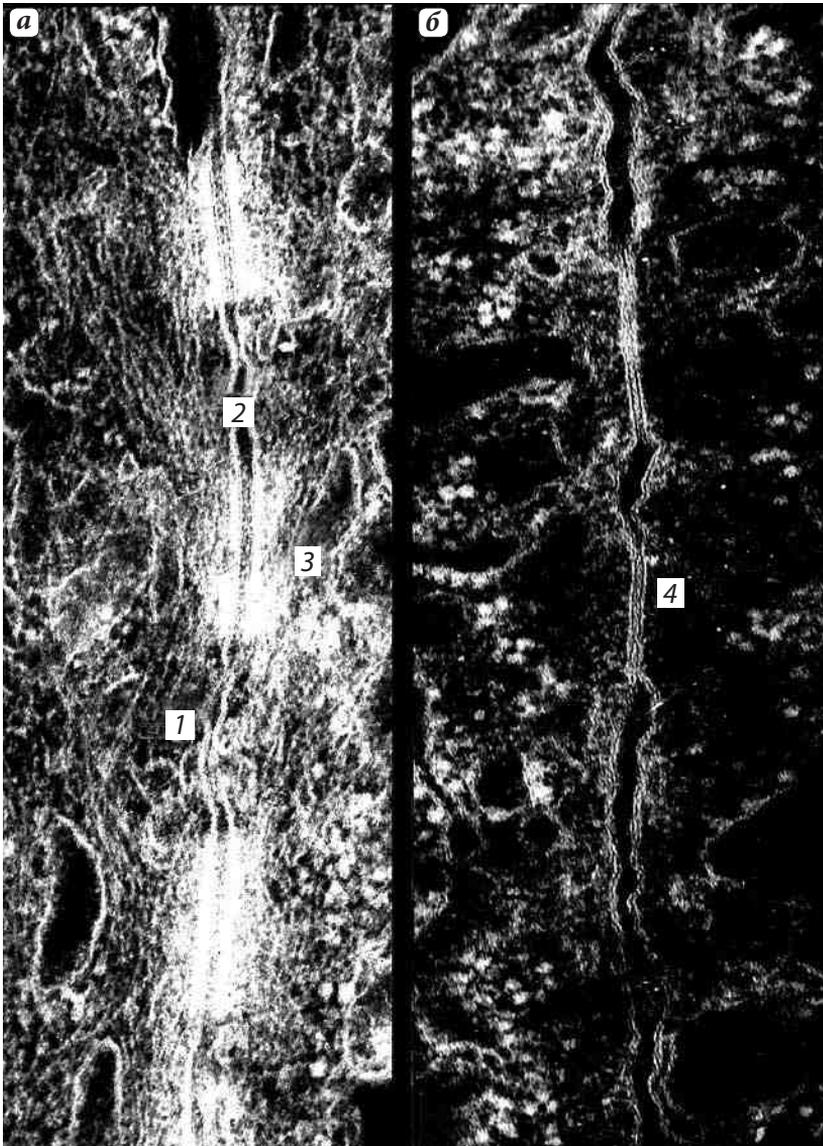
**Рис. 13.29.** Десмосома:

**а** — расположение в клетке; **б** — молекулярная схема; 1 — плазматическая мембрана; 2 — десмоглеиновый слой; 3 — слой десмоплакина; 4 — промежуточные филаменты; Д — десмосома; ПД — полудесмосома

плотного вещества, к которому примыкает слой тонких (6–7 нм) филаментов, лежащих вдоль плазматической мембраны в виде пучка, идущего по всему периметру клетки. Тонкие филаменты относятся к актиновым фибриллам, они связываются с плазматической мембраной посредством белков катенина, винкулина,  $\alpha$ -актинина, образующих плотный слой около мембранного слоя.

Функциональное значение такого ленточного соединения заключается не только в механическом сцеплении клеток друг с другом: при сокращении актиновых филаментов в ленте может изменяться форма клетки. Считается, что кооперативное сокращение актиновых фибрилл во всех клетках эпителиального пласта может вызвать изменение его геометрии, например, сворачивание в трубку, подобно тому, что происходит при образовании нервной трубки у эмбрионов позвоночных.

**Десмосомы**, структуры в виде бляшек или кнопок также соединяют клетки друг с другом (рис. 13.28–13.30). В межклеточном пространстве здесь также виден плотный слой, представленный взаимодействующими интегральными мембранными кадгеринами — десмоглеинами, которые сцепляют клетки друг с другом. С цитоплазматической стороны к плазмолемме прилежит слой белка-десмоплакина, с которым связаны промежуточные филаменты цитоскелета. Десмосомы встречаются чаще всего в эпителиях, в этом случае промежуточные филаменты содержат кератины. В сердечной мышце клетки, кардиомиоциты, содержат десминовые



**Рис. 13.30.** Межклеточные соединения (контакты):

**а** — десмосомы; **б** — щелевые соединения между клетками печени; 1 — плазматическая мембрана; 2 — межклеточное пространство; 3 — десмосома; 4 — щелевой контакт

фибриллы в составе десмосом. В эндотелии сосудов в состав десмосом входят виментиновые промежуточные филаменты.

**Полудесмосомы** в принципе сходны по строению с десмосомой, но представляют собой соединение клеток с межклеточными структурами. Так, в эпителиях линкерные гликопротеиды (интегрины) десмосомы взаимодействуют с белками т.н. базальной мембраны, куда входят коллаген, ламинин, протеогликаны и др.

Функциональная роль десмосом и полудесмосом сугубо механическая — они сцепляют клетки друг с другом и с подлежащим внеклеточным матриксом прочно, что позволяет эпителиальным пластам выдерживать большие механические нагрузки. Подобно этому десмосомы прочно связывают друг с другом клетки сердечной мышцы, что позволяет им выполнять огромную механическую нагрузку, оставаясь связанными в единую сокращающуюся структуру.

В отличие от плотного контакта все типы сцепляющих контактов проницаемы для водных растворов и не играют никакой роли в ограничении диффузии.

**Фокальные контакты, или бляшки сцепления,** встречаются у многих клеток и особенно хорошо изучены у фибробластов. Они построены по общему плану со сцепляющими лентами, но выражены в виде небольших участков — бляшек на плазмолемме. В этом случае трансмембранные линкерные белки-интегрины специфически связываются с белками внеклеточного матрикса (например с фибронектином) (см. рис. 13.28). Со стороны цитоплазмы эти же гликопротеиды связаны с примембранными белками, куда входит и винкулин, который в свою очередь связан с пучком актиновых филаментов. Функциональное значение фокальных контактов заключается как в закреплении клетки на внеклеточных структурах, так и создании механизма, позволяющего клеткам перемещаться.

**Щелевые контакты** считаются коммуникационными соединениями клеток; это структуры, которые участвуют в прямой передаче химических веществ из клетки в клетку, что может играть большую физиологическую роль не только при функционировании специализированных клеток, но и обеспечивать межклеточные взаимодействия при развитии организма, при дифференцировке его клеток. Характерным для этого типа контактов является сближение плазматических мембран двух соседних клеток на расстояние 2–3 нм (рис. 13.31). Именно это обстоятельство долгое время не позволяло на ультратонких срезах отличить данный вид контакта от плотного разделительного (закрывающего) контакта. При использовании гидроокиси лантана было замечено, что некоторые плотные контакты пропускают контрастер. В этом случае лантан заполнял тонкую щель шириной около 3 нм между сближенными плазматическими мембранами соседних клеток. Это и послужило появлению термина — щелевой контакт. Дальнейший прогресс в расшифровке его строения был достигнут при использовании метода замораживания—

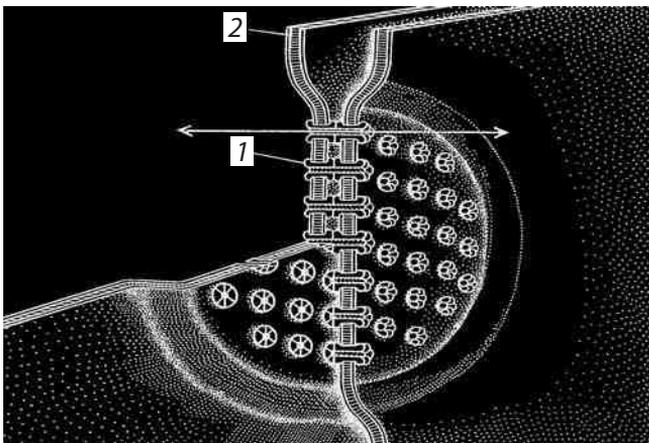


Рис. 13.31. Щелевое соединение, общая схема:

1 — коннексон; 2 — плазматическая мембрана

использовании гидроокиси лантана было замечено, что некоторые плотные контакты пропускают контрастер. В этом случае лантан заполнял тонкую щель шириной около 3 нм между сближенными плазматическими мембранами соседних клеток. Это и послужило появлению термина — щелевой контакт. Дальнейший прогресс в расшифровке его строения был достигнут при использовании метода замораживания—

скальвания. Оказалось, что на сколах мембран зоны щелевых контактов (размеров от 0,5 до 5 мкм) усеяны гексагонально расположенными с периодом 8–10 нм частицами 7–8 нм в диаметре, имеющими в центре канал около 2 нм шириной. Эти частицы получили название **коннексонов** (рис. 13.32). В зонах щелевого контакта может быть от 10–20 до нескольких тысяч коннексонов в зависимости от функциональных особенностей клеток. Коннексоны были выделены препаративно, они состоят из шести субъединиц **коннектина** — белка с молекулярным весом около 30 тыс. Объединяясь друг с другом, коннектины образуют цилиндрический агрегат — коннексон, в центре которого располагается канал. Отдельные коннексоны встроены в плазматическую мембрану так, что прободают ее насквозь. Одному коннексоны на плазматической мембране клетки точно противостоит коннексон на плазматической мембране соседней клетки так, что каналы двух коннексонов образуют единое целое. Коннексоны играют роль прямых межклеточных каналов, по которым ионы и низкомолекулярные вещества могут диффундировать из клетки в клетку. Коннексоны могут закрываться, изменяя диаметр внутреннего канала, и тем участвовать в регуляции транспорта молекул между клетками (рис. 13.33).

Оказалось, что при инъекции в одну клетку флуоресцирующего красителя метка быстро обнаруживается в соседних клетках. Используя разные флуорохромы, на клетках культуры ткани млекопитающих было обнаружено, что через щелевые контакты могут транспортироваться вещества с молекулярным весом не более 1–1,5 тыс. и размером не более 1,5 нм. Среди этих веществ были разные ионы, аминокислоты, нуклеотиды, сахара, витамины, стероиды, гормоны,

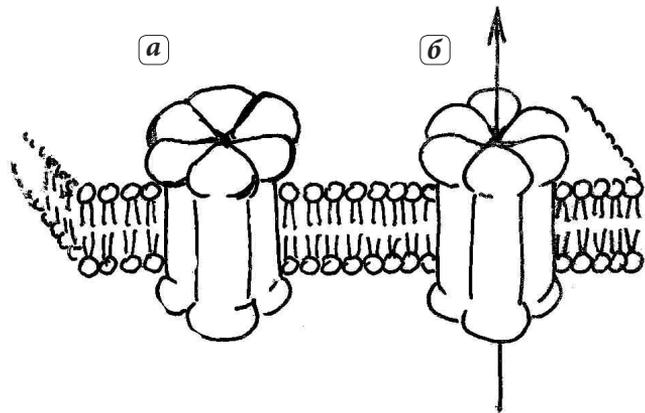


Рис. 13.32. Щелевое соединение в открытом (а) и закрытом (б) состоянии: 1 — коннексон; 2 — плазматическая мембрана

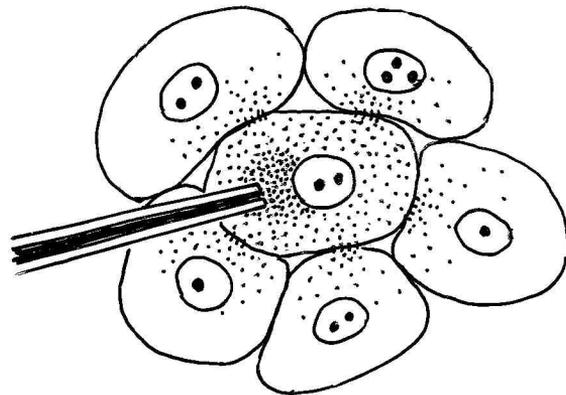


Рис. 13.33. Коммуникационная функция щелевых соединений. При микроинъекции низкомолекулярного флуорохрома в одну из клеток при активных щелевых соединениях краситель диффундирует в соседние клетки

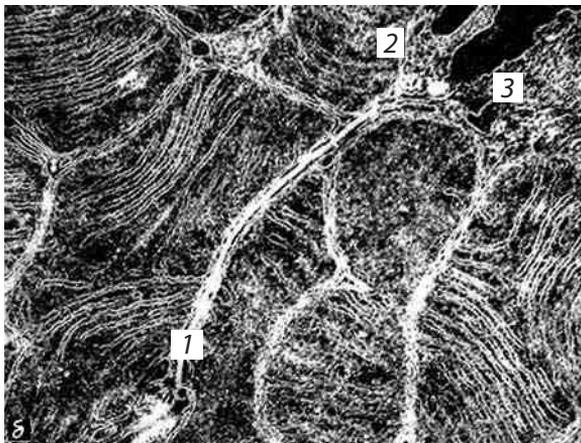


Рис. 13.34. Щелевое соединение (нексус) между кардиомиоцитами (э.м.)

связаны и адгезивными контактами) (рис. 13.31, 13.34). Это создает условие для синхронного сокращения огромного количества клеток. При росте культуры эмбриональных сердечных мышечных клеток (миокардиоциты) некоторые клетки в пласте начинают независимо друг от друга спонтанно сокращаться с разной частотой, и лишь только после образования между ними щелевых контактов они начинают биться синхронно как единый сокращающийся пласт клеток. Таким же способом обеспечивается совместное сокращение гладкомышечных клеток в стенке матки.

Щелевые контакты могут служить целям метаболической кооперации между клетками, обмениваясь различными молекулами, гормонами, цАМФ или метаболитами.

У ранних эмбрионов позвоночных, начиная с 8-клеточной стадии большинство клеток связано друг с другом щелевыми контактами. По мере дифференцировки эмбриона щелевые контакты между всеми клетками исчезают и остаются только между группами специализирующихся клеток. Например, при образовании нервной трубки связь клеток этой структуры с остальным эпидермисом прерывается, разобщается.

Размеры межклеточных каналов в коннексонах может регулироваться и даже полностью перекрываться. Это зависит от возрастания концентрации ионов  $Ca$  в одной из клеток при повреждении ее плазматической мембраны. Тем самым предотвращается распространение нарушенного ионного гомеостаза в соседних клетках (см. рис. 13.24).

Такое свойство очень важно для поддержания целостности и работы всего слоя клеток, так как повреждение одной из них не передается на соседний через щелевые контакты, которые перестают работать как межклеточные диффузионные каналы. Некоторые наследственные болезни, приводящие к дегенерации периферических нервов, мышечных тканей и др., связаны с мутациями коннексиновых белков. Так, мутация белка  $Cx26/\beta2$  приводит к глухоте, а  $Cx46/\alpha3$  — к катаракте.

цАМФ. Ни белки, ни нуклеиновые кислоты через щелевые контакты проходить не могут.

Такая способность щелевых контактов служить местом транспорта низкомолекулярных соединений используется в тех клеточных системах, где нужна быстрая передача электрического импульса (волны возбуждения) от клетки к клетке без участия нервного медиатора. Так, все мышечные клетки миокарда сердца связаны с помощью щелевых контактов (кроме того, клетки там

### Синаптический контакт (синапсы).

Этот тип контактов характерен для нервной ткани и встречается как между двумя нейронами, так и между нейроном и каким-либо иным элементом — рецептором или эффектором (например, нервно-мышечное окончание). Синапсы — участки контактов двух клеток, специализированных для односторонней передачи возбуждения или торможения от одного элемента к другому (рис. 13.35). В принципе, подобного рода функциональная нагрузка, передача импульса может осуществляться и другими типами контактов (например, щелевым контактом в сердечной мышце), однако в синаптической связи достигается высокая эффективность в реализации нервного импульса. Синапсы образуются на отростках нервных клеток — это терминальные участки дендритов и аксонов.

Межнейронные синапсы обычно имеют грушевидных расширений, бляшек на конце отростка нервной клетки. Такое терминальное расширение отростка одной из нервных клеток может контактировать и образовывать синаптическую связь как с телом другой нервной клетки, так и с ее отростками. Периферические отростки нервных клеток (аксоны) образуют специфические контакты с клетками-эффекторами или клетками-рецепторами. Следовательно, синапс — это структура, образующаяся между участками двух клеток (так же как и десмосома). Мембраны этих клеток разделены межклеточным пространством — синаптической щелью шириной около 20–30 нм. Часто в просвете этой щели виден тонковолокнистый, перпендикулярно расположенный по отношению к мембранам материал. Мембрана в области синаптического контакта одной клетки называется *пресинаптической*, другой, воспринимающей импульс, — *постсинаптической*. В электронном микроскопе обе мембраны выглядят плотными, толстыми. Около пресинаптической мембраны выявляется огромное количество мелких вакуолей, синаптических пузырьков, заполненных медиаторами. Синаптические пузырьки в момент прохождения нервного импульса выбрасывают свое содержимое в синаптическую щель. Постсинаптическая мембрана часто выглядит толще обычных мембран из-за скопления около нее со стороны цитоплазмы множества тонких фибрилл.

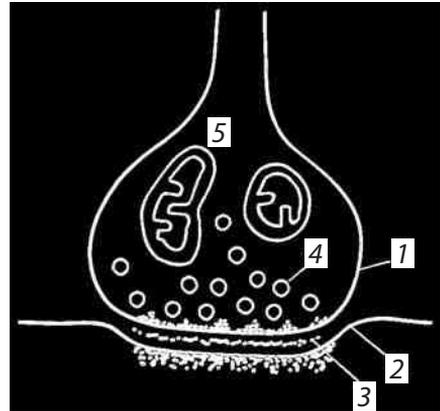


Рис. 13.35. Схема синаптического нервного соединения:

1 — пресинаптическая мембрана (мембрана отростка нервной клетки); 2 — постсинаптическая мембрана; 3 — синаптическая щель; 4 — синаптические пузырьки; 5 — митохондрии

# Глава 14

## Вакуолярная система внутриклеточного транспорта

Вакуолярная система, состоящая из одномембранных разнообразных по строению и функциям органелл (эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы, эндосомы, секреторные вакуоли) выполняет общую функцию синтеза, перестройки (модификации), сортировки и выведения (экспорта) из клетки биополимеров, главным образом белков-гликопротеидов, а также функцию синтеза мембран этой системы и плазматической мембраны.

Необходимо отметить, что синтез основной массы клеточных белков протекает на полисомах в цитозоле. Особенностью белкового синтеза в цитозоле является то, что в зависимости от типа иРНК синтезируются различные белки, направляющиеся строго к своим **внутриклеточным компонентам**. Это связано с тем, что

разные по назначению белки имеют определенные «сигнальные» последовательности аминокислот, как бы адреса, по которым разные белки распределяются в клетке. Так, ядерные белки имеют NLS-сигнальную последовательность, белки митохондрий имеют свою, так же как белки цитозоля, цитоскелета, пластид и пероксисом — свои сигнальные последовательности. Характерно, что все типы перечисленных белков начинают и заканчивают синтез в цитозоле и затем **посттрансляционно** с помощью внутриклеточных белковых комплексов переносятся «по адресам».

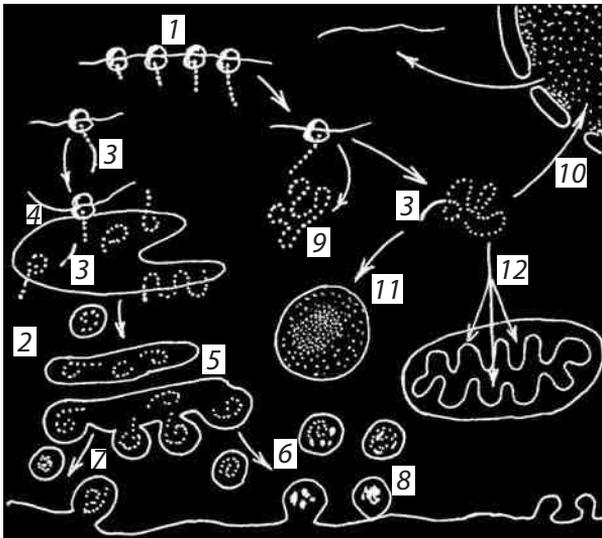


Рис. 14.1. Общая схема синтеза и перемещения белка в клетке:

1 — синтез белка на полирибосомах в цитозоле; 2 — вакуолярная система; 3 — сигнальные последовательности аминокислот; 4 — ЭПР-контрансляционный перенос; 5 — аппарат Гольджи; 6 — лизосомы; 7 — секреторные вакуоли; 8 — эндоцитоз; 9 — посттрансляционный перенос цитозольных белков, ядерных белков (10), белков пероксисом (11), митохондриальных белков (12)

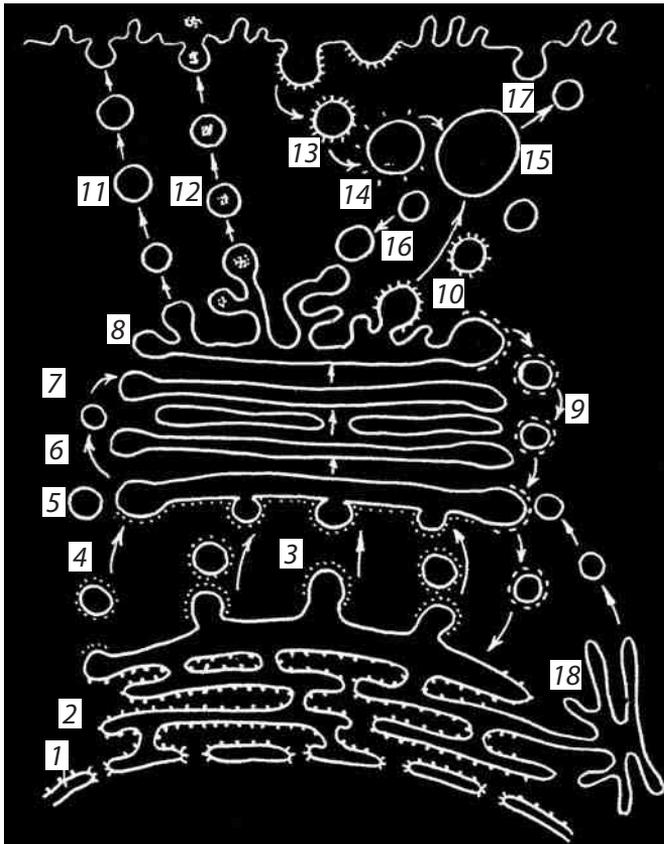
В отличие от этих типов белков, белки экспортного назначения и белки мембран синтезируются на рибосомах,

расположенных на мембранах эндоплазматического ретикулаума и попадают внутрь вакуолей, по мере синтеза полипептидной цепи, **котрансляционно**. Затем эти белки уже внутри вакуолей или в составе мембран вакуолей транспортируются внутри клетки (рис. 14.1).

## 1. Общая схема функционирования вакуолярной системы

На рис. 14.2 представлены мембранные везикулярные компоненты, объединенные в единую функциональную систему. Все они имеют общие свойства: это одномембранные компартменты, имеющие один общий источник образования (гранулярный эндоплазматический ретикулум). Для всей вакуолярной системы характерна кооперативность ее функционирования, взаимосвязь и последовательность этапов образования, перестройки, транспорта и экспорта синтезированных белков. Вкратце функции отдельных компонентов заключаются в следующем:

1. Гранулярный эндоплазматический ретикулум: котрансляционный синтез растворимых внутривакуолярных белков (секреторные белки, гидролазы лизосом)



**Рис. 14.2.** Общая схема вакуолярной системы клетки:

1 — ядерная оболочка; 2 — гранулярный эндоплазматический ретикулум; 3 — переходная зона (ERAG-комплекс); 4 — перенос от ЭР к АГ; 5 — проксимальные участки (cis) АГ; 6 — средняя часть (med) АГ; 7 — дистальная (trans) часть АГ; 8 — сеть АГ (TGN); 9 — возвратный путь вакуолей АГ; 10 — отделение первичных лизосом; 11 — постоянная экскреция (секреция); 12 — сигнальная секреция; 13 — эндоцитоз; 14 — эндосома; 15 — вторичная лизосома; 16 — возврат лизосомных мембран в TGN; 17 — возврат рецепторов в плазматическую мембрану; 18 — гладкий эндоплазматический ретикулум

- и др.); котрансляционный синтез нерастворимых белков, входящих в состав всех мембран вакуолярной системы; первичная модификация растворимых и нерастворимых (мембранных) белков, их соединение с олигосахаридами — первичное гликозилирование синтезированных белков, образование гликопротеидов; синтез мембранных липидов и их встраивание в мембрану — «сборка мембран».
2. Отделение вакуолей, содержащих новообразованные продукты и их переход в цис-зону аппарата Гольджи (ЭПР-АГ комплекс).
  3. Цис-зона аппарата Гольджи: вторичная модификация гликопротеидов; синтез полисахаридов (гемицеллюлоза растений) и гексозаминогликанов.
  4. Промежуточная зона аппарата Гольджи: дополнительные модификации гликопротеидов, трансгликозилирование.
  5. Транс-Гольджи сеть: сортировка секреторных и лизосомных белков; отделение вакуолей.
  6. Экзоцитоз (секреция).
  7. Экзоцитоз постоянный (конститутивный).
  8. Отделение первичных лизосом с гидролазами.
  9. Эндоцитоз (образование эндосом).
  10. Образование вторичных лизосом.
  11. Рециклизация рецепторов гидролаз.
  12. Рециклизация рецепторов плазматической мембраны.
  13. Гладкий эндоплазматический ретикулум: синтез и конденсация немембранных липидов, депонирование ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , синтез и ресорбция гликогена и др.
  14. Транспорт вакуолей в зону аппарата Гольджи.
  15. Транспорт вакуолей от аппарата Гольджи в эндоплазматический ретикулум.

## 2. Гранулярный эндоплазматический ретикулум

Отличительная черта вакуолярной системы в том, что синтезированные полимеры и продукты их превращений отделены от собственно цитоплазмы, от цитозоля, и становятся изолированными от цитозольных ферментов. Такое разобщение очень важно для одновременного протекания в клетке многих синтетических процессов.

Открытие этой внутриклеточной мембранной структуры произошло на заре электронной микроскопии. В 1945 г. К. Портер с сотрудниками изучал фибробласты цыплят в электронном микроскопе. В это время еще не была разработана техника ультратонких срезов, поэтому авторы просматривали клетки на просвет, целиком. В световом микроскопе в фибрибластах после фиксации и окраски видно, что периферия клеток (эктоплазма) окрашивается слабо, в то время как центральная часть клеток (эндоплазма) хорошо воспринимает красители. Портер увидел в электронном микроскопе, что зона эндоплазмы заполнена большим числом мелких вакуолей и каналов, соединяющихся друг с другом и образующих что-то наподобие рыхлой сети (ретикулум). Было видно, что стопки этих вакуолей и канальцев ограничены

тонкими мембранами. Так был обнаружен *эндоплазматический ретикулум*, или *эндоплазматическая сеть*. Позднее, в 50-х годах, при использовании метода ультратонких срезов удалось выяснить структуру этого образования и обнаружить его неоднородность. Самым же главным оказалось, что эндоплазматический ретикулум (ЭПР) встречается практически у всех эукариот.

Подобный электронно-микроскопический анализ позволил выделить два типа ЭПР: гранулярный (шероховатый) и гладкий.

На ультратонких срезах гранулярный ЭПР представлен замкнутыми мембранами, которые образуют на сечениях вытянутые мешки, цистерны или же имеют вид узких каналов (рис. 14.3, 14.4). Ширина полостей цистерн может очень варьировать в зависимости от функциональной активности клетки. Наименьшая ширина их может составлять около 20 нм, в расширенном виде они достигают диаметра в несколько мкм. Отличительная черта этих мембран в том, что они со стороны гиалоплазмы покрыты мелкими (около 20 нм), темными, почти округлыми, частицами — *гранулами*.

Впервые эти гранулы были описаны Дж. Паладе (гранулы Паладе), который доказал, что они представляют собой рибонуклеопротеиды. Теперь хорошо известно, что эти гранулы не что иное, как рибосомы, связанные с мембранами ЭПР. На мембранах рибосомы расположены в виде полисом (множество рибосом, объединенных одной информационной РНК), имеющих вид плоских спиралей, розеток или гроздей. Это работающие, синтезирующие белок рибосомы, которые прикрепляются к мембранам своей большой субъединицей.

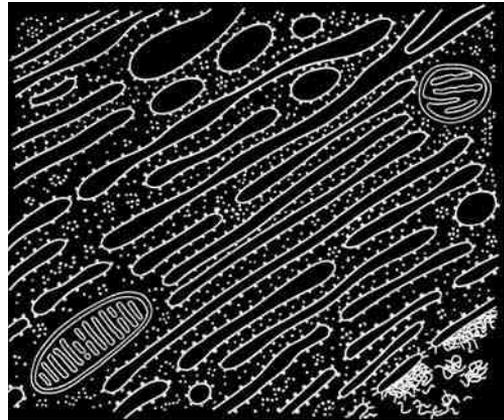


Рис. 14.3. Гранулярный эндоплазматический ретикулум (эргастоплазма) в клетке поджелудочной железы (ультратонкий срез)

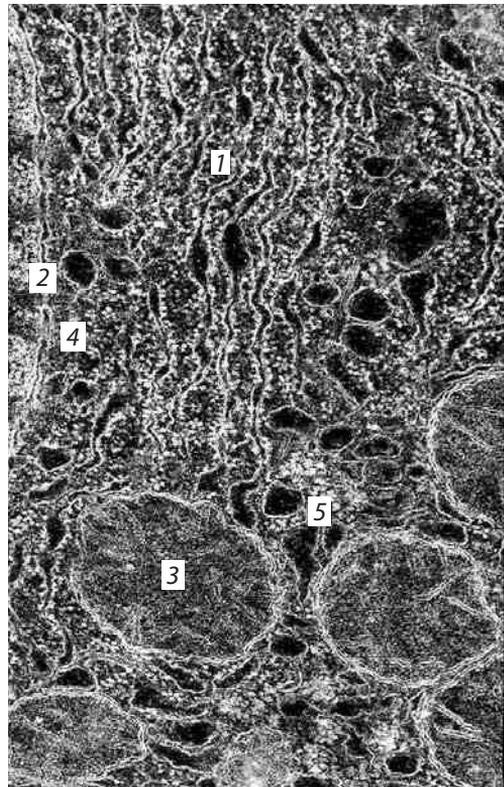
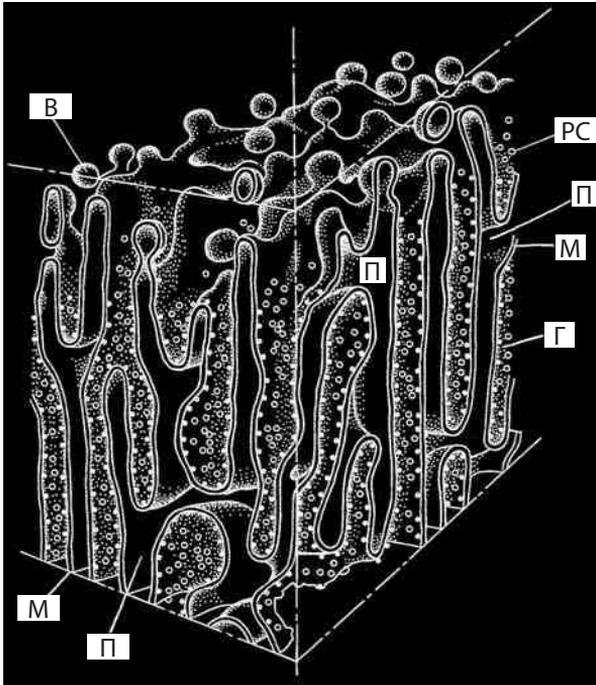


Рис. 14.4. Эндоплазматический гранулярный ретикулум (1) в клетке печени мыши:

2 — ядерная оболочка; 3 — митохондрия; 4 — рибосомы цитозоля; 5 — зона вакуолей гладкого ретикулума



**Рис. 14.5.** Схема строения каналов и полостей гранулярно-эндоплазматического ретикулума:

РС — рибосомы, прикрепленные к мембранам со стороны гиалоплазмы; П — полости плоских цистерн и каналов, отделенных мембранами от гиалоплазмы; В — вакуоли с синтезированными продуктами, отщепляющиеся от цистерн гранулярного ЭР; в этих зонах исчезают рибосомы на мембранах

Гранулярный (или шероховатый, в отличие от гладкого) ЭПР может в клетках быть представлен или в виде редких разрозненных мембран или же в виде локальных скоплений таких мембран (эргастоплазма) (рис. 14.5). Первый тип гранулярного ЭПР характерен для недифференцированных клеток или клеток с низкой метаболической активностью. Эргастоплазма характерна для клеток, активно синтезирующих секреторные белки. Так, в клетках печени гранулярный ЭПР собран в отдельные зоны (тельца Берга), так же как в некоторых нервных клетках (тигроид). В клетках поджелудочной железы гранулярный ЭПР (эргастоплазма) в виде плотно упакованных друг около друга мембранных цистерн занимает базальную и околоядерную зоны клетки.

Наличие полисом на мембранах однозначно показывает на то, что гранулярный ЭПР является важным местом синтеза белков.

Количество рибосом на ЭПР четко связано с его синтетической активностью. Так, на мембранах ЭПР в клетке несекретирующей молочной железы связывается до 25% клеточных рибосом, после стимуляции лактации их количество там возрастает до 70%. Падение числа рибосом на мембранах ЭПР может происходить при дифференцировке клеток. Например, при частичном удалении печени у грызунов резко стимулируется деление клеток в оставшейся части. Это сопровождается редукцией гранулярного ЭПР и обеднением его рибосомами: число свободных рибосом, не связанных с мембранами, достигает 40%. Такое же уменьшение числа рибосом, связанных с ЭПР, наблюдается при различных патологических состояниях клеток (при алкогольном хроническом отравлении происходит уменьшение числа связанных рибосом на 25%).

Рибосомы, связанные с мембранами ЭПР, участвуют в синтезе белков, выводимых из данной клетки, «экспортируемых» белков.

Действительно, большое число клеток многоклеточных организмов, богатых гранулярным ЭПР, синтезирует и выводит огромное количество белков. Так,

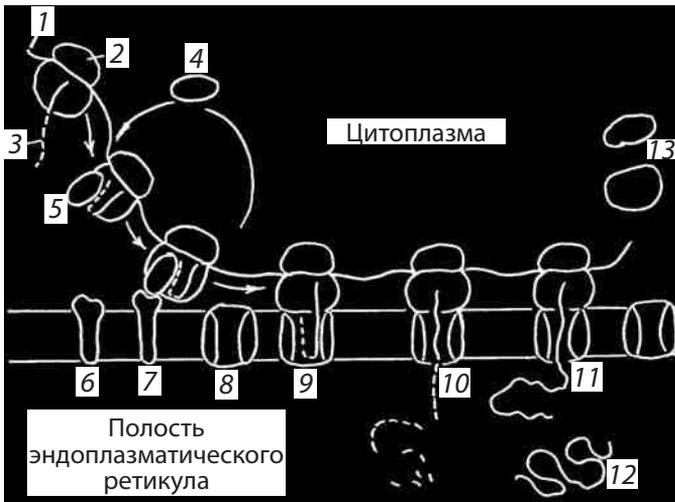
клетки ацинусов поджелудочной железы синтезируют и выделяют массу белков - ферментов, участвующих в расщеплении пищи в кишечном тракте (протеиназы, липазы, нуклеазы и др.); клетки печени — альбумины крови; плазмоциты —  $\gamma$ -глобулины; молочной железы — казеин; слюнной железы — пищеварительные ферменты, амилазу и РНКазу и т.д. Другими словами, у многоклеточных организмов клетки, богатые эргастоплазмой, синтезируют выводимые из этих клеток белки, необходимые или для работы других клеток, или для выполнения общеорганизменных функций (пищеварительные ферменты, белки плазмы крови, гормоны и др.).

У одноклеточных также можно наблюдать гранулярный ЭПР, который, по-видимому, участвует в синтезе выводимых экспортируемых белков. Среди таких белков могут быть не только ферменты внеклеточного пищеварения.

Следовательно, роль гранулярного ЭПР заключается не просто в участии в синтезе белков на рибосомах его мембран, но и в процессе сегрегации, обособления этих синтезированных белков, в их изоляции от основных функционирующих белков клетки. Эта функциональная особенность гранулярного ЭПР очень важна, так как она связана с целым рядом процессов, приводящих к выделению таких белков с помощью вакуолей аппарата Гольджи.

### 3. Котрансляционный перенос растворимых белков

Пути синтеза белков на рибосомах ЭПР можно представить в следующем виде (рис. 14.6). Еще в гиалоплазме происходит связывание иРНК, кодирующей секреторный белок, с рибосомой и начинается синтез белковой цепи. Важно то, что сначала синтезируется «сигнальная последовательность», богатая гидрофобными аминокислотами. В нее входит 16–30 аминокислот. Эта «сигнальная



**Рис. 14.6.** Синтез растворимых (секреторных) белков в ЭПР:

1 — иРНК; 2 — функционирующая рибосома; 3 — сигнальный конец синтезирующегося пептида; 4 — SRP-частица; 5 — SRP-частица связывается с сигнальным пептидом и прекращает синтез белка; 6 — рецептор SRP-частицы; 7 — связь рецептора с SRP-частицей; 8 — каналные белки мембраны ЭПР (транслоконы); 9 — освобождение SRP-частицы и продолжение роста белковой молекулы; 10 — отщепление и деградация сигнальной последовательности синтезируемого белка; 11 — продолжение роста белковой цепи; 12 — синтезированный белок в просвете вакуоли ЭПР; 13 — диссоциированная рибосома

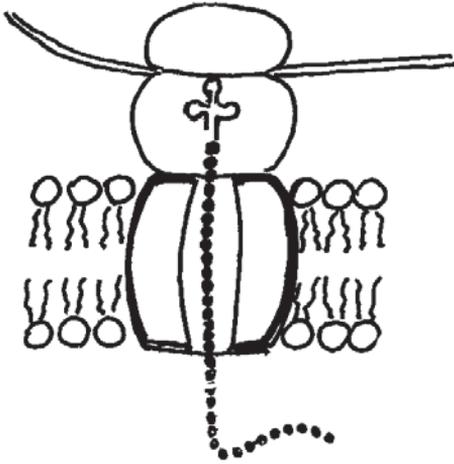


Рис. 14.7. Транслокон-интегральный комплексный белок ЭПР участвует в трансмембранном, котрансляционном переносе синтезирующейся на рибосоме белковой цепи

последовательность» в цитозоле узнается и связывается с «узнающей сигнал частицей» (SRP-частица), состоящей из одной молекулы 7S РНК и 6 различных полипептидных цепей. SRP-частица связывается после узнавания сигнального конца синтезирующейся молекулы белка с рибосомой, что приводит к полной остановке синтеза белка. На поверхности же мембраны ЭПР, обращенной к гиалоплазме, расположены интегральные рецепторные белки, связывающиеся с SRP-частицами. В результате SRP-частица связывается со своим рецептором и одновременно связывает данную рибосому с мембраной ЭР.

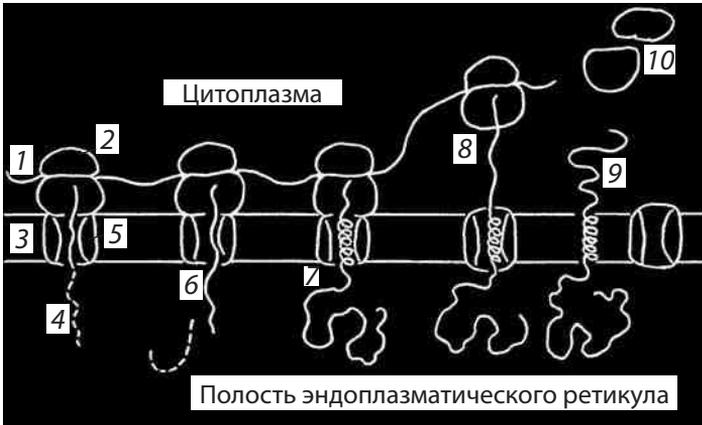
Такая «заякоренная» рибосома с SRP-частицей, блокирующей дальнейший рост полипептидной цепи, взаимодействует с большим белковым каналным комплексом — **транслаконом** (рис. 14.7).

После связывания рибосомы с транслаконом происходит отделение SRP-частицы и синтезированный первичный пептид входит в канал диаметром около 2 нм, который образует транслакон. После этого возобновляется синтез полипептида, он удлиняется и его сигнальная последовательность, вместе с растущей цепочкой оказывается внутри полости цистерны ЭПР. Таким образом, синтезируемый белок проходит сквозь мембрану ЭПР во время его синтеза, т.е. **котрансляционно**, одновременно с его трансляцией. Внутри полости ЭПР с помощью фермента (сигнальная пептидаза) сигнальная последовательность отщепляется. После окончания синтеза вся белковая молекула оказывается в полости ЭПР и в это время рибосома отделяется от транслакона и диссоциирует. После этого в транслаконе канал закрывается. Во время трансмембранного переноса растущей белковой цепи происходит ее связь с олигосахаридами (гликозилирование — см. ниже). В полости цистерн ЭПР белки претерпевают ряд дополнительных изменений: образуются дисульфидные связи, происходит их правильное сворачивание, происходит сборка четвертичной структуры белков. Только белки с правильной конформацией в дальнейшем будут переноситься в зону аппарата Гольджи.

#### 4. Синтез нерастворимых (мембранных) белков

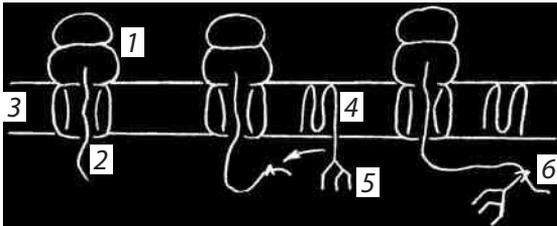
В гранулярном ЭПР происходит синтез белков, которые, встраиваясь в мембрану ЭПР, становятся интегральными мембранными белками (рис. 14.8).

Начальные стадии синтеза мембранных белков похожи на таковые при синтезе растворимых белков. Здесь также участвуют SRP-частицы, узнающие сигнальную



**Рис. 14.8.** Синтез мембранных белков в ЭПР:

1 — иРНК; 2 — рибосома, 3 — мембрана ЭР; 4 — растущий пептид после освобождения SRP-частицы; 5 — каналные белки мембраны ЭПР (транслоконы); 6 — отщепление сигнального пептида; 7 — «стоп» сигнальный участок растущего пептида закрепляет его в мембране ЭР; 8 — продолжение роста белка в цитозольное пространство; 9 — образовавшийся интегральный мембранный белок; 10 — диссоциированная рибосома



**Рис. 14.9.** Первичное гликозилирование в ЭПР:

1 — рибосома; 2 — растущий пептид; 3 — мембрана ЭР; 4 — липид долихол, связанный с олигосахаридным предшественником (5); 6 — связь олигосахарида с белковой цепочкой

последовательность, также происходит прохождение начального участка белковой цепи через транслокон. Однако в цепи синтезирующегося мембранного белка существует одна или несколько аминокислотных *стоп-последовательностей*, которые препятствуют белковой цепи пересекать мембрану, и белок в области стоп-сигнала остается связанным с мембраной, но при этом синтез белка на рибосоме не останавливается. Это приводит к тому, что в области стоп-сигнала локализуется гидрофобный  $\alpha$ -спиральный участок, а весь белок остается встроенным в мембрану. В некоторых белках число  $\alpha$ -спиральных «заякоряющих» участков может быть от одного до нескольких. Мембранные белки, также как и растворимые, могут подвергаться различным модификациям. Наиболее характерно для ЭПР — *первичное гликозилирование* — ковалентное связывание белковой цепи со сложным олигосахаридом. В результате этого синтезирующийся белок становится гликопротеидом (рис. 14.9).

Большинство белков, синтезированных в гранулярном ЭПР, относится к гликопротеидам. Связывание синтезирующейся белковой цепи с олигосахаридами происходит также котрансляционно. При этом на белковую молекулу переносится готовый блок олигосахаридов, который связывается с аспарагиновыми остатками белковой молекулы (см. рис. 14.9). Этот олигосахаридный комплекс содержит 2 молекулы N-ацетилгликозамина, 9 молекул маннозы и 3 молекулы глюкозы и связан со специальным липидом долихолом на внутренней поверхности мембраны ЭПР, смотрящей в просвет вакуоли ЭПР. По мере транслокации белковой цепи во время ее синтеза, каждый аспарагиновый остаток связывается с олигосахаридным

комплексом, с помощью фермента, являющегося интегральным белком мембран ЭПР. Первичной модификации, гликозилированию, подвергаются как растворимые, так и мембранные белки, синтезирующиеся в ЭПР.

При различных клеточных патологиях гранулярный ЭПР уменьшается в объеме при общем падении синтеза белка; при обводнении клеток происходит набухание ЭПР и потеря гранулярного компонента — рибосом.

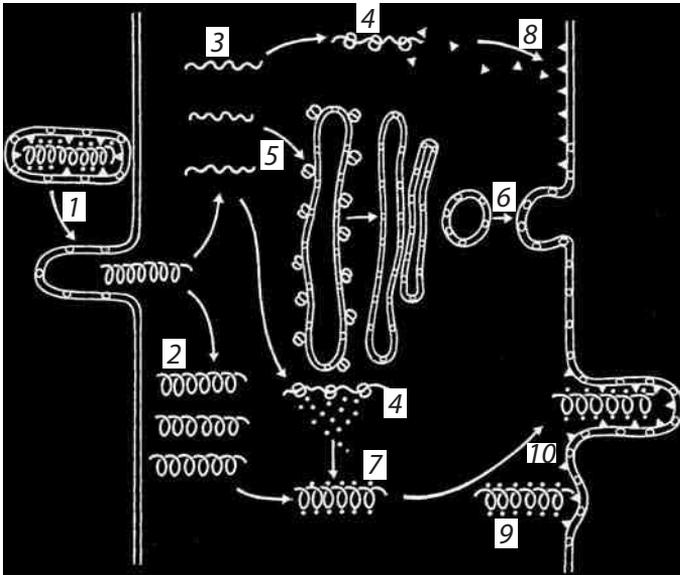
## 5. Синтез клеточных мембран

Итак, на рибосомах ЭПР происходит синтез основной части мембранных белков клетки. Синтез этих белков отличается от синтеза секреторных тем, что по мере синтеза мембранные белки не освобождаются от мембран, а остаются в их составе, становясь таким образом или трансмембранными интегральными белками, или полуинтегральными.

В ЭПР происходит синтез и сборка липидов самих мембран, включая фосфолипиды и холестерол. Ферменты, участвующие в синтезе липидов, встроены в мембрану ЭПР со стороны цитозоля, и синтез липидов происходит на мембране там же. Таким образом, синтезированные липиды встраиваются в мембрану ЭПР в липидный слой со стороны цитоплазмы, но переносятся на внутреннюю сторону с помощью переносчиков фосфолипидов. Таким образом, билипидный слой мембраны растет, увеличивая поверхность вакуоли или цистерны ЭПР. Этот процесс идет одновременно с синтезом интегральных мембранных белков, так что липопротеидная мембрана, как таковая, строится и растет за счет двух процессов: синтеза и встраивания липидов, и синтеза и интеграции мембранных белков. Необходимо подчеркнуть, что такое «зарождение» мембран вакуолярной системы происходит только в гранулярном ЭПР. Синтез мембран митохондрий происходит независимо от ЭПР.

Сегодня можно сказать, что важнейшей функцией гранулярного ЭПР, вне зависимости от специализации или тканевой принадлежности клеток, является функция образования, построения клеточных мембран, которая заключается в том, что элементы гранулярного ЭПР синтезируют все мембранные белки, синтезируют липидный компонент мембран, но, кроме того, именно в гранулярном ЭПР происходит сборка липопротеидных мембран.

Этот процесс хорошо прослежен и проанализирован на примере образования вируса везикулярного стоматита (VSV) (рис. 14.10). Это РНК-содержащий вирус, построенный из небольшого числа белков и покрытый снаружи липопротеидной мембраной. В зрелой частице VSV кроме одной молекулы РНК есть белок, входящий в рибонуклеопротеидный комплекс (N-белок), белок, крепящий этот комплекс с окружающей мембраной (M-белок), и специфический белок мембранной оболочки (G-белок). Мембранная оболочка VSV произошла от клетки хозяина, в которой этот вирус развивается: по мере выхода РНП вируса происходит образование выроста плазматической мембраны, напоминающего короткую микроворсинку, куда включается нуклеоид (РНП) вируса, затем такой вырост



**Рис. 14.10.** Схема развития вируса везикулярного стоматита (VSV) в инфицированной клетке:

1 — вхождение вирусной РНК в клетку; 2 — репликация вирусной РНК и образование информационной РНК (3); 4 — синтез М- и N-белков на рибосомах цитозоля; 5 — синтез G-белка в ЭПР; 6 — G-белок на пути к плазматической мембране; 7 — связывание N-белка с вирусной РНК; 8 — связывание M-белка с плазматической мембраной; 9, 10 — образование новой вирусной частицы и выход ее из клетки. ● — N-белок, ▲ — M-белок, ○ — G-белок

отделяется от поверхности клетки, и получается готовая зрелая частица VSV. Благодаря G-белку такая частица может специфически контактировать с незараженной клеткой; мембрана VSV и плазматические мембраны клеток сливаются, а вирусный рибонуклеопротеид оказывается в цитоплазме клетки, где развивается инфекционный процесс. При этом останавливаются синтезы нормальных белков клетки-хозяина, и начинается синтез только вирусных белков на рибосомах инфицированной клетки. Вирусная РНК кодирует только пять белковых молекул. Две из них являются ферментами, необходимыми для репликации и транскрипции вирусного генома, третья — N-белок, четвертая кодирует M-белок, пятая — специфический гликопротеин, G-белок. Это интегральный белок мембраны, окружающий зрелую вирусную частицу.

При заражении клеток VSV с молекулы его РНК считывается пять разных иРНК, с помощью которых на рибосомах клетки происходит синтез вирусных белков. N-белок и M-белок синтезируются на свободных полисомах и связываются с размножившимися молекулами вирусной РНК и с мембраной клетки. Синтез G-белка происходит на полисомах гранулярного эндоплазматического ретикулума. В этом случае синтез G-белка также начинается с синтеза «сигнальной» аминокислотной последовательности, которая проходит сквозь мембрану и как бы тянет за собой остальную растущую цепь аминокислот. Но, в отличие от секреторных белков, G-белок остается связанным с мембраной ЭПР. Большая его часть находится в просвете цистерн ЭПР, где она принимает специфическую конформацию и присоединяет два первичных участка углеводных цепей. Часть молекулы G-белка погружена и проходит через билипидный слой мембраны, а небольшой участок С-конца торчит на цитоплазматической части мембраны. Дальнейшая судьба G-белка хорошо прослежена: через 20–30 мин после синтеза он обнаруживается в составе интегральных белков аппарата Гольджи. Здесь происходит

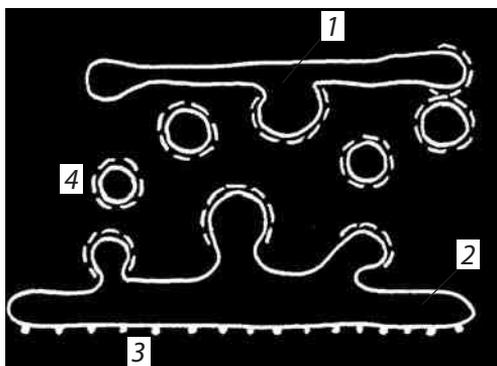
дополнительный рост его углеводных цепей. Позже его обнаруживают в составе интегральных белков плазматической мембраны.

Из этих экспериментов следует, что интегральные белки мембран эндоплазматического ретикулума, мембран аппарата Гольджи, секреторных вакуолей и плазматической мембраны имеют одно происхождение: они синтезируются и встраиваются в мембрану в гранулярном ЭПР.

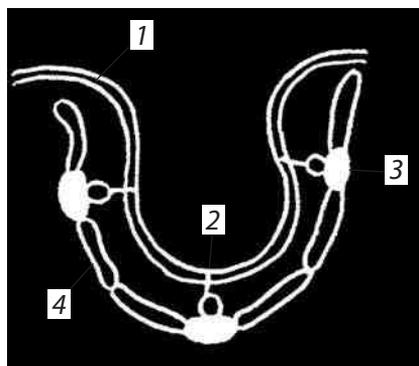
Следовательно, гранулярный эндоплазматический ретикулум представляет собой настоящую «фабрику» клеточных мембран. От того, какие интегральные и периферические белки будут синтезироваться на рибосомах ЭПР и какие фосфолипиды будут здесь синтезироваться и включаться в мембрану, будет зависеть тип образующегося нового участка мембраны; будет ли он компонентом гладкого ЭПР, мембран аппарата Гольджи, лизосомы или плазматической мембраны.

## 6. Транспорт между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи

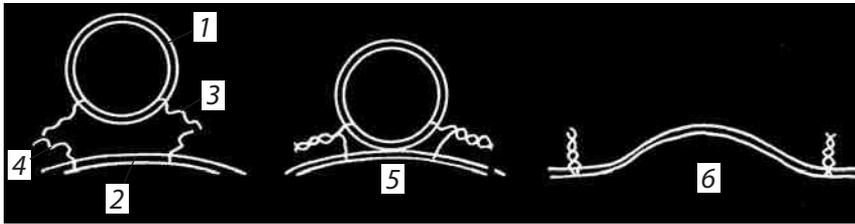
Дистальные участки гранулярного ЭПР, которые расположены в зоне, приближенной к аппарату Гольджи (АГ), теряют рибосомы и образуют мембранные выступы, от которых отпочковываются мелкие вакуоли, содержащие синтезированные в ЭПР белки. Эта зона называется ЭПР-АГ-промежуточный компартмент (ERGIC), или везикулярно-тубулярная группа (VTC) (рис. 14.11). Вакуоли, отщепившиеся в этой зоне от ЭПР, транзитные элементы, покрыты окаймляющим белковым слоем, аналогичным клатриновому слою эндоцитозных вакуолей. Белки этого слоя также относятся к COP-белкам, в данном случае отщепляющиеся вакуоли покрыты комплексом COP II, состоящим из нескольких гетеродимеров, связанных с мембраной посредством белка Sar 1p, малой ГТФазой (рис. 14.12). Отделившиеся от ЭПР вакуоли становятся окаймленными пузырьками, затем они



**Рис. 14.11.** Переходная зона ЭПР-АГ:  
1 — вакуоль cis зоны АГ; 2 — ЭПР; 3 — рибосомы; 4 — мембраны и вакуоли, покрытые COP II



**Рис. 14.12.** Образование отщепляющейся вакуоли:  
1 — мембрана; 2 — рецепторный белок; 3 — белок, связывающий ГТФ; 4 — COP-белки, покрывающие вакуоль



**Рис. 14.13.** Процесс нахождения транспортной вакуолю (1) мишенной мембраны (2), сближение (5) и слияние (6)

3 — белок V-SNARE; 4 — белок T-SNARE.

теряют белковую оболочку и сливаются друг с другом и транспортируются с помощью микротрубочек к цис-зоне аппарата Гольджи, где и сливаются с его мембранами. Адресность и точность слияния любых вакуолей с другими мембранами определяется специальными белками SNARE (рецептор белков, участвующих в прикреплении и слиянии мембран).

После деполимеризации окаймляющего слоя COP II на поверхности вакуоли открываются интегральные мембранные белки — V-SNARE. Эти белки специфичны для каждого типа вакуолей, направляя их к тому участку, где они должны слиться с другими мембранами. Там они связываются с мембранными белками T-SNARE и SNAP25 (рис. 14.13).

В местах взаимодействия этих двух групп белков и происходит слияние мембран. Так происходит транспорт синтезированных белков в зону аппарата Гольджи.

# Глава 15

## Аппарат (комплекс) Гольджи

В 1898 г. итальянский ученый К. Гольджи, используя свойства связывания тяжелых металлов (осмия и серебра) с клеточными структурами, выявил в нервных клетках сетчатые образования, которые он назвал «внутренним сетчатым аппаратом» (рис. 15.1). Дальнейшее усовершенствование метода окраски металлами (импрегнации) дало возможность убедиться, что сетчатые структуры (аппарат Гольджи) встречаются во всех клетках любых эукариотных организмов. Обычно элементы аппарата Гольджи расположены около ядра, вблизи клеточного центра (центриоли). Участки аппарата Гольджи, четко выявляемые методом импрегнации, имели в некоторых клетках вид сложных сетей, где ячейки были связаны друг с другом или представлялись в виде отдельных темных участков, лежащих независимо друг от друга (диктиосомы), имеющих вид палочек, зерен, вогнутых дисков и т.д. (рис. 15.2). Между сетчатой и диффузной формой аппарата Гольджи нет принципиального различия, так как часто в одних и тех же клетках наблюдается смена форм этого органоида. Элементы аппарата Гольджи часто связаны с вакуолями, что особенно характерно для секретирующих клеток.

Было обнаружено, что морфология АГ меняется в зависимости от стадий клеточной секреции, что послужило основанием Д.Н. Насонову (1924) выдвинуть гипотезу о том, что АГ является органоидом, обеспечивающим сепарацию и накопление веществ в самых различных клетках.

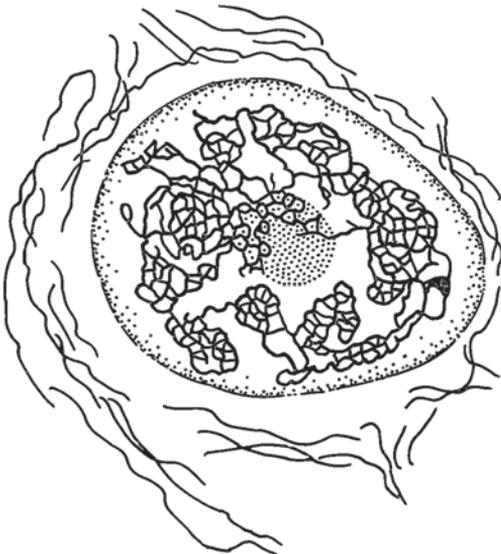
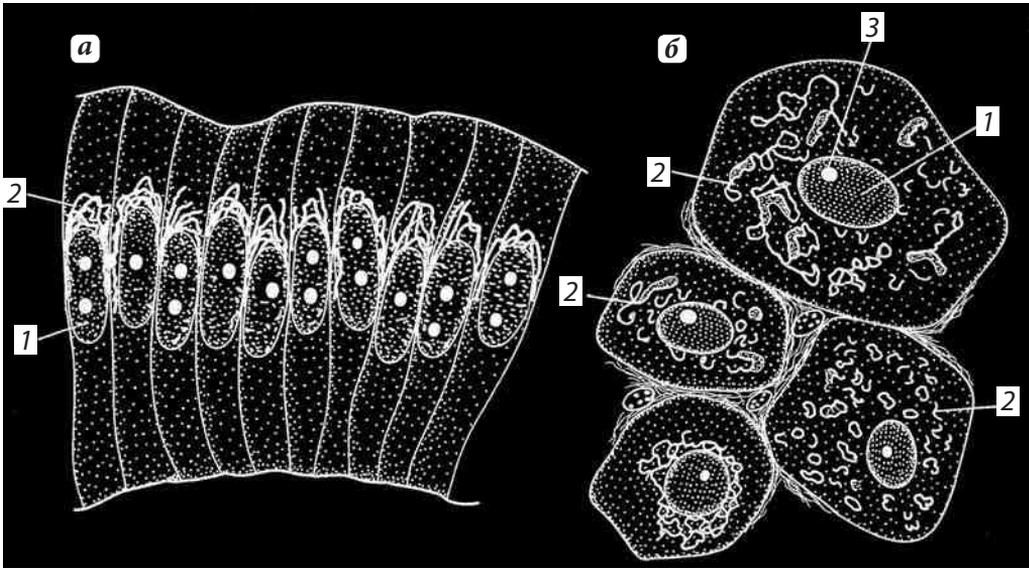


Рис. 15.1. Внутриклеточный сетчатый аппарат по рисунку К. Гольджи (1898)

### 1. Тонкое строение аппарата Гольджи

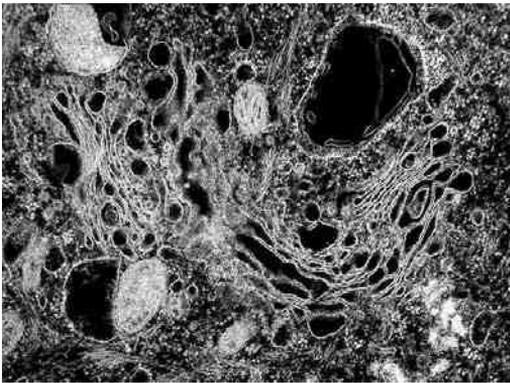
В электронном микроскопе видно, что аппарат Гольджи представлен мембранными структурами, собранными вместе в небольшой зоне (рис. 15.3). Отдельная зона скопления этих мембран является **диктиосомой** (рис. 15.4). В диктиосоме плотно друг к другу (на расстоянии 20–25 нм) расположены в



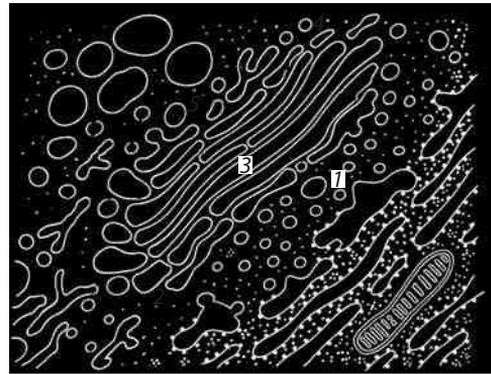
**Рис. 15.2.** Типы аппарата Гольджи:

**а** — сетчатый в клетках кишечного эпителия; **б** — диффузный в клетках спинального ганглия;

1 — ядро; 2 — АГ; 3 — ядрышко



**Рис. 15.3.** Аппарат Гольджи (АГ) в электронном микроскопе



**Рис. 15.4.** Схематическое изображение компонентов аппарата Гольджи:

1 — ЭПР-АГ (ERGIC) — промежуточная зона; 2 — цис-зона, проксимальный участок; 3 — медиальный — средний участок; 4 — транс-дистальный участок; 5 — транс-сеть АГ

виде стопки плоские мембранные мешки, или цистерны, между которыми располагаются тонкие прослойки гиалоплазмы. Каждая отдельная цистерна имеет диаметр около 1 мкм и переменную толщину; в центре ее мембраны могут быть сближены (25 нм), а на периферии иметь расширения, ампулы, ширина которых непостоянна. Количество таких мешков в стопке обычно не превышает 5–10. У некоторых одноклеточных их число может достигать 20 штук. Кроме плотно расположенных плоских цистерн в зоне АГ наблюдается множество вакуолей. Мелкие

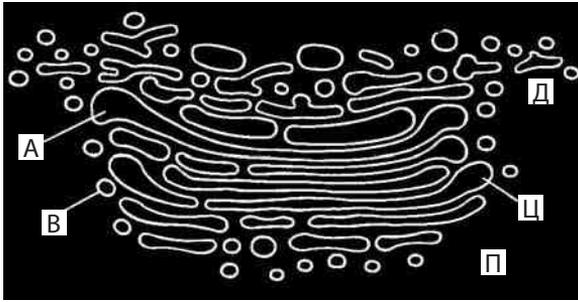


Рис. 15.5. Схема строения диктиосомы:

П — проксимальная (цис-) часть; Д — дистальная (транс-) часть; В — вакуоли; Ц — плоские мембранные цистерны; А — ампулярные расширения цистерн

вакуоли встречаются главным образом в периферических участках зоны АГ; иногда видно, как они отшнуровываются от ампулярных расширений на краях плоских цистерн. Принято различать в зоне диктиосомы проксимальный или формирующийся, цис-участок, и дистальный или зрелый, транс-участок (рис. 15.5). Между ними располагается средний или промежуточный участок АГ.

Во время деления клеток сетчатые формы АГ распадаются до диктиосом, которые пассивно и случайно распределяются по дочерним клеткам. При росте клеток общее количество диктиосом увеличивается.

В секретирующих клетках обычно АГ поляризован: его проксимальная часть обращена к цитоплазме и ядру, а дистальная — к поверхности клетки. В проксимальном участке к стопкам сближенных цистерн примыкает зона мелких гладких пузырьков и коротких мембранных цистерн. В образцах препаративно выделенных зон АГ при негативном контрастировании видно, что к проксимальной части диктиосомы примыкает сетевидная или губкообразная система мембранных полостей. Считается, что эта система (ЭПР — АГ) может представлять собой зону перехода элементов ЭПР в зону аппарата Гольджи.

В средней части диктиосомы периферия каждой цистерны также сопровождается массой мелких вакуолей около 50 нм в диаметре.

В дистальном или транс-участке диктиосом к последней мембранной плоской цистерне примыкает участок, состоящий из трубчатых элементов и массой мелких вакуолей, часто имеющих фибриллярную опушенность по поверхности со стороны цитоплазмы — это опушенные или окаймленные пузырьки такого же типа, как и окаймленные пузырьки при пиноцитозе. Это так называемая **транс-сеть аппарата Гольджи** (TGN), где происходит разделение и сортировка секретируемых продуктов. Еще дистальнее располагается группа более крупных вакуолей — это уже продукт слияния мелких вакуолей и образования секреторных вакуолей.

При изучении толстых срезов клеток в мегавольтный электронный микроскоп было найдено, что в клетках отдельные диктиосомы могут быть связаны друг с другом системой вакуолей и цистерн. Так что образуется рыхлая трехмерная сеть, выявляемая в световом микроскопе. В случае диффузной формы АГ каждый отдельный его участок представлен диктиосомой. В клетках животных часто с зоной мембран аппарата Гольджи ассоциированы центриоли; между радиально отходящих от них пучков микротрубочек лежат группы стопок мембран и вакуолей, которые концентрически окружают клеточный центр. Эта связь, вероятно, отражает участие микротрубочек в движении вакуолей.

## 2. Секреторная функция аппарата Гольджи

Мембранные элементы АГ участвуют в сегрегации и накоплении продуктов, синтезированных в ЭР, участвуют в их химических перестройках, созревании: это, главным образом, перестройка олигосахаридных компонентов гликопротеинов в составе водорастворимых секретов или в составе мембран (рис. 15.6).

В цистернах АГ происходит синтез полисахаридов, их взаимосвязь с белками, приводящая к образованию мукопротеидов. Но главное, с помощью элементов аппарата Гольджи происходит процесс выведения готовых секретов за пределы клетки. Кроме того, АГ — источник клеточных лизосом.

Участие АГ в процессах выведения секреторных продуктов было очень хорошо изучено на примере экзокринных клеток поджелудочной железы. Для этих клеток характерно наличие большого числа секреторных гранул (зимогеновых гранул), которые представляют собой мембранные пузырьки, заполненные белковым содержимым. В составе белков зимогеновых гранул входят разнообразные ферменты: протеазы, липазы, карбогидразы, нуклеазы. При секреции содержимое этих зимогеновых гранул выбрасывается из клеток в просвет железы, а затем перетекает в полость кишечника. Так как основным продуктом, выводимым клетками поджелудочной железы, является белок, то исследовали последовательность

включения радиоактивных аминокислот в различные участки клетки (рис. 15.7). Для этого животным вводили меченую тритием аминокислоту ( $^3\text{H}$ -лейцин) и с помощью электронно-микроскопической радиоавтографии следили во времени за локализацией метки. Оказалось, что АГ является промежуточным звеном между собственно синтезом секретируемого белка и выведением его из клетки. Также подробно процессы синтеза и выведения белков были изучены на других клетках (молочная железа, бокаловидные клетки кишечника, щитовидная железа и др.), и были исследованы морфологические особенности этого процесса. Синтезированный на рибосомах экспортируемый белок отделяется и накапливается внутри цистерн ЭПР, по которым он транспортируется к зоне мембран АГ. Здесь от гладких участков ЭПР

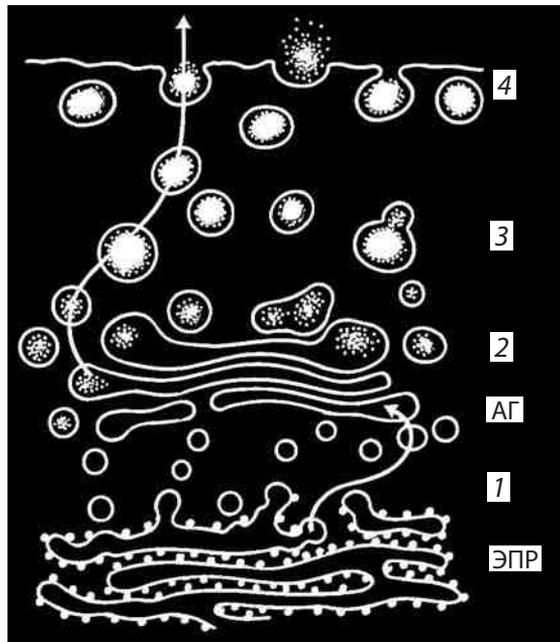


Рис. 15.6. Схема связи ЭПР, аппарата Гольджи с образованием и выделением зимогена из ацинарных клеток поджелудочной железы:

1 — переходная зона между ЭПР и АГ; 2 — зона созревания секреторных гранул; 3 — отделившиеся от АГ зимогеновые гранулы; 4 — их выход (экзоцитоз) за пределы клетки

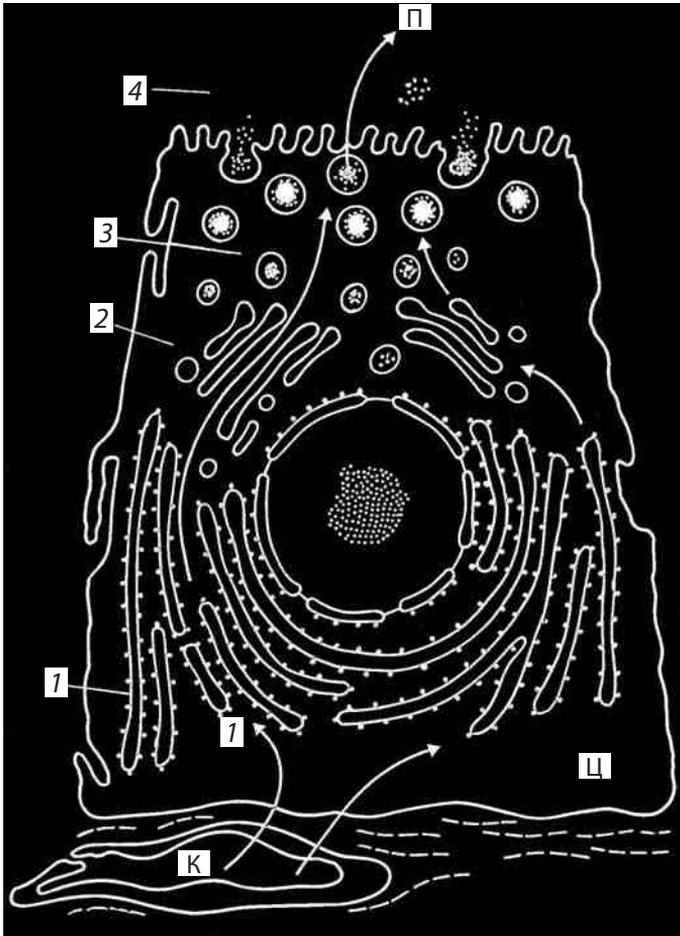


Рис. 15.7. Последовательность обнаружения (1–4) метки от  $^3\text{H}$ -лизина при синтезе и выведении белкового секрета из клетки поджелудочной железы; К — кровеносный апилляр, Ц — цитоплазма клетки; П — просвет железы. Стрелки показывают пути миграции метки

отщепляются мелкие вакуоли, содержащие синтезированный белок, которые поступают в зону вакуолей в проксимальной части диктиосомы (ЭПР-АГ комплекс). В этом месте вакуоли могут сливаться друг с другом и с плоскими цис-цистернами диктиосомы. Таким образом происходит перенесение белкового продукта уже внутри полостей цистерн АГ.

По мере модификации белков в цистернах аппарата Гольджи, они с помощью мелких вакуолей переносятся от цистерн к цистерне в дистальную часть диктиосомы, пока не достигают трубчатой мембранной сети в трансучастке диктиосомы. В этом участке происходит отщепление мелких пузырьков, содержащих уже зрелый продукт. Цитоплазматическая поверхность

таких пузырьков бывает сходна с поверхностью окаймленных пузырьков, которые наблюдаются при рецепторном пиноцитозе. Отделившиеся мелкие пузырьки сливаются друг с другом, образуя секреторные вакуоли. После этого секреторные вакуоли начинают двигаться к поверхности клетки, соприкасаются с плазматической мембраной, с которой сливаются их мембраны, и, таким образом, содержимое этих вакуолей оказывается за пределами клетки. Морфологически этот процесс экстрюзии (выбрасывания) напоминает пиноцитоз, только с обратной последовательностью стадий. Он носит название *экзоцитоз*.

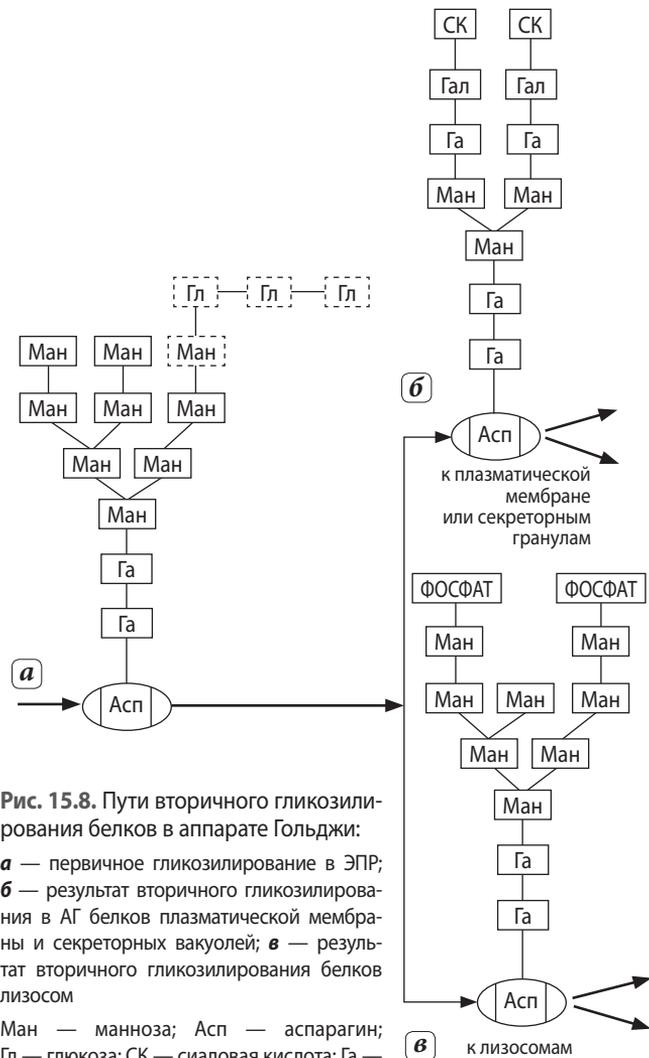
Такое описание событий является только общей схемой участия аппарата Гольджи в секреторных процессах. Дело усложняется тем, что одна и та же клетка может участвовать в синтезе многих выделяемых белков, может их друг от друга

изолировать и направлять к клеточной поверхности или же в состав лизосом. В аппарате Гольджи происходит не просто «перекачка» продуктов из одной полости в другую, но и постепенно идет их «созревание», модификация белков, которая заканчивается «сортировкой» продуктов, направляющихся или к лизосомам, или к плазматической мембране, или к секреторным вакуолям.

### 3. Модификация белков в аппарате Гольджи

В цис-зону аппарата Гольджи синтезированные в ЭПР белки попадают после первичного гликозилирования и редукции там же нескольких сахаридных остатков. В конечном итоге все белки там имеют одинаковые олигосахаридные цепи, состоящие из двух молекул N-ацетилглюкозамина, шести молекул маннозы (рис. 15.8). В цис-цистернах начинается **вторичная модификация** олигосахаридных цепей и их сортировка на два класса. В результате олигосахариды на гидролитических ферментах, предназначенных для лизосом (богатые маннозой олигосахариды), фосфорилируются, а олигосахариды других белков, направляемых в секреторные гранулы, или к плазматической мембране, подвергаются сложным превращениям, теряя ряд сахаров и присоединяя галактозу, N-ацетилглюкозамин и сиаловые кислоты.

При этом возникает специальный комплекс олигосахаридов. Такие превращения олигосахаридов осуществляются с помощью ферментов — гликозилтрансфераз, входящих в состав мембран цистерн аппарата



**Рис. 15.8.** Пути вторичного гликозилирования белков в аппарате Гольджи:

**а** — первичное гликозилирование в ЭПР; **б** — результат вторичного гликозилирования в АГ белков плазматической мембраны и секреторных вакуолей; **в** — результат вторичного гликозилирования белков лизосом

Ман — манноза; Асп — аспарагин; Гл — глюкоза; СК — сиаловая кислота; Га — N-ацетилглюкозамин; Гал — галактоза

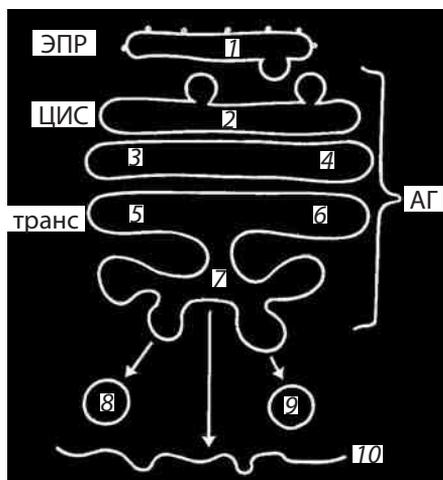


Рис. 15.9. Локализация ферментов модификации белков в аппарате Гольджи:

1 — синтез белка в ЭПР; 2 — фосфорилирование лизосомных олигосахаридов; 3 — отщепление маннозы; 4 — присоединение N-ацетилглюкозамина; 5 — присоединение маннозы; 6 — присоединение сиаловой кислоты; 7 — сортировка белков на рецепторах в транс-сети; 8 — лизосома; 9 — секреторная вакуоль; 10 — плазмалемма

Гольджи. Так как каждая зона в диктиосомах имеет свой набор ферментов гликозилирования, то гликопротеиды как бы по эстафете переносятся из одного мембранного отсека («этажа» в стопке цистерн диктиосомы) в другой и в каждом подвергаются специфическому воздействию ферментов. Так в цис-участке происходит фосфорилирование манноз в лизосомных ферментах и образуется особая маннозо-6-группировка, характерная для всех гидролитических ферментов, которые потом попадут в лизосомы.

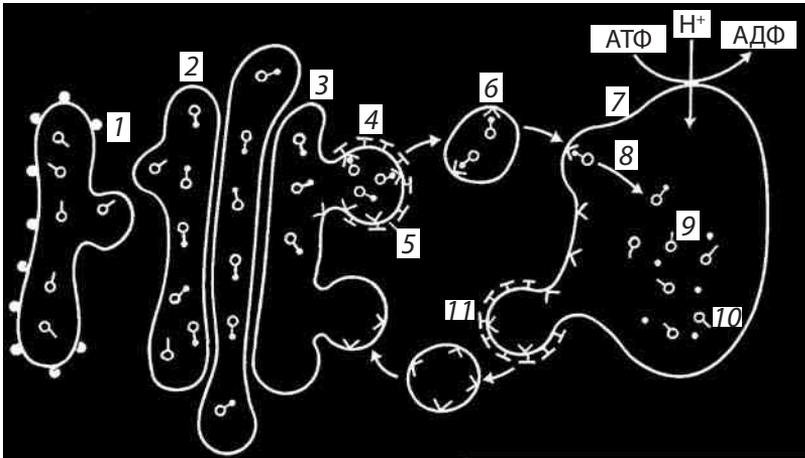
В средней части диктиосом протекает **вторичное гликозилирование** секреторных белков: дополнительное удаление маннозы и присоединение N-ацетилглюкозамина. В транс-участке к олигосахаридной цепи присоединяются галактоза и сиаловые кислоты (рис. 15.9).

В ряде специализированных клеток в аппарате Гольджи происходит синтез собственно полисахаридов, как, например, в фибробластах.

Так, в аппарате Гольджи происходит синтез длинных неразветвленных полисахаридных цепей глюкозаиногликанов. Один из них, гиалуриновая кислота, входящая в состав внеклеточного матрикса соединительной ткани, содержит несколько тысяч повторяющихся дисахаридных блоков. Многие глюкозаиногликаны ковалентно связаны с белками и образуют протеоглики (мукопротеины). Такие полисахаридные цепи модифицируются в аппарате Гольджи и связываются с белками, которые в виде протеогликанов секретируются клетками. В аппарате Гольджи происходит также сульфатирование глюкозаминогликанов и некоторых белков.

## 4. Сортировка белков в аппарате Гольджи

Итак, через аппарат Гольджи проходит по крайней мере три потока синтезированных клеткой нецитозольных белков: поток гидролитических ферментов в компартмент лизосом, поток выделяемых белков, которые накапливаются в секреторных вакуолях, и выделяются из клетки только по получении специальных сигналов, поток постоянно выделяемых секреторных белков. Следовательно, должен быть какой-то специальный механизм пространственного разделения этих разных белков и их путей следования.



**Рис. 15.10.** Сортировка кислых гидролаз в аппарате Гольджи:

1 — поступление гидролаз из ЭПР; 2 — фосфорилирование; 3 — перенос в транс-сеть АГ; 4 — связывание с рецептором; 5 — клатриновая оболочка; 6 — первичная лизосома; 7 — объединение со вторичной лизосомой; 8 — диссоциация от рецептора; 9 — дефосфорилирование; 10 — активированная гидролаза; 11 — возврат (рециклизация) рецепторов

В цис- и средних зонах диктиосом все эти белки идут вместе без разделения, они только раздельно модифицируются в зависимости от их олигосахаридных маркеров.

Собственно разделение белков, их сортировка, происходит в транс-участке аппарата Гольджи. Этот процесс не до конца расшифрован, но на примере сортировки лизосомных ферментов можно понять принцип отбора определенных белковых молекул (рис. 15.10).

Известно, что только белки-предшественники лизосомных гидролаз имеют специфическую олигосахаридную, а именно маннозную группу.

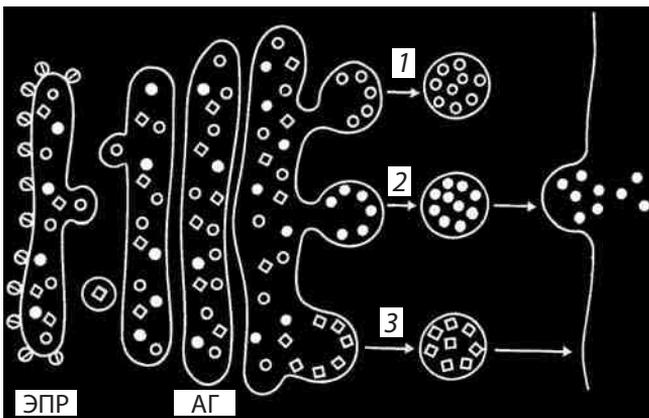
В цис-цистернах эти группировки фосфорилируются и дальше вместе с другими белками переносятся от цистерны к цистерне, через среднюю зону в транс-участок. Мембраны транс-сети аппарата Гольджи содержат трансмембранный белок — рецептор (манноза-6-фосфатный рецептор или М-6-Ф-рецептор), который узнает фосфорилированные маннозные группировки олигосахаридной цепи лизосомных ферментов и связывается с ними. Это связывание происходит при нейтральных значениях рН внутри цистерн транс-сети. На мембранах эти М-6-Ф-рецепторные белки образуют кластеры, группы, которые концентрируются в зонах образования мелких пузырьков, покрытых клатрином. В транс-сети аппарата Гольджи происходит их отделение, отпочковывание и дальнейший перенос к эндосомам. Следовательно, М-6-Ф-рецепторы, являясь трансмембранными белками, связываясь с лизосомными гидролазами, отделяют их, отсортировывают от других белков (например, секреторных, нелизосомных) и концентрируют их в окаймленных пузырьках. Оторвавшись от транс-сети, эти пузырьки быстро теряют шубу, сливаются с эндосомами, перенося свои лизосомные ферменты, связанные с мембранными рецепторами, в эти вакуоли. Как уже говорилось, внутри

эндосом из-за активности протонного переносчика происходит закисление среды. Начиная с рН 6, лизосомные ферменты диссоциируют от М-6-Ф-рецепторов, активируются и начинают работать в полости эндолизосомы. Участки же мембран вместе с М-6-Ф-рецепторами возвращаются путем рециклизации мембранных пузырьков обратно в транс-сеть аппарата Гольджи.

Вероятнее всего, что та часть нелизосомных белков, которая накапливается в секреторных вакуолях и выводится из клетки после поступления сигнала (например нервного или гормонального), проходит такую же процедуру отбора, сортировки на рецепторах транс-цистерн аппарата Гольджи. Эти секреторные белки попадают сначала в мелкие вакуоли, тоже одетые клатрином, которые затем сливаются друг с другом. В секреторных вакуолях часто происходит агрегация накопленных белков в виде плотных секреторных гранул. Это приводит к повышению концентрации белка в этих вакуолях примерно в 200 раз, по сравнению с его концентрацией в аппарате Гольджи. Затем эти белки по мере накопления в секреторных вакуолях выбрасываются из клетки путем экзоцитоза, после получения клеткой соответствующего сигнала.

От аппарата Гольджи исходит и третий поток вакуолей, связанный с постоянной, конститутивной секрецией. Так фибробласты выделяют большое количество гликопротеидов и муцинов, входящих в основное вещество соединительной ткани, в состав внеклеточного матрикса. Многие клетки постоянно выделяют белки, способствующие связыванию их с субстратами, постоянно идет поток мембранных пузырьков к поверхности клетки, несущие элементы гликокаликса и мембранных гликопротеидов. Этот поток выделяемых клеткой компонентов не подлежит сортировке в рецепторной транс-системе аппарата Гольджи. Первичные вакуоли этого потока также отщепляются от мембран и относятся по своей структуре к окаймленным вакуолям, содержащим клатрин (рис. 15.11).

Заканчивая рассмотрение строения и работы такой сложной мембранной органеллы, как аппарат Гольджи, необходимо подчеркнуть, что несмотря на кажущуюся морфологическую однородность его компонентов, вакуоли и цистерны, на самом деле это не просто скопище пузырьков, а стройная, динамичная, сложно организованная, поляризованная система.



**Рис. 15.11.** Три потока транспорта белков через аппарат Гольджи:

1 — лизосомный поток; 2 — поток постоянной секреции; 3 — поток регулируемой секреции

В АГ происходит не только транспорт везикул от ЕР к плазматической мембране. Существует ретроградный перенос везикул. Так, от вторичных лизосом отщепляются вакуоли и возвращаются вместе с рецепторными белками в транс-АГ зону. Кроме того, существует поток вакуолей от транс-зоны к цис-зоне АГ, а так же от цис-зоны к эндоплазматическому ретикулуму. В этих случаях вакуоли одеты белками СОР I-комплекса. Считается, что таким путем возвращаются различные ферменты вторичного гликозилирования и рецепторные белки в составе мембран.

Эти особенности поведения транспортных везикул дали основу гипотезе о существовании двух типов транспорта компонентов АГ (рис. 15.12).

По одному из них, наиболее старому, в АГ существуют стабильные мембранные компоненты, к которым от ЭПР эстафетно переносятся вещества с помощью транспортных вакуолей. По альтернативной модели АГ является динамическим производным ЭПР: отщепившиеся от ЭПР мембранные вакуоли сливаются друг с другом в новую цистерну, которая затем продвигается через всю зону АГ и в конце распадается на транспортные везикулы. По этой модели ретроградные СОР I везикулы возвращают постоянные белки АГ в более молодые цистерны. Таким образом, предполагается, что переходная зона ЭПР представляет собой «родильный дом» для аппарата Гольджи.

Основные патологические изменения АГ связаны с мутационными нарушениями или в содержании ферментов в его цистернах, или в наличии рецепторных белков для секретируемых компонентов. Такие биохимические нарушения не выявляются на морфологическом уровне и связываются с патологическими изменениями лизосом (см. лизосомные болезни). Однако целостность комплекса мембранных цистерн АГ, а также порядок миграции вакуолей в цис- и транс-направлениях напрямую зависят от системы микротрубочек и активности клеточного центра. При его подавлении и разборке микротрубочек движение вакуолей АГ прекращается и далее он распадается на отдельные вакуоли и короткие цистерны. Это показывает на особую зависимость АГ как транспортного элемента в клетке от целостности клеточного центра и локомоторной роли микротрубочек.

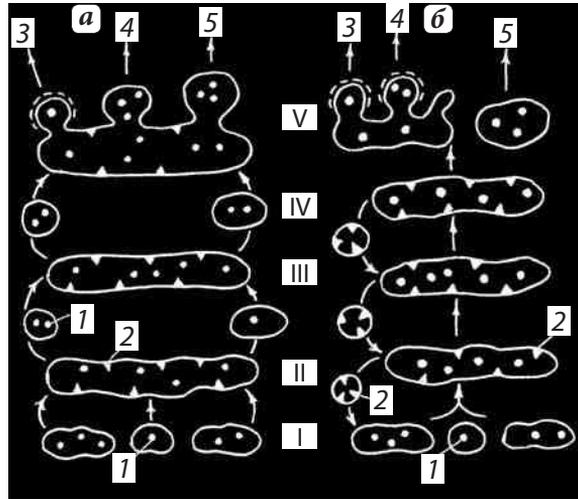


Рис. 15.12. Модели транспорта продуктов в АГ:

**а** — модель стабильных компарментов; **б** — модель созревания цистерн АГ; 1 — секретируемые белки; 2 — постоянные ферменты АГ; 3 — перенос к эндосомам; 4, 5 — перенос к плазматической мембране; ERGIC — ЭПР-АГ- промежуточный комплекс. cis, med, trans — участки АГ, TGN — транс-АГ-сеть

# Глава 16

## Лизосомы

О лизосомах уже упоминалось в разделах, посвященных эндоцитозу и аппарату Гольджи. Наличие лизосом разного типа в клетках отражает процесс переноса гидролитических ферментов, необходимых для внутриклеточного расщепления экзогенных (энзоцитоз) или эндогенных (аутофагоцитоз) полимеров, процесс секреции, но как бы направленный «внутри» клетки.

Лизосомы не представляют собой в клетках самостоятельных структур, они образуются за счет активности эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи и в этом отношении напоминают секреторные вакуоли и что основная их роль заключается в участии в процессах внутриклеточного расщепления как экзогенных, так и эндогенных биологических макромолекул.

Сходство лизосомных вакуолей с секреторными находит свое отражение не только в общности их происхождения, но иногда и в общности конечного этапа их активности. В некоторых случаях лизосомы могут подходить к плазматической мембране и выбрасывать свое содержимое в наружную среду. Часть лизосом макрофагов таким же образом обеспечивает внеклеточный гидролиз при воспалительных и резорбционных процессах. При оплодотворении акросома спермия, вакуоль, аналогичная лизосоме и содержащая гидролитические ферменты гиалуронидазу и протеазы, сливается с плазматической мембраной спермия, изливается на поверхность яйцеклетки. Освободившиеся из вакуоли ферменты расщепляют полисахаридные и белковые оболочки ооцита, давая возможность слиться двум половым клеткам.

### 1. Общая характеристика лизосом

Лизосомы как мембранные внутриклеточные частицы были открыты биохимиками (Де Дюв, 1955). При изучении легкой подфракции макросом из гомогенатов печени крысы было найдено, что эта подфракция (в отличие от основной фракции макросом — митохондриальной фракции) обладает группой кислых гидролитических ферментов (гидролаз), расщепляющих белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды. Создалось впечатление, что эти ферменты содержатся в особом роде цитоплазматических частицах, лизосомах. Лизосомы окружены липопротеидной мембраной, которая препятствует доступу находящихся снаружи субстратов к ферментам, находящимся внутри лизосом.

Характерная черта лизосом в том, что они содержат около 40 гидролитических ферментов: протеиназы, нуклеазы, гликозидазы, фосфорилазы, фосфатазы,

сульфатазы, оптимум действия которых осуществляется при pH 5. В лизосомах кислое значение среды создается из-за наличия в их мембранах  $H^+$  помпы, зависимой от АТФ. Кроме того, в мембране лизосом встроены белки-переносчики для транспорта из лизосом в гиалоплазму продуктов гидролиза: мономеры расщепленных молекул — аминокислоты, сахара, нуклеотиды, липиды.

Под электронным микроскопом видно, что фракция лизосом состоит из очень пестрого класса пузырьков размером 0,2–0,4 мкм (для клеток печени), ограниченных одиночной мембраной (толщина ее около 7 нм), с очень разнородным содержанием внутри (рис. 16.1). Во фракции лизосом встречаются пузырьки с гомогенным, бесструктурным содержимым, встречаются пузырьки, заполненные плотным веществом, содержащим в свою очередь вакуоли, скопления мембран и плотных однородных частиц; часто можно видеть внутри лизосом не только участки мембран, но и фрагменты митохондрий и ЭПР. Иными словами, эта фракция по морфологии оказалась крайне неоднородной, несмотря на постоянство присутствия гидролаз.

Было обнаружено, что среди различных по морфологии лизосомных частиц можно выделить по крайней мере четыре типа: первичные лизосомы, вторичные лизосомы, аутофагосомы и остаточные тельца (рис. 16.2). Пестрота же морфологии лизосом вызвана тем, что эти частицы участвуют в процессах внутриклеточного переваривания, образуют сложные пищеварительные вакуоли как экзогенного (внеклеточного), так и эндогенного происхождения.

**Первичные лизосомы** представляют собой мелкие мембранные пузырьки размером около 100 нм, заполненные бесструктурным веществом, содержащим набор гидролаз и в том числе кислую фосфатазу — маркерный для лизосом фермент. Эти мелкие вакуоли, первичные лизосомы, практически очень трудно отличить от мелких вакуолей на периферии зоны аппарата Гольджи. Часть из них несет

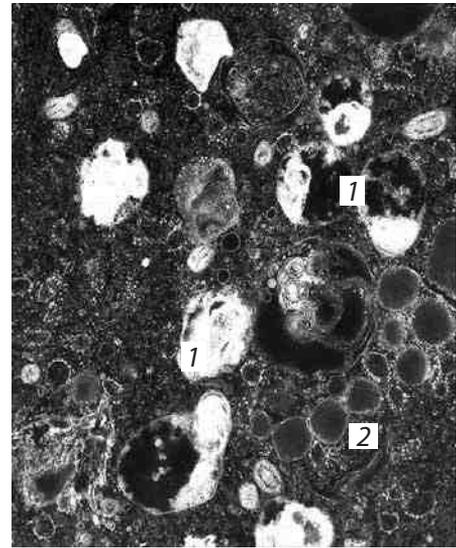


Рис. 16.1. Вторичные лизосомы в клетках культуры СПЭВ (э.м.):

1 — лизосомы; 2 — жировые капли

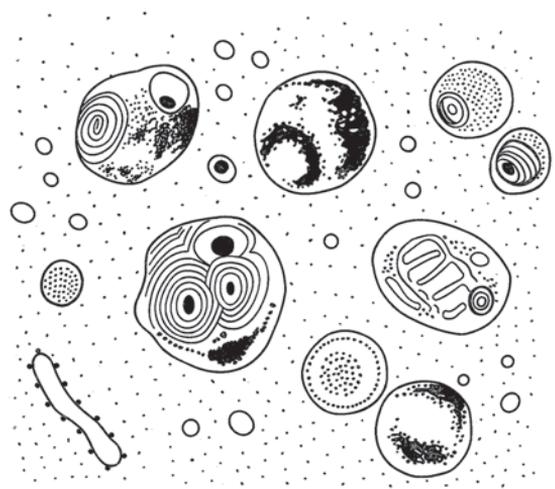


Рис. 16.2. Гетерогенность вторичных лизосом

клатриновую оболочку. Более того, вакуоли этой периферической части АГ также содержат кислую фосфатазу. Прослеживая процесс синтеза и локализацию этого фермента в клетках, было найдено, что местом его синтеза, как и следовало ожидать, является гранулярный ретикулум, затем этот фермент появляется в проксимальных участках диктиосом, а потом — в мелких вакуолях по периферии диктиосомы и, наконец, выявляется в первичных лизосомах. Весь путь образования первичных лизосом очень сходен с образованием зимогеновых гранул в клетках поджелудочной железы, за исключением последнего этапа — выбрасывания из клетки.

С помощью ряда точных экспериментов установили, что в дальнейшем первичные лизосомы сливаются с фагоцитарными или пиноцитозными вакуолями, эндосомами, образуя **вторичную лизосому** или внутриклеточную пищеварительную вакуоль. При этом содержимое первичной лизосомы сливается с полостью эндоцитозной вакуоли, и гидролазы первичной лизосомы получают доступ к субстратам, которые они и начинают расщеплять.

При слиянии первичной лизосомы с эндоцитозной вакуолью происходит диссоциация комплексов М-6-Ф-рецептор-гидролаза, из-за кислой среды внутри вторичной лизосомы. Затем уже свободный фермент после потери фосфатной группы активизируется и вступает в работу. Освободившиеся мембранные рецепторы переходят в мелкие пузырьки, отщепляющиеся от вторичной лизосомы, и уходят снова в транс-участок аппарата Гольджи, т.е. происходит их рециклизация (см. рис. 15.11).

Разнообразие по величине и по структуре клеточных лизосом связано в первую очередь с разнообразием вторичных лизосом — продуктов слияния эндоцитозных вакуолей с первичными лизосомами. Таким образом, вторичные лизосомы представляют собой не что иное, как внутриклеточные пищеварительные вакуоли, ферменты которых доставлены с помощью мелких первичных лизосом. Поэтому от типа поглощенных веществ или частичек зависит размер и внутренняя структура таких вторичных лизосом.

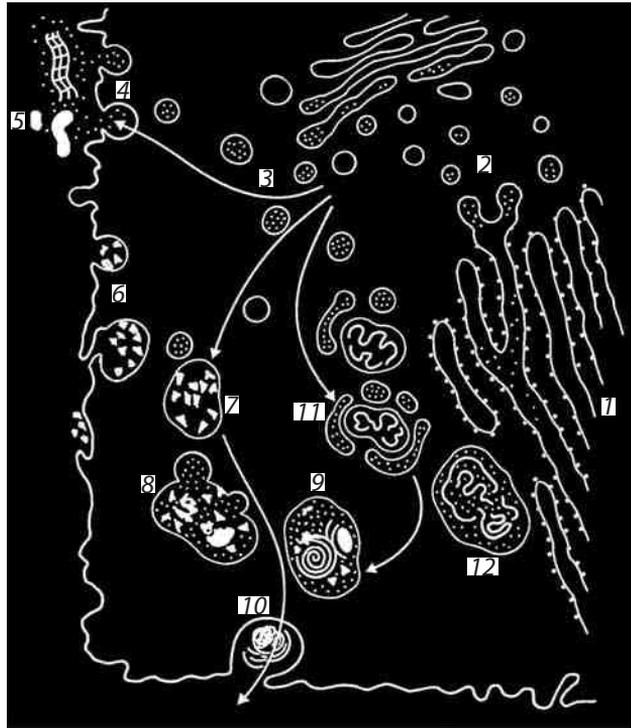
Лизосомы могут сливаться друг с другом и таким путем увеличиваться в объеме, при этом усложняется их внутренняя структура. Судьба поглощенных биогенных веществ, попавших в состав лизосомы, заключается в их расщеплении гидролазами до мономеров и в транспорте этих мономеров через мембрану лизосомы в состав гиалоплазмы, где они реутилизируются, включаются в различные синтетические и обменные процессы.

Кроме участия в переваривании поглощенных частиц и растворов лизосомы могут играть роль внутриклеточных структур, участвующих в изменении клеточных продуктов. Так, в клетках щитовидной железы в ЭПР синтезируется тироглобулин, белок-предшественник тироидного гормона. Тироглобулин с помощью АГ выводится из клеток в полость фолликулов щитовидной железы. При гормональной стимуляции иодированный тироглобулин снова попадает в железистую клетку путем пиноцитоза. Пиноцитозные вакуоли, содержащие тироглобулин, сливаются с первичными лизосомами, ферменты которых вызывают частичный гидролиз тироглобулина, приводящий к образованию тироксина — тироидного гормона, который затем выводится из клетки, секретируется и попадает в кровеносное русло.

Однако расщепление, переваривание биогенных макромолекул внутри лизосом может идти в ряде клеток не до конца. В этом случае в полостях лизосом происходит накопление непереваренных продуктов, происходит переход вторичных лизосом в **телолизосомы**, или **остаточные тельца**. Остаточные тельца уже содержат меньше гидролитических ферментов, в них происходит уплотнение содержимого, его перестройка. Часто в остаточных тельцах наблюдается вторичная структуризация непереваренных липидов, которые образуют сложные слоистые структуры. Там же происходит отложение пигментных веществ. У человека при старении организма в клетках мозга, печени и в мышечных волокнах в телолизосомах происходит отложение «пигменте старения» — липофусцина.

**Аутолизосомы (аутофагосомы)** постоянно встречаются в клетках простейших, растений и животных. По своей морфологии их относят к вторичным лизосомам, но с тем отличием, что в составе этих вакуолей встречаются фрагменты или даже целые цитоплазматические структуры, такие, как митохондрии, пластиды, элементы ЭПР, рибосомы, гранулы гликогена и т.д. Процесс образования аутофагосом еще недостаточно ясен. По одним представлениям, первичные лизосомы могут выстраиваться вокруг клеточной органеллы, сливаться друг с другом и таким образом отделять ее от соседних участков цитоплазмы: участок оказывается отделенным мембраной и заключенным внутри такой сложной лизосомы (рис. 16.3).

Есть предположение, что процесс аутофагоцитоза связан с отбором и уничтожением измененных, «сломанных» клеточных компонентов. В этом случае лизосомы выполняют роль внутриклеточных чистильщиков, контролирующих дефектные структуры. Такой аутофагии подвергаются митохондрии печени, где время жизни отдельной митохондрии составляет 10 дней. Интересно, что в нормальных условиях число аутофагосом увеличивается при метаболических стрессах (например,



**Рис. 16.3.** Образование лизосом и их участие в клеточных процессах:

1 — синтез гидролитических ферментов в ЭПР; 2 — переход их в АГ; 3 — образование первичных лизосом; 4 — выброс и использование (5) гидролаз при внеклеточном расщеплении; 6 — эндоцитозные вакуоли; 7 — слияние с ними первичных лизосом; 8 — образование вторичных лизосом; 9 — телолизосомы; 10 — экскреция остаточных телец; 11 — первичные лизосомы принимают участие в образовании аутофагосомы (12)

при гормональной индукции активности клеток печени). Значительно возрастает число аутофагосом при различных повреждениях клеток; в этом случае аутофагоцитозу могут подвергаться целые зоны внутри клеток.

## 2. Лизосомные патологии

Увеличение числа лизосом в клетках при патологических процессах — обычное явление. Это наблюдение послужило появлению представления о том, что лизосомы могут играть активную роль при гибели клеток. Однако в большинстве случаев смерти клетки не предшествовало освобождение гидролаз из лизосом. Более того, даже при разрыве мембраны лизосомные гидролазы должны терять свою активность, попадая в цитоплазму с нейтральным значением pH. Ферменты лизосом несомненно участвуют в автолизе погибших клеток, но скорее всего это вторичное явление, а не причина гибели самих клеток.

Существует ряд врожденных заболеваний, которые называют лизосомными «болезнями накопления». Многие «болезни накопления» возникают вследствие первичной генной мутации, приводящей к потере активности отдельных ферментов, участвующих в функционировании лизосом. Сейчас, к сожалению, известно уже более 25 таких генетических заболеваний, связанных с патологией лизосом.

Отличительным признаком этих болезней является то, что под световым микроскопом в клетках наблюдается множество вакуолей, наполненных непереверенными субстратами. Например, при болезни Помпе происходит накопление гликогена в лизосомах, где он не расщепляется из-за отсутствия у таких больных фермента кислой  $\alpha$ -гликозидазы.

Другие формы лизосомных болезней накопления связаны с отсутствием или неактивностью других лизосомных ферментов, таких как  $\alpha$ -фукозидаза,  $\alpha$ -галактозидаза (болезнь Фабри), сфингомиелинидазы (болезнь Нимана–Пика), церамидазы (болезнь Фарбера) и многих других. При болезни Тей–Сакса лизосомы пепеполняются ганглиозидом GM2 вследствие отсутствия фермента гексаминидазы, расщепляющего GM2. Из-за отсутствия этого фермента в лизосомах этот ганглиозид накапливается в нервных клетках, что приводит к гибели пациентов в детском возрасте.

К лизосомным болезням относится т.н. i-клеточная болезнь. У таких больных в лизосомах фибробластов отсутствуют почти все гидролитические ферменты, а соответствующие нерасщепленные субстраты накапливаются в клетках в виде крупных включений. Оказалось, что, несмотря на отсутствие гидролаз в лизосомах, они все же синтезируются, но секретируются прямо в кровь. Эта аномалия связана с тем, что гидролазы не содержат M6Ф-маркера из-за отсутствия GlcNAc-фосфотрансферазы в cis-отделе АГ. Поэтому в транс-сети АГ эти гидролазы не сорбируются на соответствующих рецепторах и доставляются не к лизосомам, а секретируются, выводятся из клетки.

# Глава 17

## Другие мембранные компоненты вакуолярной системы

### 1. Гладкий (агранулярный) эндоплазматический ретикулум

Гладкий ЭПР представляет собой часть мембранной вакуолярной системы. В морфологическом отношении он также представлен мембранами, образующими мелкие вакуоли и трубки, каналы, которые могут ветвиться, сливаться друг с другом. В отличие от гранулярного на мембранах гладкого ЭПР нет рибосом (рис. 17.1). Диаметр вакуолей и канальцев гладкого ЭПР обычно около 50–100 нм. Выраженность сети из этих мембранных элементов может быть неодинаковой как для различных клеток, так и внутри одной клетки. Большей частью такие гладкие каналы образуют скопления, или зоны. Так, например, в клетках эпителия кишечника гладкий ЭПР локализуется главным образом в апикальной, верхней части клетки, вблизи всасывающей поверхности. В клетках печени зоны гладкого ЭПР часто связаны с местами отложения гликогена. Встречаются клетки, где гладкий ЭПР занимает большую часть объема цитоплазмы (например, в интерстициальных клетках семенника) (рис. 17.2).

Неоднократно была установлена непрерывность перехода между гладкой формой ЭПР и гранулярной его формой. Часто можно наблюдать, как цистерна гранулярного ЭПР теряет на своей поверхности рибосомы и становится «гладкой» (рис. 17.3). При этом такой участок цистерны делается неровным, начинает как бы ветвиться, переходя в трубочки и каналы гладкого ЭПР. Этот участок часто называют переходным из-за того, что именно здесь образуются и отделяются транспортные пузырьки, переносящие новосинтезированные белки и липиды к зоне аппарата Гольджи. Гладкий ЭПР вторичен по отношению к гранулярному ЭПР, происходит из последнего.

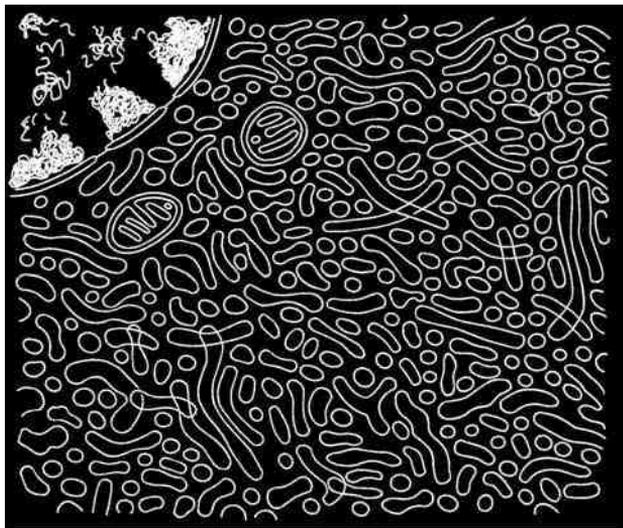
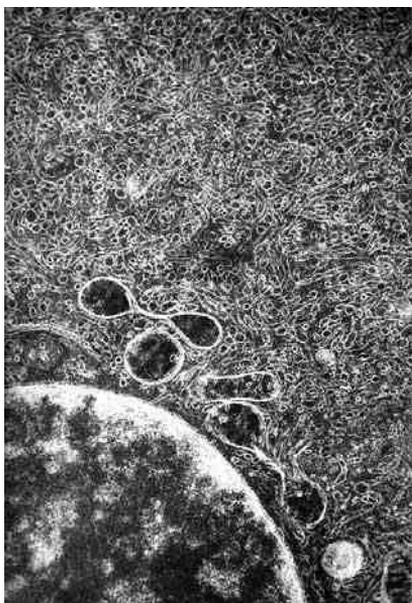


Рис. 17.1. Зона гладкого ретикулума в интерстициальных клетках семенника



**Рис. 17.2.** Электронно микроскопический снимок гладкого ЭПР в клетках Лейдига семенника



**Рис. 17.3.** Переход гранулярного ЭПР в гладкий в печеночной клетке

Несмотря на топографическую связь и общность происхождения, эти два представителя ЭПР резко отличаются друг от друга в функциональном отношении. Как уже указывалось, отсутствие рибосом на гладком ЭПР прямо говорит о его непричастности к синтезу белков. Деятельность гладкого ЭПР скорее можно связать с метаболизмом липидов и некоторых внутриклеточных полисахаридов.

Участие гладкого ЭПР в синтезе триглицеридов и липидов было показано при изучении процессов всасывания жиров клетками кишечного эпителия.

В просвете кишечника жиры распадаются до жирных кислот и моноглицеридов. В апикальных участках клеток кишечника видно при этом накопление осмиофильных гранул внутри просветов канальцев гладкого ЭПР. Это связано с синтезом новых триглицеридов из поступивших в клетку предшественников, с образованием липидов и липопротеидов, которые с помощью вакуолей аппарата Гольджи выводятся из клеток и попадают в лимфатическое русло.

Гладкий ЭПР особенно в большом объеме встречается в клетках, секретирующих стероиды, в таких, как клетки коркового вещества надпочечника. Основные ферменты синтеза стероидов были обнаружены во фракциях микросом, образовавшихся при разрушении гладкого ЭПР из этих клеток. Гладким ретикулумом богаты интерстициальные клетки семенников, участвующие в синтезе стероидных гормонов, а также клетки сальных желез в самом начале накопления жира.

Тесная топографическая связь гладкого ЭПР с отложениями гликогена (запасного внутриклеточного полисахарида животных и грибов) в гиалоплазме различных клеток показывает на значение этой связи с метаболизмом углеводов. В клетках печени, в мышечных волокнах гликоген откладывается в зонах, свободных

от гранулярных цистерн ЭПР, но богатых пузырьками и канальцами гладкого ЭПР. Такие зоны гладкого ЭПР могут увеличиваться в размере как при исчезновении гликогена (например, при голодании), так и при увеличении его отложений (рис. 17.4, 17.5).

В поперечнополосатых мышцах вакуоли и каналы гладкого ЭПР (саркоплазматический ретикулум) окружают каждую миофибриллу (рис. 17.6). Здесь ЭПР выполняет специальную функцию депонирования ионов кальция. В присутствии АТФ он может активно поглощать и накапливать ионы кальция, что приводит к расслаблению мышечного волокна. Белки кальциевого насоса являются интегральными белками саркоплазматического ретикулума.

В печени часто увеличение зон гладкого ЭПР связано с рядом патологических процессов в клетках. Так, при барбитуратных отравлениях, при действии различных канцерогенов или ядовитых веществ, при действии больших доз гормональных препаратов клетки печени теряют свою характерную для них базофилию цитоплазмы, в них падает содержание РНК и появляются в цитоплазме оксифильные зоны. В электронном микроскопе эти зоны представлены скоплениями гладкого ЭПР, это явление связано с тем, что в этих местах происходят процессы деградации различных вредных веществ, процессы метаболической дезактивации, которые осуществляются целым рядом окислительных ферментов, из которых наиболее известен белок, называемый цитохром Р450. Этот белок участвует в присоединении гидроксильной группы к различным, потенциально опасным водонерастворимым углеводородам или к липофильным ядовитым веществам (например, четыреххлористый углерод), попадающим в мембранный

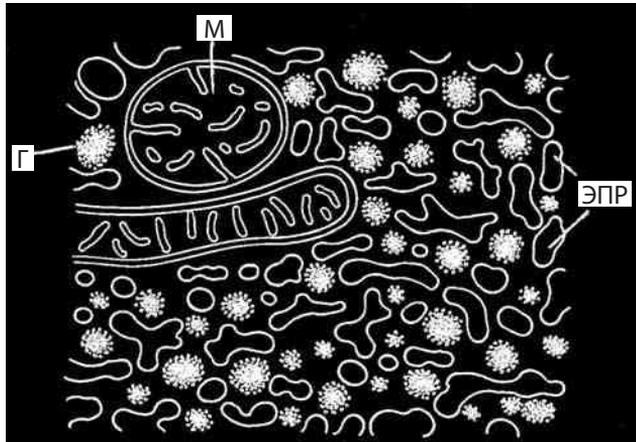


Рис. 17.4. Отложение гликогена в зоне гладкого ЭПР гепатоцита

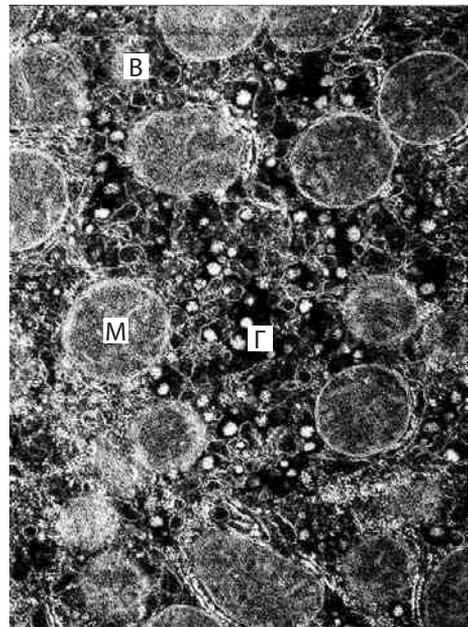
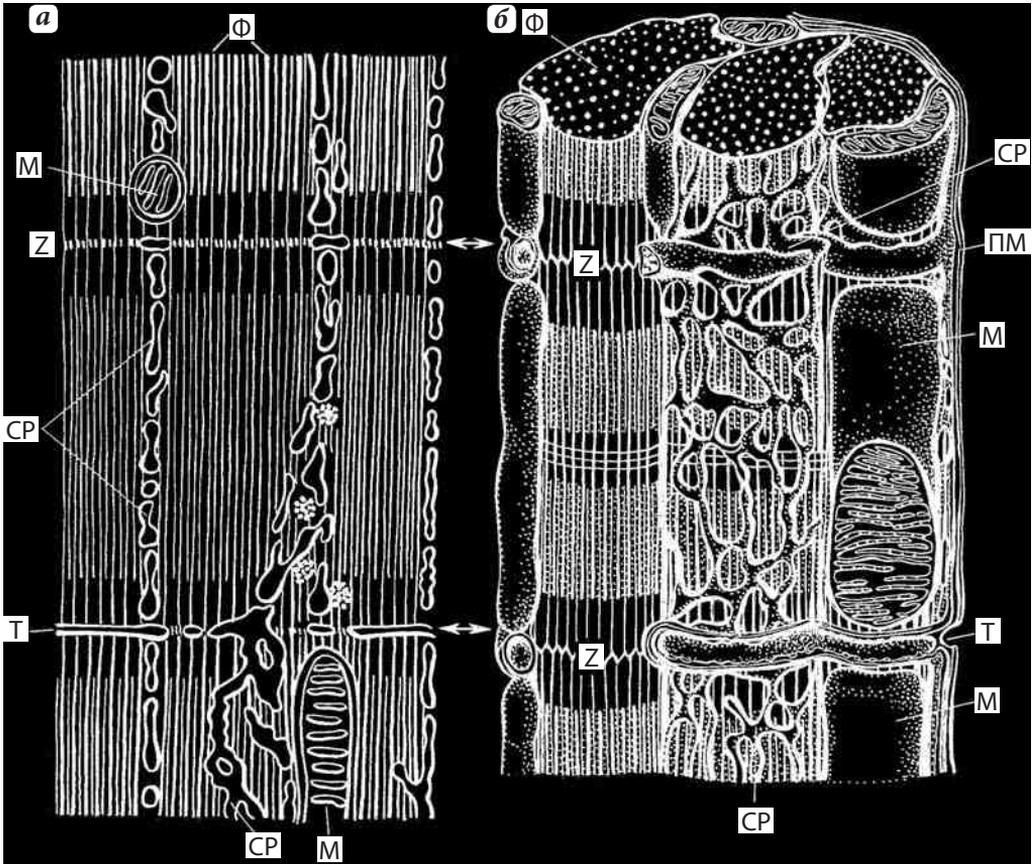


Рис. 17.5. Зона мелких вакуолей гладкого эндоплазматического ретикулума и гранулы гликогена в клетке печени мыши:

В — вакуоли; Г — гликоген; М — митохондрии



**Рис. 17.6.** Гладкий ЭПР (саркоплазматический) в скелетных мышцах:

**а** — на срезе; **б** — модель; Ф — фибриллы; М — митохондрии; ПМ — плазматическая мембрана; Т — трабекулярные мембраны; СР — саркоплазматический ретикулум

бислой. Здесь же другие ферменты добавляют к этим гидроксильным группам отрицательно заряженные молекулы (сульфат, глюкуроновая кислота), что делает метаболиты или вредные липофильные вещества растворимыми в воде, из-за чего они могут выводиться из организма вместе с мочой. Разросшийся гладкий ЭПР в клетках печени после удаления токсического вещества уничтожается, вероятно, с помощью лизосом — автофагосом.

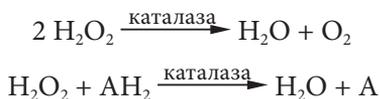
## 2. Пероксисомы (микротельца)

Это небольшие вакуоли (0,3–1,5 мкм), одетые одинарной мембраной, отграничивающей гранулярный матрикс, в центре которого располагается сердцевина, или нуклеоид (ничего не имеющий общего с нуклеоидом бактерий и вообще к ядерным структурам не относящийся) (рис. 17.7).

В зоне сердцевины часто, особенно в пероксисомах печеночных клеток, видны кристаллоподобные структуры, состоящие из регулярно упакованных фибрилл или трубочек. Изолированные сердцевины пероксисом содержат фермент уратоксидазу.

Пероксисомы обнаружены у простейших (амебы, тетрахимена), у низших грибов (дрожжи), у высших растений. У высших позвоночных животных они обнаруживаются главным образом в печени и почках. В печени крыс на клетку число пероксисом колеблется от 70 до нескольких сотен. Пероксисомы часто локализируются вблизи мембран ЭПР.

Пероксисомы не имеют своего генома, в них нет рибосом, все белки пероксисом — **пероксины** (более 50) синтезируются за счет ядерного генома на свободных полирибосомах в цитозоле и импортируются в пероксисомы в виде готовых белковых цепей. Пероксисомы первоначально были определены как органеллы, которые защищают клетки от окислительных реакций, приводящих к образованию перекиси водорода, очень вредной для клеток. За счет фермента **каталазы**  $\text{H}_2\text{O}_2$  разрушается до воды или окисляет другие органические компоненты:



В пероксисомах происходит разрушение, возникающей при окислении урановых кислот, аминокислот, пуринов, метанола, жирных кислот и др. В дополнение к окислительным реакциям пероксисомы вовлекаются в синтез липидов, холестерина, желчных кислот, некоторых фосфолипидов (плазмалогены). Относительно генезиса пероксисом существуют две точки зрения. По одной из них пероксисомы относятся к самореплицирующимся органеллам, несмотря на отсутствие в них ДНК и белок-синтезирующей системы. По этой гипотезе существуют мембранные пре-пероксисомы, имеющие на своих мембранах рецепторные белки, связывающиеся с пероксидами, синтезируемыми на рибосомах в цитозоле. Часть пероксинов встраивается в состав мембраны так же, как и переносимые липиды, что приводит к увеличению первичной вакуоли пероксисомы. Одновременно белки-пероксины матрикса пероксисомы, имеющие сигнальные последовательности на N- и C-концах белковых молекул, проникают внутрь пероксисомы. При этом объем органеллы растет. Затем происходит деление, перешнуровка пероксисомы и образуются две новые дочерние органеллы (рис. 17.8).

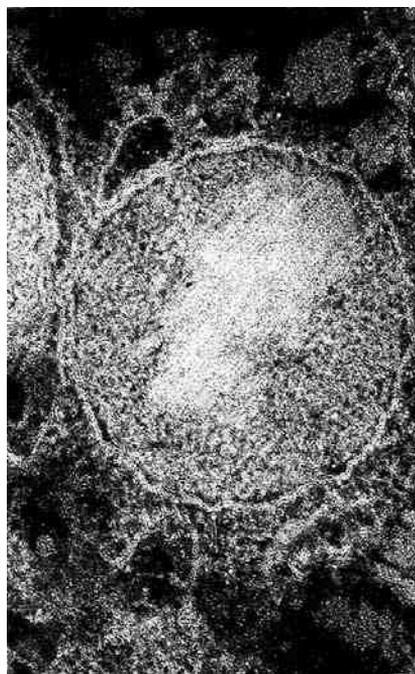
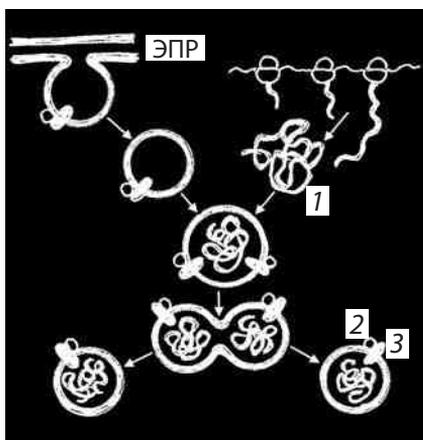


Рис. 17.7. Пероксисома в клетке печени (э.м. фото Бакеевой Л.Е.)



**Рис. 17.8.** Генезис пероксисом: 1–3 — различные белки-пероксины

сом, или к блокаде их импорта внутрь органеллы. Существует наследственная болезнь — синдром Целлевегера, при которой дефект импорта пероксинов приводит к инактивации пероксисом. У больных с «пустыми» пероксисомами возникает ряд нарушений в клетках головного мозга, печени, почках, что приводит к смерти вскоре после рождения.

По другим представлениям, первичным источником мембран пероксисом является гранулярный эндоплазматический ретикулум. В отдельных участках его мембран локализуются пероксисомные белки Pex 3 и Pex 19, которые необходимы для отщепления первичной везикулы пероксисомы. Комплекс Pex3/Pex 19 действует как рецептор для импорта других пероксинов. Затем импорт этих белков вместе с продолжающимися включениями липидов ведет к росту пероксисомы и ее делению (редупликации) (см. рис. 17.8).

Нарушения в импорте пероксинов мутационного характера приводит или к отсутствию ряда ферментов в матриксе пероксисом, или к блокаде их импорта внутрь органеллы.

# Часть IV

## СИСТЕМА ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ КЛЕТОК

Для осуществления любых клеточных функций необходимы затраты энергии. Живые организмы получают ее, используя внешние источники, например энергию Солнца, или же энергию переноса электронов при окислении различных субстратов. В обоих случаях клетки синтезируют молекулы АТФ (аденозинтрифосфат), некая разменная «топливная» единица, обладающая высокоэнергетическими фосфатными связями, при разрушении которых выделяемая энергия может тратиться на любые клеточные функции: на активный транспорт веществ, на синтетические процессы, на механическую работу и т.д. (рис. 18.1). В клетках животных синтез АТФ осуществляется специальными органеллами — митохондриями. Митохондрии — двумембранные органоиды эукариотических клеток.

Митохондрии отделены от цитоплазмы (гиалоплазмы) двумя мембранами — внешней и внутренней. Поэтому у митохондрий различают две полости или пространства: одну между внешней и внутренней мембранами (межмембранные) и другую, основную (матрикс), ограниченную внутренней мембраной. Другой общей чертой в их строении является то, что внутренняя мембрана образует складки, мешки, гребни, глубокие впячивания, направленные внутрь матрикса. На таких мембранных гребнях и впячиваниях локализуются активные метаболические центры этих органелл — полиферментные комплексы, определяющие выполнение основных физиологических функций (окислительное фосфорилирование). В матриксе располагаются элементы авторепродукции митохондрий и локализованы ферменты некоторых метаболических процессов. Система авторепродукции

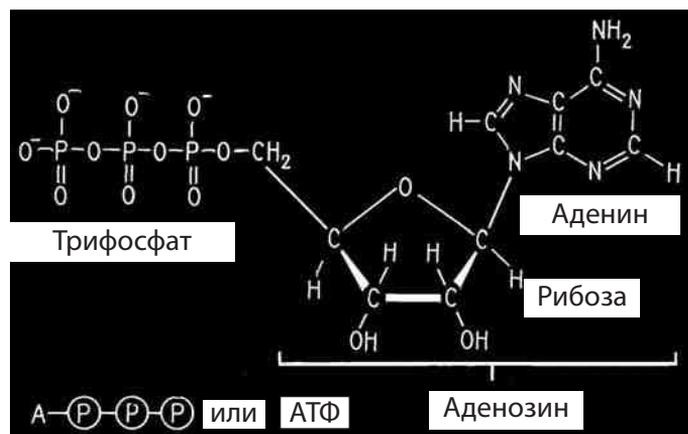


Рис. 18.1. Аденозинтрифосфат

представлена ДНК, РНК и рибосомами, которые могут определять часть генетических, автономных свойств этих структур.

Главными функциональными нагрузками митохондрий являются процессы энергетического характера, приводящие к синтезу специфических молекул аденозинтрифосфата (АТФ), являющихся донорами энергии для любых клеточных процессов.

В митохондриях АТФ синтезируется одним и тем же способом: с помощью энергии, отдаваемой электронами при продвижении их по электроннотранспортной цепи белков внутренней мембраны, происходит перенос, «перекачка» протонов с внутренней стороны мембраны на внешнюю. Вследствие этого возникает электрохимический протонный градиент, энергия которого с помощью других белков используется для синтеза АТФ.

# Глава 18

## Митохондрии — строение и функции

Митохондрии как органеллы синтеза АТФ характерны, за малым исключением, для всех эукариотических клеток как аутотрофных (фотосинтезирующие растения), так и гетеротрофных (животные, грибы) организмов. Их основная функция связана с окислением органических соединений и использовании освобождающейся при распаде этих соединений энергии в синтезе молекул АТФ. Поэтому митохондрии часто называют энергетическими станциями клетки.

### 1. Общая морфология

Митохондрии или хондриосомы (Мевес, 1910) (от греч. *mitos* — нить, *chondrion* — зернышко, *soma* — тельце) представляют собой гранулярные или нитевидные органеллы, присутствующие в цитоплазме простейших, растений и животных (рис. 18.2). Митохондрии можно наблюдать в живых клетках, так как они обладают достаточно высокой оптической плотностью. В живых клетках митохондрии могут двигаться, перемещаться, сливаться друг с другом. Особенно хорошо митохондрии выявляются на препаратах, окрашенных различными способами после осмиевой фиксации, которая хорошо стабилизирует липиды. Наиболее широко распространен метод окраски по Альтману, который описал эти клеточные органеллы в конце позапрошлого века, называя их «биобластами».

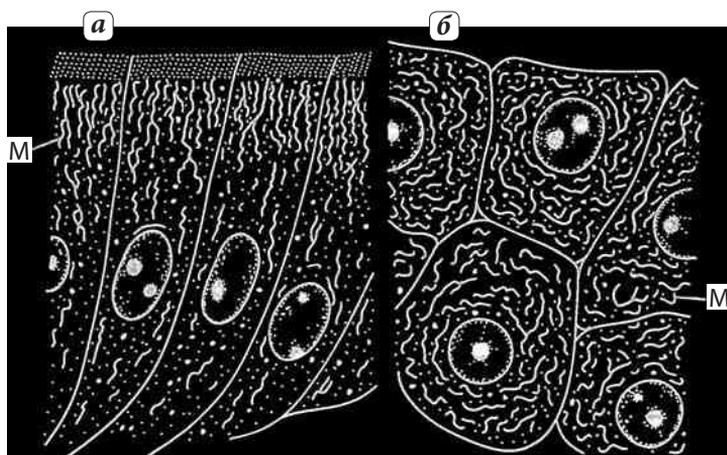


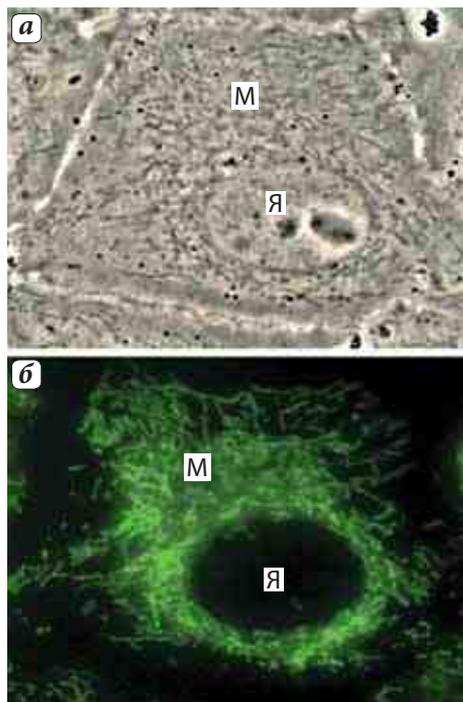
Рис. 18.2. Разнообразие митохондрий в клетках кишечника лягушки (а), гепатоцитах зародыша свиньи (б)

Размеры митохондрий очень непостоянны у разных видов, так же как изменчива их форма (см. рис. 18.2). Все же у большинства клеток толщина этих структур относительно постоянна (около 0,5 мкм), а длина колеблется, достигая у нитчатых форм до 7–60 мкм. Надо сказать, что изучение величины митохондрий — не простое дело. В световом микроскопе на окрашенных препаратах не всегда можно проследить за реальными размерами митохондрий. Изучая митохондрии в электронном микроскопе на ультратонких срезах, трудно решить вопрос об истинной длине митохондрий, так как на срез попадает только незначительный объем данной митохондрии. Более того, на срезе одна извитая митохондрия может быть представлена несколькими сечениями (3–5), и только пространственная трехмерная реконструкция, построенная на изучении серийных срезов, может решить вопрос, имеем ли мы дело с 3–6 отдельными митохондриями или же с одной изогнутой или разветвленной. Выделенные митохондрии обычно повреждаются и фрагментируются, что также ограничивает использование этого метода для решения вопроса о величине и числе митохондрий.

Длинные ветвящиеся митохондрии были описаны в клетках культуры ткани млекопитающих, в клетках многих растений как в нормальных, так и в анаэробных условиях. В последнее время стал широко применяться для изучения свойств митохондрий флуорохром родамин. Этот краситель обладает способностью люминисцировать в фиолетовом свете, если он связывается с мембранами активных митохондрий. При этом в люминисцентном микроскопе видна единая митохондриальная система — митохондриальный ретикулум (рис. 18.3).

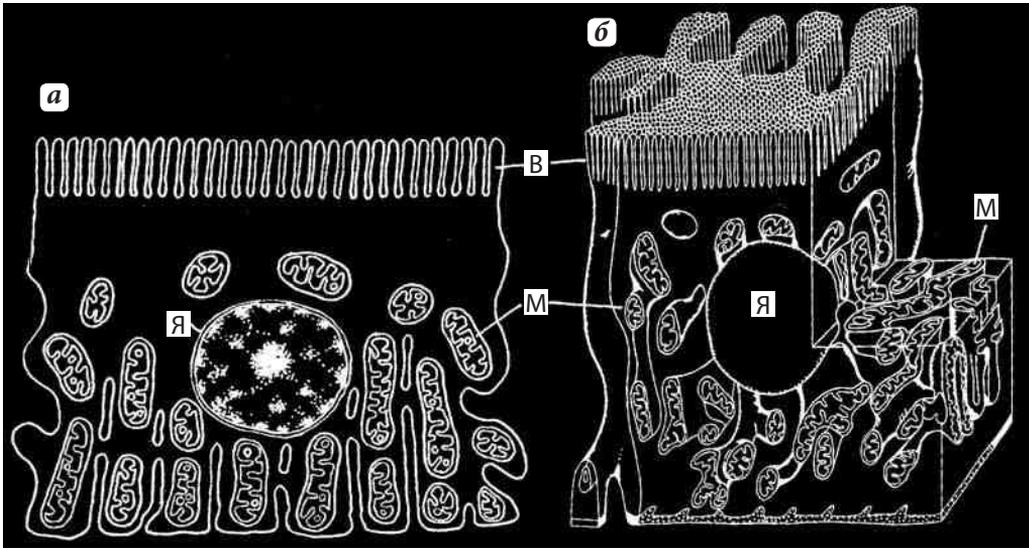
Обычные же подсчеты показывают, что на печеночную клетку приходится около 200 митохондрий. Это составляет более 20% от общего объема цитоплазмы и около 30–35% от общего количества белка в клетке. Площадь поверхности всех митохондрий печеночной клетки в 4–5 раз больше поверхности ее плазматической мембраны. Больше всего митохондрий в ооцитах (около 300 000).

Локализация митохондрии в клетках может быть различной. Часто их расположение обусловлено топографией цитоплазматических структур и включений. В клетках эпителия почечных канальцев митохондрии ориентированы вдоль



**Рис. 18.3.** Флуоресцирующие митохондрии в клетке культуры при окраске родамином:

Я — ядро; М — митохондрии; А — фазовый контраст; Б — прижизненная окраска тех же митохондрий родамином 123



**Рис. 18.4.** Митохондриальный ретикулум в базальной части клетки извитого канальца почки крысы: **а** — на срезе; **б** — трехмерная реконструкция

продольной оси клетки. Это связано с тем, что они располагаются между глубокими впячиваниями плазматической мембраны в базальной области клеток (рис. 18.4).

Обычно митохондрии скапливаются вблизи тех участков цитоплазмы, где возникает потребность в АТФ, образующейся в митохондриях. Так, в скелетных мышцах митохондрии находятся вблизи миофибрилл. В сперматозоидах митохондрии образуют спиральный футляр вокруг оси жгутика; это связано с необходимостью использования АТФ для движения хвоста сперматозоида. В других клетках, снабженных ресничками, митохондрии локализуются непосредственно под клеточной мембраной у основания ресничек, для работы которых необходим АТФ. В аксонах нервных клеток митохондрии располагаются около синапсов, где происходит процесс передачи нервного импульса. В секреторных клетках, которые синтезируют большие количества белков, митохондрии тесно связаны с зонами эргастоплазмы; вероятно, они поставляют АТФ для активации аминокислот и синтеза белка на рибосомах.

## 2. Ультраструктура митохондрий

Митохондрии независимо от их величины или формы имеют универсальное строение, их ультраструктура однообразна. Митохондрии ограничены двумя мембранами (рис. 18.5). Наружняя митохондриальная мембрана отделяет ее от гиалоплазмы. Обычно она имеет ровные контуры, не образует впячиваний или складок. На нее приходится около 7% от площади всех клеточных мембран. Ее толщина около 7 нм, она не бывает связана ни с какими другими мембранами цитоплазмы

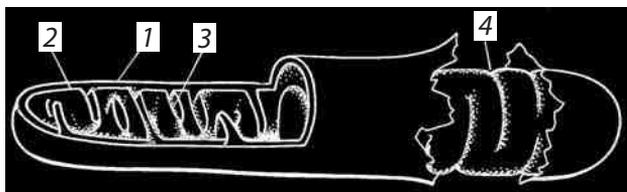


Рис. 18.5. Схема общей организации митохондрии:

1 — внешняя мембрана; 2 — внутренняя мембрана; 3 — впячивания внутренней мембраны — кристы; 4 — места впячиваний, вид с поверхности внутренней мембраны

и замкнута сама на себя, так что представляет собой мембранный мешок. Наружнюю мембрану от внутренней отделяет межмембранное пространство шириной около 10–20 нм. Внутренняя мембрана (толщиной около 7 нм) ограничивает собственно внутреннее содержимое митохондрии, ее *матрикс* или *митоплазму*. Характерная черта внутренней мембраны митохондрий — способность образовывать многочисленные впячивания внутрь митохондрий. Такие впячивания чаще всего имеют вид *плоских гребней*, или *крист* (рис. 18.6, 18.7).

Общая поверхность внутренней мембраны митохондрии в печеночной клетке составляет примерно треть поверхности всех клеточных мембран. Митохондрии клеток сердечной мышцы содержат втрое больше крист, чем печеночные митохондрии. Это может отражать различия в функциональных нагрузках митохондрий разных клеток. Расстояние между мембранами в кристе составляет около 10–20 нм.

Митохондриальные кристы, отходящие от внутренней мембраны и простирающиеся в сторону матрикса, обычно не полностью перегораживают полость митохондрии, не нарушают непрерывности заполняющего ее матрикса.

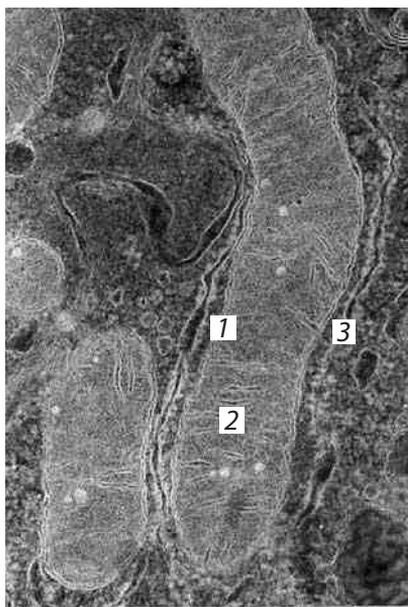


Рис. 18.6. Э.м. митохондрий на срезе клетки печени:

1 — внешняя и внутренняя мембраны; 2 — кристы; 3 — ЭПР

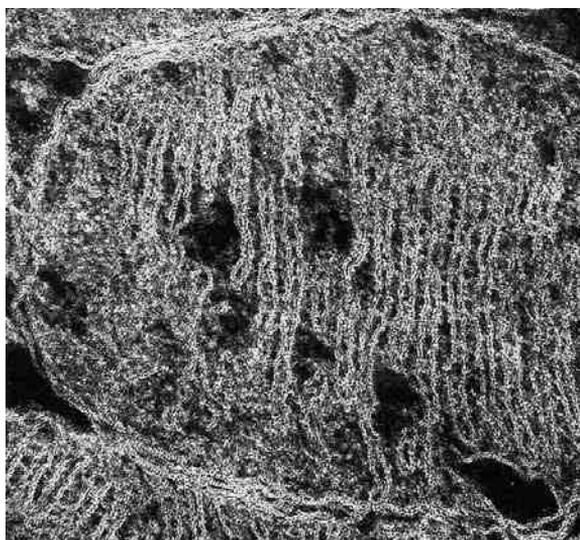


Рис. 18.7. Митохондрия в клетках печени, видна бислойность мембран (фото Бакеевой Л.Е.)

Ориентация крист по отношению к длинной оси митохондрии различна для разных клеток. Так, может быть перпендикулярная ориентация (клетки печени, почек) крист; в некоторых клетках (сердечная мышца) наблюдается продольное расположение крист. Часто кристы могут ветвиться или образовывать пальцевидные отростки, изгибаться и не иметь выраженной ориентации (рис. 18.8).

Матрикс митохондрий имеет тонкозернистое гомогенное строение, в нем иногда выявляются тонкие собранные в клубок нити (около 2–3 нм) и гранулы около 15–20 нм. Теперь стало известно, что нити матрикса митохондрий представляют собой молекулы ДНК в составе митохондриального нуклеоида, а мелкие гранулы — митохондриальные рибосомы. Кроме того, в матриксе встречаются крупные (20–40 нм) плотные гранулы, это — места отложения солей магния и кальция.

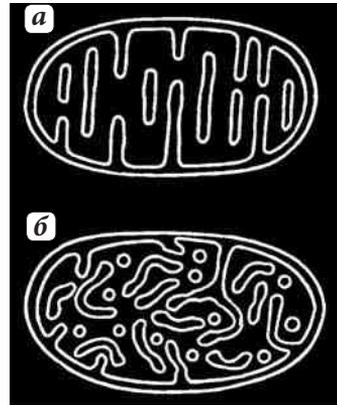


Рис. 18.8. Варианты строения крист митохондрий:

**а** — пластинчатые перегородки, собственно кристы (печень); **б** — трубчатые кристы

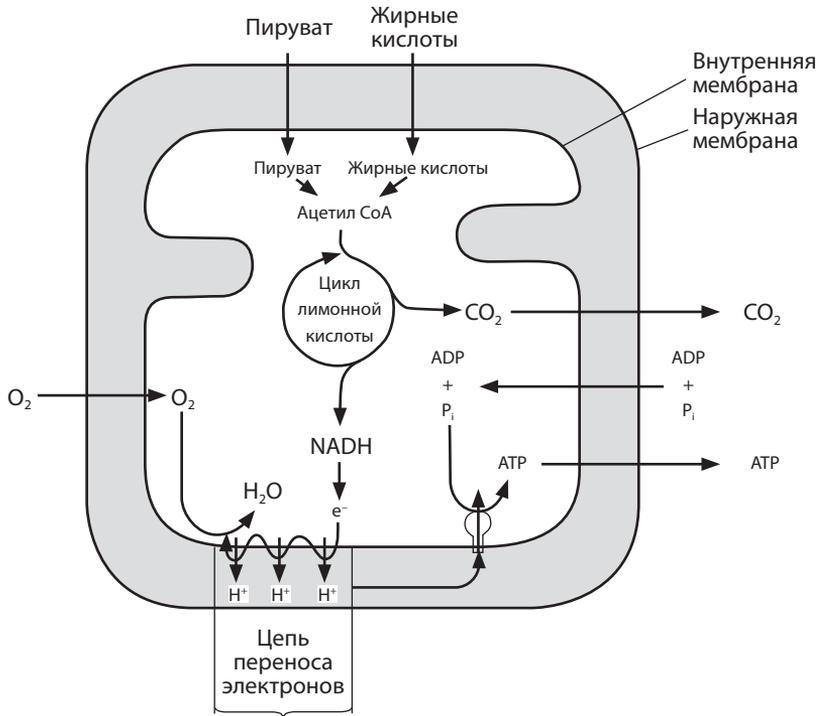
### 3. Функции митохондрий

Митохондрии осуществляют синтез АТФ, происходящий в результате процессов окисления органических субстратов и фосфорилирования АДФ. В клетках процессы окисления и выделения энергии, освобождающиеся в результате этого процесса, проходят в несколько взаимосвязанных этапов. При этом в качестве начальных субстратов используются различные углеводы, жирные кислоты, аминокислоты (рис. 18.9). Первые этапы окисления приводят кроме образования АТФ к появлению промежуточных продуктов, конечное окисление которых в митохондриях дает возможность клетке использовать этот процесс для синтеза основного количества АТФ.

Начальные этапы окисления углеводов происходят в гиалоплазме и не требуют участия кислорода. Поэтому они называются **анаэробным окислением**, или **гликолизом**. Главным субстратом окисления при анаэробном получении энергии служат гексозы и в первую очередь глюкоза. В глюкозе количество потенциальной энергии, заключенной в связях между атомами С, Н и О, составляет около 680 ккал на 1 моль (т.е. на 180 г глюкозы); эта энергия освобождается при полном окислении глюкозы согласно следующей реакции:



В живой клетке это огромное количество энергии не освобождается одновременно, как при горении в пламени. Освобождение энергии идет в виде ступенчатого процесса, управляемого целым рядом окислительных ферментов, и не



**Рис. 18.9.** Схема цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования (по Альбертс Б. и др., 1994)

связано с переходом энергии химической связи в тепло, как при горении, а с переходом ее в макроэнергетическую связь в молекуле АТФ, которая синтезируется при использовании освобождающейся энергии из АДФ и фосфата.

В процессе гликолиза происходит неполное окисление субстрата. В результате гликолиза глюкоза распадается до триоз, при этом тратятся 2 молекулы АТФ и синтезируются 4 молекулы АТФ. Так что в конечном результате клетка «зарабатывает» всего 2 молекулы АТФ. В энергетическом отношении этот процесс малоэффективен, поэтому из 680 ккал, заключающихся в связях 1 моля глюкозы, освобождается менее 10% энергии. Несмотря на низкий энергетический выход, анаэробное окисление, гликолиз, широко используется в живой природе. Он является основным поставляющим энергию процессом для многих микроорганизмов, некоторых кишечных паразитических анаэробных простейших, для клеток высших организмов на ранних стадиях эмбрионального развития, для многих опухолевых клеток, для клеток культуры ткани и др. Эритроциты млекопитающих, например, получают всю необходимую им энергию за счет гликолиза, так как у них нет митохондрий.

Образовавшиеся в результате гликолиза триозы, и в первую очередь пировиноградная кислота, вовлекаются в дальнейшее окисление, происходящее уже в самих митохондриях. При этом происходит использование энергии расщепления всех химических связей, что приводит к выделению CO<sub>2</sub>, к потреблению кислорода и

синтезу большого количества АТФ — около 10 молекул на клетку. Эти процессы связаны с окислительным циклом трикарбоновых кислот и с дыхательной цепью переноса электронов, где происходит фосфорилирование АДФ и синтез клеточного «топлива», молекул АТФ (см. рис. 18.9).

В цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса, или цикл лимонной кислоты) образовавшийся в результате гликолиза пируват сначала теряет молекулу  $\text{CO}_2$  и, окисляясь до ацетата (двууглеродное соединение), соединяется с коферментом А. Затем ацетилкоэнзим А, соединяясь с оксалацетатом (четырёхуглеродное соединение), образует шестиуглеродный цитрат (лимонную кислоту). Затем происходит цикл окисления этого шестиуглеродного соединения до четырёхуглеродного оксалацетата, снова связывание с ацетилкоэнзимом А, и затем цикл повторяется. При этом окислении выделяются две молекулы  $\text{CO}_2$ , а электроны, освободившиеся при окислении, переносятся на акцепторные молекулы коферментов (НАД-никотинамидадениндинуклеотид), которые вовлекают их далее в цепь переноса электронов. Следовательно, в цикле трикарбоновых кислот нет самого синтеза АТФ, а идет окисление молекул, перенос электронов на акцепторы и выделение  $\text{CO}_2$ . Все описанные выше события внутри митохондрий происходят в их матриксе.

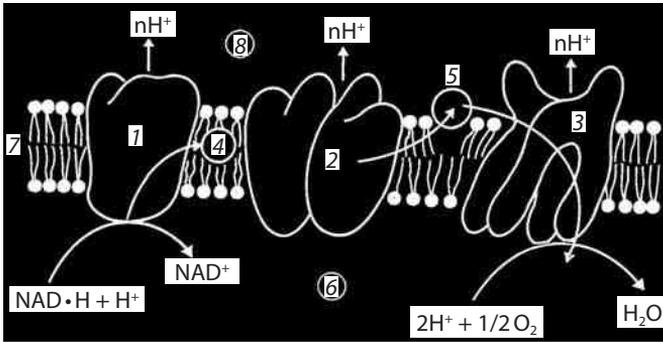
В матриксе локализованы ферменты этого цикла, которые находятся в свободном, не связанном состоянии с митохондриальными мембранами, за исключением сукцинатдегидрогеназы. Кроме того, в состав матрикса входят ферменты окисления жирных кислот; основной продукт окисления жирных кислот — ацетилкоэнзим А — тоже в матриксе поступает в цикл трикарбоновых кислот, в котором он подвергается дальнейшему окислению до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . В матриксе митохондрий происходит также окисление некоторых аминокислот, поступающих в цикл трикарбоновых кислот.

Остальные события, связанные с дальнейшим переносом электронов и синтезом АТФ, связаны с внутренней митохондриальной мембраной, с кристами митохондрий.

Освободившиеся в процессе окисления в цикле трикарбоновых кислот электроны, акцептированные на коферментах, переносятся затем в дыхательную цепь (цепь переноса электронов), где они соединяются с молекулярным кислородом, образуя молекулы воды.

Дыхательная цепь представляет собой ряд белковых комплексов, встроенных во внутреннюю митохондриальную мембрану (рис. 18.10). Существуют три главных ферментных комплекса. Первый, НАДН-дегидрогеназный комплекс принимает электроны от НАДН и переносит их во второй комплекс, комплекс  $\text{b-c}_1$ , который в свою очередь переносит их на цитохромоксидазный комплекс, а он их передает на кислород, в результате чего образуется вода. На этом окисление заканчивается.

Как и полагается, окисление исходного субстрата привело к выделению  $\text{CO}_2$  и воды, но при этом не выделилась тепловая энергия, как при горении, а образовались молекулы АТФ. Они были синтезированы другой группой белков, не связанных прямо с окислением. Было найдено, что во внутренних митохондриальных

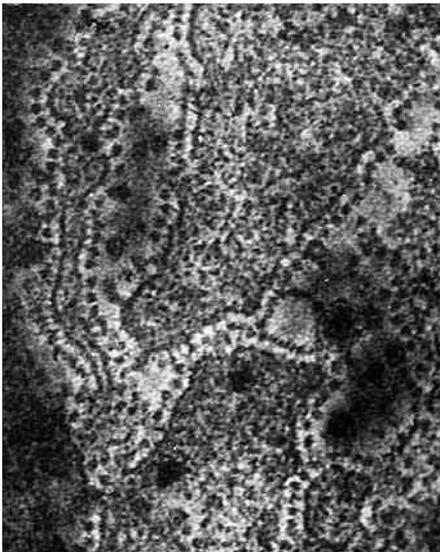


**Рис. 18.10.** Поток электронов через три главных ферментативных комплекса при переносе электронов от NADH к  $O_2$ :

1 — NADH-дегидрогеназный комплекс; 2 —  $C_1$ -комплекс; 3 — цитохромоксидазный комплекс; 4 — убиноин; 5 — цитохром С; 6 — матрикс митохондрии; 7 — внутренняя митохондриальная мембрана; 8 — межмембранное пространство

мембранах на поверхности мембран, смотрящих в матрикс, располагаются крупные белковые комплексы, ферменты, АТФ-синтетазы. В электронном микроскопе во фракции внутренних митохондриальных мембран видны так называемые «грибовидные» тельца, сплошь выстилающие поверхность мембран, смотрящую в матрикс. Эти тельца диаметром 8–9 нм имеют как бы ножку и головку. Было обнаружено, что эти тельца представляют собой белковый комплекс, состоящий из 9 субъединиц — АТФ-синтетазу. Следовательно, во внутренних мембранах митохондрий локализованы ферменты как окислительной цепи, так и ферменты синтеза АТФ (рис. 18.11).

Дыхательная цепь — это главная система превращения энергии в митохондриях. Здесь происходит последовательное окисление и восстановление элементов дыхательной цепи, в результате чего высвобождается небольшими порциями энергия. За счет этой энергии из АДФ и фосфата образуется АТФ. Поэтому говорят, что окисление (перенос электронов) сопряжено с фосфорилированием ( $АДФ + Ф_n \rightarrow АТФ$ ), т.е. происходит процесс окислительного фосфорилирования.



**Рис. 18.11.** Выделенные внутренние мембраны митохондрий при негативном контрастировании. Видны «грибовидные тельца» (молекулы АТФ-синтетазы) (фото Л.Е. Бакеевой)

В результате многократной оборачиваемости субстратов в цикле Кребса происходит полное окисление поступивших продуктов первичного гликолитического окисления, и затем в цепи окислительного фосфорилирования происходит максимальное использование освободившейся при окислении энергии для синтеза АТФ.

Было высказано предположение, что выделяющаяся при транспорте электронов энергия запасается в виде градиента протонов на мембране. При этом на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий возникает повышенная концентрация

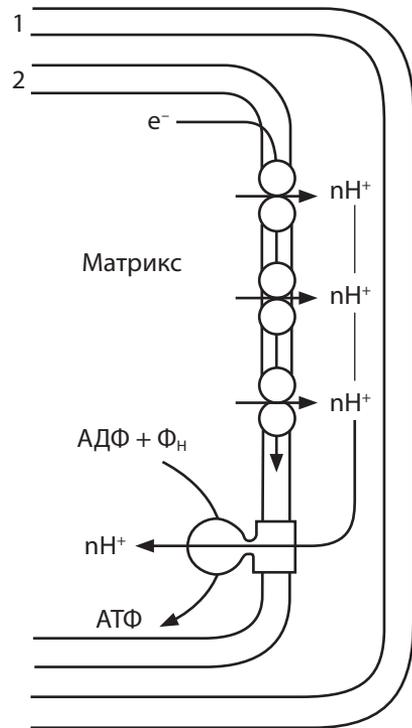
положительно заряженных ионов водорода. Возникший при этом протонный градиент является движущей силой в синтезе АТФ (рис. 18.12).

Это предположение стало затем теорией, хемиосмотической теорией сопряжения окисления субстратов с синтезом АТФ. Как оказалось, при переносе электронов в митохондриальной мембране каждый комплекс дыхательной цепи направляет свободную энергию окисления на перемещение протонов (положительных зарядов) через мембрану, из матрикса в межмембранное пространство, что приводит к образованию разности потенциалов на мембране: положительные заряды преобладают в межмембранном пространстве, а отрицательные — со стороны матрикса митохондрий. При достижении определенной разности потенциалов (220 мВ) белковый комплекс АТФ-синтетазы начинает транспортировать протоны обратно в матрикс, при этом превращает одну форму энергии в другую: образует АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Так происходит сопряжение окислительных процессов с синтетическим, с фосфорилированием АДФ. Пока происходит окисление субстратов, пока происходит перекачка протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану — идет сопряженный с этим синтез АТФ, т.е. происходит окислительное фосфорилирование.

Эти два процесса могут быть разобщены. Можно снять разность потенциалов на митохондриальной мембране, или механически ее нарушить, или с помощью химических соединений (например, динитрофенола) сделать в ней диффузионные каналы. При этом будет продолжаться перенос электронов, будет продолжаться окисление субстрата, но синтез АТФ уже происходить не будет. В этом случае энергия, освобождающаяся при окислении, будет переходить в тепловую энергию.

Патологические изменения митохондрий связаны в первую очередь с изменениями митохондриальных белков, кодируемых ядром, с изменениями транспорта этих белков и нарушениями целостности митохондриальных мембран.

Другая часть дисфункции митохондрий связана с мутациями митохондриальной ДНК и в первую очередь с мутациями, касающимися митохондриальных тРНК. В морфологическом отношении при различных формах повреждения



**Рис. 18.12.** Общая схема окислительного фосфорилирования по П.Митчеллу: при переносе электронов по цепи окисления протоны накапливаются в межмембранном пространстве и при достижении определенного потенциала возвращаются в матрикс, при этом на АТФ-синтетазном комплексе происходит синтез АТФ  
1 — внешняя мембрана, 2 — внутренняя мембрана

клеток наблюдается набухание матрикса митохондрий и падение числа митохондриальных крист, появление миелоноподобных мембранных структур. При алкогольном отравлении митохондрии могут значительно увеличиваться и приобретать необычную форму (мегамитохондрии). При некоторых миопатиях в матриксе митохондрий наблюдаются паракристаллические включения.

#### 4. Увеличение числа митохондрий

Так же как и другие органеллы цитоплазмы митохондрии могут увеличиваться в числе, что особенно заметно при делении клеток или при увеличении функциональной нагрузки клетки, более того, происходит постоянное обновление митохондрий. Так, в печени средняя продолжительность жизни митохондрий составляет около 10 дней. Поэтому закономерно возникает вопрос, каким образом происходит это увеличение числа митохондрий, за счет каких процессов и каких структур образуются новые митохондрии.

Основная масса экспериментальных данных говорит о том, что увеличение числа митохондрий происходит путем роста и деления предшествующих митохондрий. С помощью цейтраферной киносъемки удалось наблюдать прижизненно деление, фрагментацию длинных митохондрий на более короткие. Особенно отчетливо виден этот процесс при делении клеток некоторых одноклеточных водорослей и низших грибов, у которых деление митохондрий скоординировано с клеточным делением. В электронный микроскоп часто во многих клетках можно видеть деление митохондрий путем образования перетяжки (рис. 18.13), например в клетках печени (хотя без доказательств динамичности этого процесса такие наблюдения мало убедительны). Внешне все эти картины очень напоминают бинарный способ деления бактерий.

Реальность увеличения числа митохондрий путем деления были доказаны при изучении поведения митохондрий в живых клетках культуры ткани. Было обнаружено, что в течение клеточного цикла митохондрии могут вырастать до нескольких мкм, а затем фрагментироваться, делиться на более мелкие тельца.

Кроме того, митохондрии могут сливаться друг с другом на некоторое время, затем снова расходиться или фрагментироваться и увеличиваться в числе. Однако никаких признаков «самоорганизации» митохондрий из каких-то мембранных компонентов не обнаружено.

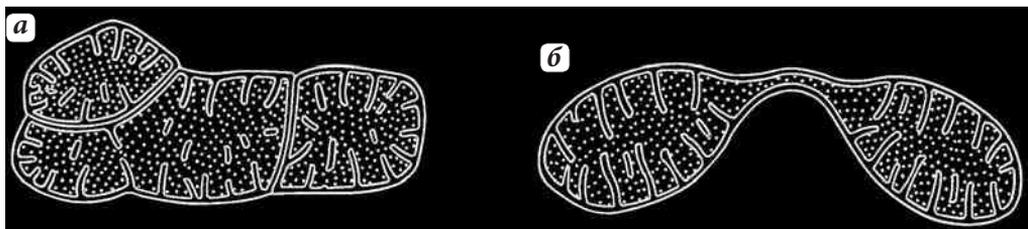


Рис. 18.13. Возможные пути деления митохондрий при образовании перегородок (а) или перетяжки (б) (по Muhlethaler, 1959)

Таким образом, размножение митохондрий идет по принципу: *omnis mitochondrion e mitochondrion*. При делении митохондрий: происходит увеличение массы митохондриальных мембран со всеми специфическими компонентами за счет синтеза и включения в них отдельных белков — ферментов и липидов, нарастание массы белков матрикса, а затем деление как бы удвоившейся или многократно увеличившейся структуры.

Эти представления получают поддержку со стороны фактов, касающихся организации и состава митохондриального матрикса или митоплазмы, в которой обнаружены ДНК, разные типы РНК и рибосомы.

## 5. Авторепродукция митохондрий

Исследования последних лет привели к удивительным открытиям: митохондрии обладают полной системой авторепродукции. Эта система полная в том смысле, что в митохондриях и пластидах открыта ДНК, на которой в них синтезируются информационные, трансферные и рибосомные РНК и рибосомы, осуществляющие синтез митохондриальных и пластидных белков. Однако, как оказалось, эти системы, хотя и автономны, очень ограничены по своим возможностям.

ДНК в митохондриях представлена циклическими молекулами, не образующими связь с гистонами, в этом отношении они напоминают бактериальные хромосомы. Размер их невелик, около 7 мкм, в одну циклическую молекулу митохондриальной животной входит 16–19 тыс. нуклеотидных пар ДНК. У человека митохондриальная ДНК содержит 16,5 тыс. н.п., она полностью расшифрована. Найдено, что митохондриальная ДНК различных объектов очень однородна, отличие их заключается лишь в величине интронов и нетранскрибируемых участков. Все митохондриальные ДНК связаны с внутренней мембраной митохондрий и представлены множественными копиями, собранными в группы, кластеры. Так, в одной митохондрии печени крысы может содержаться от 1 до 50 циклических молекул ДНК. Общее же количество митохондриальной ДНК на клетку составляет около одного процента. Синтез митохондриальной ДНК не связан с синтезом ДНК в ядре.

Так же как и у бактерий митохондриальная ДНК собрана в отдельную зону — нуклеоид, его размер составляет около 0,4 мкм в диаметре. В длинных митохондриях может быть от 1 до 10 нуклеоидов. При делении длинной митохондрии от нее отделяется участок, содержащий нуклеоид (сходство с бинарным делением бактерий). Количество ДНК в отдельных нуклеоидах митохондрий может колебаться в 10 раз в зависимости от типа клеток.

Прижизненно нуклеоиды митохондрий можно окрашивать специальными флуорохромами. Оказалось, что в некоторых культурах в клетках от 6 до 60% митохондрий не имеют нуклеоида, что может объясняться тем, что деление этих оргanelл скорее связано с фрагментацией, а не с распределением нуклеоидов.

Как уже говорилось, митохондрии могут как делиться, так и сливаться друг с другом. В обычной культуре клеток человека HeLa все митохондрии содержат нуклеоиды. Однако одна из мутантных линий этой культуры содержала митохондрии,

в которых нуклеоиды с помощью флуорохромов не выявлялись. Но если эти мутантные клетки слить с цитопластами клеток исходного типа, то во всех митохондриях нуклеоиды были обнаружены. Это говорит о том, что при слиянии митохондрий друг с другом может происходить обмен их внутренними компонентами.

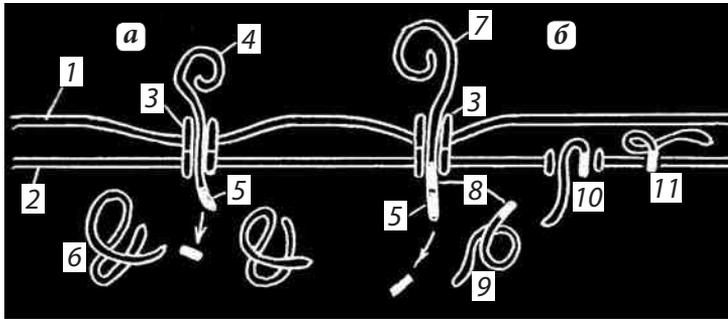
Важно подчеркнуть, что рРНК и рибосомы митохондрий резко отличны от таковых в цитоплазме. Если в цитоплазме обнаруживаются 80s рибосомы, то рибосомы митохондрий растительных клеток принадлежат к 70s рибосомам (состоят из 30s и 50s субъединиц, содержат 16s и 23s РНК, характерные для прокариотических клеток), а в митохондриях клеток некоторых животных обнаружены более мелкие рибосомы (около 50s).

Рибосомные РНК митохондрий синтезируются на митохондриальных ДНК. В митоплазме на рибосомах идет синтез белков. Он прекращается, в отличие от синтеза на цитоплазматических рибосомах, при действии антибиотика хлорамфеникола, подавляющего синтез белка у бактерий.

На митохондриальном геноме синтезируются и транспортные РНК, всего синтезируется 22 тРНК. Триплетный код митохондриальной синтетической системы отличен от такового, используемого в гиалоплазме. Несмотря на наличие казалось бы всех компонентов, необходимых для синтеза белков, небольшие молекулы митохондриальной ДНК не могут кодировать все митохондриальные белки, только лишь их небольшую часть. Так, ДНК размером 15 тыс. н.п. может кодировать белки с суммарным молекулярным весом около  $6 \cdot 10^5$ . В это же время суммарный молекулярный вес белков частицы полного дыхательного ансамбля митохондрии достигает величины около  $2 \cdot 10^6$ . Если учесть, что кроме белков окислительного фосфорилирования в митохондрии входят ферменты цикла трикарбоновых кислот, ферменты синтеза ДНК и РНК, ферменты активации аминокислот и другие белки, то видно, что, для того чтобы кодировать эти многочисленные белки и рРНК и тРНК, количества генетической информации в короткой молекуле митохондриальной ДНК явно не хватает. Расшифровка нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК человека показала, что она кодирует всего лишь 2 рибосомные РНК, 22 трансферных РНК и всего 13 различных полипептидных цепей, т.е. в ней содержится только 37 генов.

В настоящее время имеются убедительные доказательства, что большая часть белков митохондрий находится под генетическим контролем со стороны клеточного ядра и синтезируется вне митохондрий. Так, в частности цитохром С, образуется в гиалоплазме, а из девяти полипептидных цепей в составе АТФ-синтетазы только две синтезируются в матриксе митохондрий животных. Митохондриальная ДНК кодирует лишь немногие митохондриальные белки, которые локализованы в мембранах и представляют собой структурные белки, которые связаны с транспортом электронов и окислительным фосфорилированием и отвечают за правильную интеграцию в митохондриальных мембранах отдельных функциональных компонентов.

Большинство митохондриальных белков синтезируется на рибосомах в цитозоле. Эти белки имеют специальные сигнальные последовательности, которые



**Рис. 18.14.** Транспорт белков из цитоплазмы в митохондрии происходит через область контакта митохондриальных мембран:

**а** — транспорт белка в матрикс митохондрий; **б** — включение белка во внутреннюю митохондриальную мембрану

1 — внешняя мембрана митохондрии; 2 — внутренняя мембрана митохондрии; 3 — каналные белки; 4 — транспортируемый белок матрикса; 5 — сигнальный конец белка; 6 — белок в матриксе; 7 — транспортируемый белок внутренней мембраны; 8 — второй сигнальный пептид; 9 — перенос белка в матрикс; 10 — второй сигнальный участок белка встраивается в мембрану; 11 — встроенный белок внутренней мембраны

узнаются рецепторами на внешней мембране митохондрий. Эти белки могут встраиваться в них (см. аналогию с мембраной пероксисом), а затем перемещаться на внутреннюю мембрану. Этот перенос происходит в точках контакта наружной и внутренней мембран, где такой транспорт отмечен (рис. 18.14). Большинство липидов митохондрий так же синтезируются в цитоплазме.

Наличие собственной генетической системы митохондрий можно связать с рядом наследственных заболеваний, определяемых мутациями митохондриальных генов, ответственных за синтез некоторых митохондриальных белков и трансферных РНК. Например, наследственная оптическая нейропатия (болезнь Лебера) является результатом мутации одной из субъединиц NADH-редуктазы и одной из транспортных РНК.

Открытия, показывающие относительно независимое строение и функционирование системы белкового синтеза митохондрий, возродили гипотезу о эндосимбиотическом происхождении митохондрий, о том, что митохондрии представляют собой организмы типа бактерий, находящиеся в симбиозе с эукариотической клеткой.

## 6. Хондриом

**Хондриом** — это совокупность всех митохондрий в одной клетке. Оказалось, что такая совокупность может быть различной в зависимости от типа клеток. Так, во многих клетках хондриом представлен разрозненными многочисленными митохондриями, разбросанными довольно равномерно по всей цитоплазме, как, например, во многих недифференцированных клетках (рис. 18.15). В других случаях отдельные митохондрии локализуются группами в местах интенсивной траты

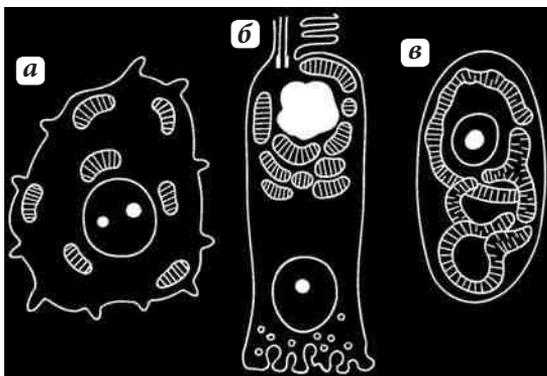


Рис. 18.15. Разные формы хондриома:

**а** — разрозненные митохондрии; **б** — группы митохондрий;  
**в** — митохондриальный ретикулум

митохондриальную систему, сеть или, как ей дали название, **митохондриальный ретикулум** (*Reticulum myochondriale*). Каков биологический смысл появления такой гигантской разветвленной митохондриальной структуры, объединенной в одно целое своими внешними и внутренними мембранами? Согласно хемоосмотической теории, возникший на поверхности внутренней мембраны электрохимический протонный градиент равномерно распределяется по поверхности внутренней мембраны митохондрий, она эквипотенциальна в любой своей точке. Поэтому в любой точке поверхности внутренней мембраны такой разветвленной митохондрии может идти синтез АТФ, который будет поступать в любую точку цитоплазмы, где в этом есть необходимость. Т.е. такие разветвленные митохондрии могут представлять собой «электрический кабель».

То, что это действительно имеет место, было доказано экспериментально. Были выбраны растущие в культуре ткани фибробласты, в цитоплазме которых имеются длинные нитчатые митохондрии, достигающие 60 мкм. В живых клетках их можно наблюдать с помощью флуорохрома этилродамина, который накапливается в матриксе только работающих, синтезирующих АТФ, митохондрий.

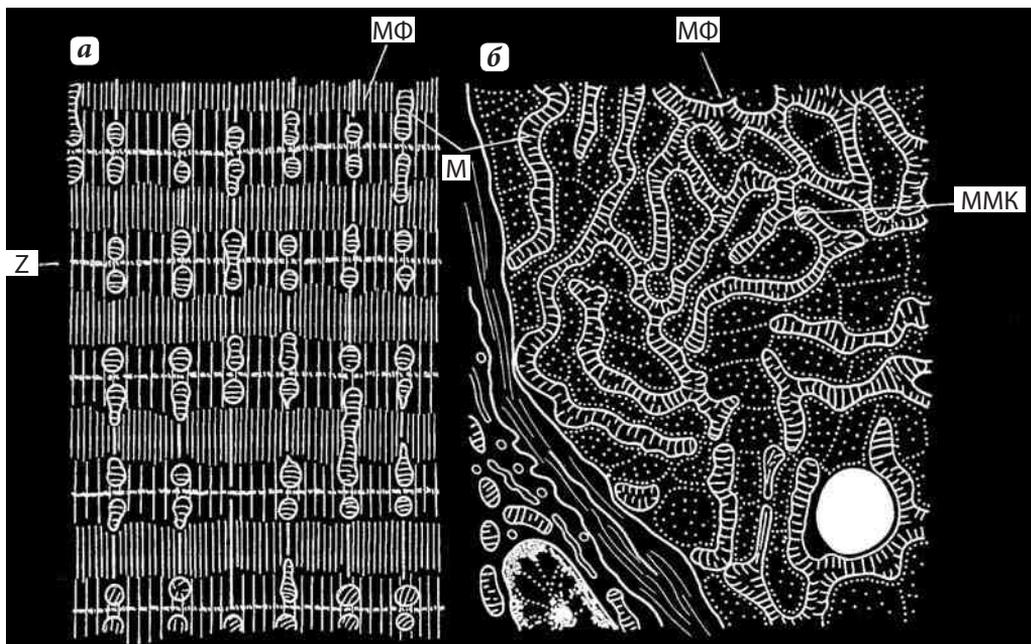
При облучении отдельной митохондрии происходит в ней гашение флуоресценции родамина из-за того, что в результате пробоя внутренней мембраны митохондрии разность потенциалов на ней падает, и родамин как бы вытекает из матрикса митохондрии. При этом соседние митохондрии не меняют своего свечения и продолжают синтез АТФ. Что же произойдет, если облучить небольшой участок разветвленной или же очень длинной митохондрии? В эксперименте одна из протяженных светящихся митохондрий фибробласта была локально поражена узким (0,5 мкм) микролучом оптического лазера. В результате этого вся длинная митохондрия потухла, в то время как соседние оставались без изменений. Это говорит о том, что точечный пробой мембраны митохондрии приводит к снятию разности потенциалов не только в точке пробоя, но по всей длине митохондрии, которая представляет собой проводник с эквипотенциальной поверхностью. Следовательно, такие длинные нитчатые митохондрии фибробластов могут представлять

АТФ, как, например, в клетках анализаторов сетчатки. В обоих этих случаях митохондрии функционируют поодиночке, их кооперативная работа, возможно, координируется какими-то сигналами из цитоплазмы. Однако существует и совершенно иной тип хондриома, когда вместо мелких одиночных разрозненных митохондрий в клетке располагается одна или несколько гигантских разветвленных митохондрий (см. рис. 18.16). В этих случаях мы видим не отдельные митохондрии, а сложную

собой электрические проводники, могущие передавать разность потенциалов на митохондриальных мембранах на большие расстояния и объединять удаленные участки цитоплазмы.

Это значит, что и в случае гигантских разветвленных митохондрий в любой ее точке может на внутренней мембране накопиться потенциал, достаточный для того, чтобы начался синтез АТФ. С этих позиций митохондриальный ретикулум представляет собой как бы электрический проводник, кабель, соединяющий удаленные точки такой системы. Митохондриальный ретикулум может оказаться очень полезным не только для мелких подвижных клеток, таких как хлорелла, но и для более крупных, там, где требуется кооперация и синхронизация в работе многих структурных единиц таких как, например, миофибриллы в скелетных мышцах.

В электронном микроскопе видно, что мышечные митохондрии представляют собой не мелкие шарики или палочки (рис. 18.16, 18.17, по данным Л.Е. Бакеевой, Ю.С. Ченцова и В.П. Скулыева), а как бы паукообразные структуры, отростки которых могут ветвиться и простираются на большие расстояния, иногда через весь поперечник мышечного волокна. При этом разветвления митохондрий окружают каждую миофибриллу в мышечном волокне, снабжая их АТФ, необходимого для мышечного сокращения. Следовательно, митохондрии скелетных мышц представлены типичным митохондриальным ретикулумом — единой митохондриальной системой. Такой пласт, или этаж, митохондриального ретикулума повторяется дважды на каждый саркомер, а все мышечное волокно имеет тысячи поперечно



**Рис. 18.16.** Схема. Расположение митохондрий в поперечно-полосатой мышце диафрагмы крысы:

**а** — продольный срез; **б** — срез на уровне z-диска; М — митохондрии; ММК — межмитохондриальные контакты; МФ — миофибриллы

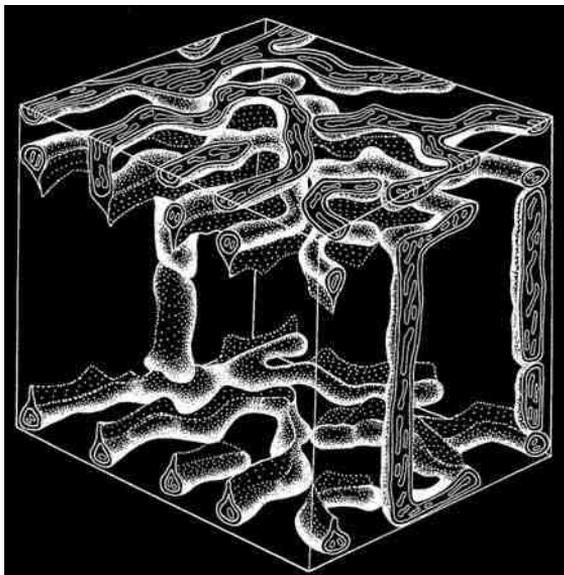


Рис. 18.17. Схема трехмерной организации митохондриального ретикулума в скелетной мышце

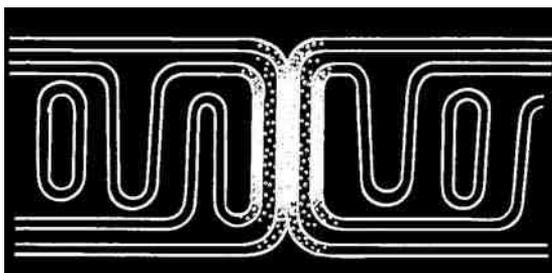


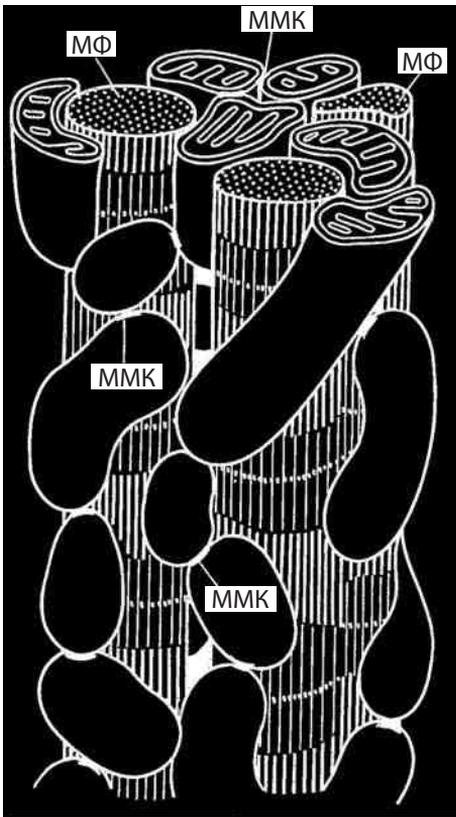
Рис. 18.18. Схема строения межмитохондриального контакта

расположенных «поэтажных» пластов митохондриального ретикулума. Было обнаружено, что между «этажами» вдоль миофибрилл располагаются нитчатые митохондрии, соединяющие эти митохондриальные пласты. Тем самым создается трехмерная картина митохондриального ретикулума, проходящего через весь объем мышечного волокна.

Здесь же было обнаружено, что как между ответвлениями митохондриального ретикулума, так и между ним и нитевидными продольными митохондриями существуют специальные *межмитохондриальные* соединения или *контакты* (ММК). Они образованы плотно прилегающими наружными митохондриальными мембранами контактирующих митохондрий, межмембранное пространство и мембраны в этой зоне имеют повышенную электронную плотность (рис. 18.18). Было сделано предположение, что через эти специальные образования может происходить функциональное объединение соседних митохондрий и митохондриальных ретикулумов в единую, кооперативную энергетическую систему.

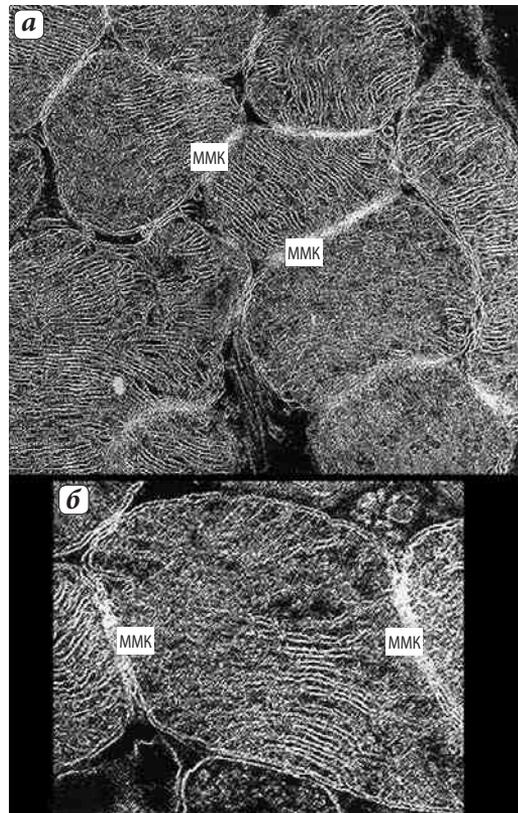
Доказать то, что ММК действительно участвуют в энергетическом объединении митохондрий друг с другом, удалось на другом типе поперечно-исчерченных мышц — на кардиомиоцитах, клетках сердечных мышц.

Оказалось, что хондриом клеток сердечной мышцы не образует ветвящихся структур, а представлен множеством небольших вытянутых митохондрий, располагающихся без особого порядка между миофибриллами. Однако было найдено, что все соседние митохондрии стыкуются друг с другом с помощью митохондриальных контактов такого же типа, как в скелетной мышце, только их число очень велико: в среднем на одну митохондрию приходится 2–3 ММК, которые связывают митохондрии в единую цепь, где каждым звеном такой цепи (*Streptio mitochondriale*) является отдельная митохондрия (рис. 18.19). Такой тип хондриома также может служить целям синхронного сокращения всех саркомеров



**Рис. 18.19.** Схема расположения митохондрий в клетке сердечной мышцы:

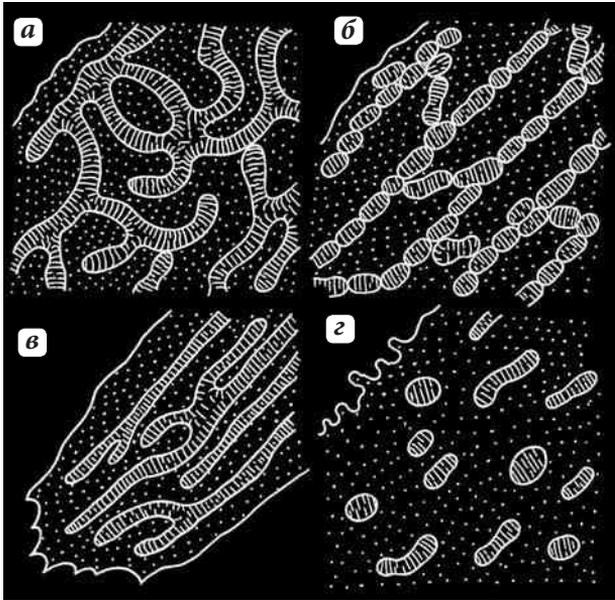
ММК — межмитохондриальные контакты; МФ — миофибриллы



**Рис. 18.20.** **а** — межмитохондриальные контакты в кардиомиоцитах левого желудочка крысы (ММК); **б** — сближение мембран соседних митохондрий в области ММК (фото Т.В. Липиной)

в миофибриллах кардиомиоцитов. Для такой кооперативной координации митохондрий должны служить множественные межмитохондриальные контакты (рис. 18.20).

Для доказательства этой гипотезы были использованы кардиомиоциты эмбрионов крысы в культуре ткани. В электронном микроскопе было обнаружено, что между некоторыми митохондриями были видны ММК, объединяющие их в небольшие группы — кластеры. В дальнейшем были проведены эксперименты, аналогичные тем, которые сделаны на культуре фибробластов: митохондрии живых кардиомиоцитов окрашивали этилродамином, а затем одну из митохондрий в группе облучали лазерным микролучом. Облучение одиночных митохондрий приводило к быстрому их гашению. В одних случаях погасала только облученная митохондрия, в других — теряла люминесценцию вся группа митохондрий. Электронная микроскопия показала, что в последнем случае митохондрии в кластере были связаны друг с другом с помощью ММК. Следовательно, гашение группы митохондрий, связанных ММК, доказывает, что ММК, как клеммы, объединяют в единую цепь потенциалы одиночных митохондрий.



**Рис. 18.21.** Схема различной организации хондриома:

**а** — митохондриальная сеть (reticulum mitochondriale); **б** — митохондриальная цепь (streptio mitochondriale); **в** — нитчатые митохондрии; **г** — одиночные митохондрии

ММК обнаружены в кардиомиоцитах как желудочков, так и предсердий всех позвоночных животных: млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, амфибий и костистых рыб.

Количество ММК в кардиомиоцитах изменяется в зависимости от функциональной нагрузки на сердце. Так, если у крыс вызвать экспериментальное усиление работы сердечной мышцы, например при компенсаторной гипертрофии миокарда (частичная перевязка аорты), то количество ММК увеличивается почти вдвое. Увеличивается число ММК и при повышении физических нагрузок животных. Наоборот, при ограничении подвижности животных, находящихся в тесных камерах более 4-х месяцев (как в космическом корабле), при падении нагрузки на сердечную мышцу, происходит резкое сокращение числа ММК.

На рисунке 18.21 представлены варианты организации хондриома в различных клетках. Хондриом может иметь различную композицию в зависимости от энергетических потребностей клетки. В простейшем (и чаще встречающемся) случае он может быть представлен множеством разрозненных небольших митохондрий, функционирующих независимо друг от друга и снабжающих АТФ небольшие участки цитоплазмы. В другом случае длинные и разветвленные митохондрии могут энергетически обеспечивать отдаленные друг от друга участки клетки. Вариантом такой протяженной системы может быть хондриом типа митохондриального ретикулама, который встречается как у одноклеточных, так и у многоклеточных организмов. Особенно сложно этот вид хондриома выражен в скелетных мышцах млекопитающих, где группы гигантских разветвленных митохондрий связаны друг с другом с помощью ММК. Вообще же наличие ММК характерно для хондриомов сократимых структур. Особенно обильно ММК представлены в клетках сердечных мышц, где они функционально связывают многочисленные отдельные митохондрии в единую разветвленную цепь.

# Часть V

## ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА (ЦИТОСКЕЛЕТ) КЛЕТКИ

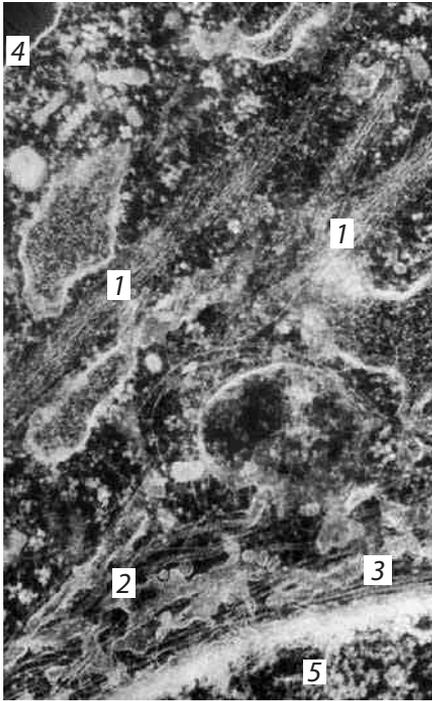
В предыдущих главах уже много и часто говорилось о движении: движутся хромосомы к полюсам клетки во время митоза, перемещаются вакуоли клеточных органелл, движется клеточная поверхность. Более того, отдельные клетки (свободноживущие одноклеточные организмы или специфические типы клеток в многоклеточных животных организмах) обладают способностью активно перемещаться, ползать. Некоторые клетки имеют специализированные структуры, реснички или жгутики, которые позволяют им или самым перемещаться, или перемещать окружающую их жидкость. Наконец, у многоклеточных животных организмов есть специализированные клетки, мышечная работа которых позволяет производить различные движения органов, отдельных его частей и всего организма. Было найдено, что в основе всех этих многочисленных двигательных реакций лежат общие молекулярные механизмы. Кроме того, было показано, что наличие каких-либо двигательных аппаратов должно сочетаться и структурно связываться с существованием опорных, каркасных или скелетных внутриклеточных образований. Поэтому можно говорить (описывать и изучать) об опорно-двигательной системе клеток.

Само понятие о цитоскелете или скелетных компонентах цитоплазмы разных клеток было высказано Н.К. Кольцовым, выдающимся русским цитологом еще в начале XX века. К сожалению, они были забыты и только уже в конце 50-х годов с помощью электронного микроскопа эта скелетная система было переоткрыта.

Цитоскелетные компоненты представлены нитевидными, неветвящимися белковыми комплексами или филаментами (тонкими нитями).

Существуют три системы филаментов, различающихся как по химическому составу, так и по своей ультраструктуре, так и по функциональным свойствам. Самые тонкие нити — это *микротиламенты*; их диаметр составляет около 8 нм и состоят они в основном из белка актина. Другую группу нитчатых структур составляют *микротрубочки*, которые имеют диаметр 25 нм и состоят в основном из белка тубулина, и, наконец, *промежуточные филаменты* с диаметром около 10 нм (промежуточный по сравнению с 6 нм и 25 нм), образующиеся из разных, но родственных белков (рис. 19.1, 19.2).

Все эти фибриллярные структуры могут участвовать в качестве составных частей в процессе физического перемещения клеточных компонентов или даже целых клеток, кроме того они же в ряде случаев выполняют сугубо каркасную скелетную роль. Степень выраженности их в разных клетках может быть различной. Так, например, клетки эпидермиса кожи особенно богаты промежуточными



**Рис. 19.1.** Электронная микроскопия элементов цитоскелета:

1 — пучки микрофиламентов; 2 — микротрубочки; 3 — промежуточные филаменты; 4 — плазматическая мембрана; 5 — ядро

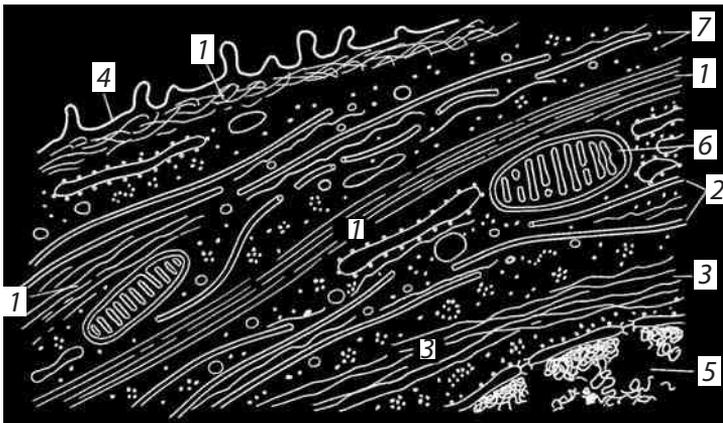
филаментами, мышечные клетки — актиновыми микрофиламентами, особенно многих микротрубочек в пигментных клетках, меланоцитах, в отростках нервных клеток и т.д.

Общими свойствами элементов цитоскелета является то, что это белковые, неветвящиеся фибриллярные полимеры, нестабильные, способные к полимеризации и деполимеризации. Такая нестабильность может приводить к некоторым вариантам клеточной подвижности, например, к изменению формы клетки. Некоторые компоненты цитоскелета при участии специальных дополнительных белков могут стабилизироваться или образовывать сложные фибриллярные ансамбли, и играть только каркасную роль. При взаимодействии с другими специальными белками-транслокаторами (или моторными белками) они могут участвовать в разнообразных клеточных движениях.

По своим свойствам и функциям элементы цитоскелета можно разделить на две группы: только каркасные фибриллы — промежуточные филаменты, и опорно-двигательные, например, актиновые микрофиламенты, взаимодействующие с другими

моторными белками — миозинами, и тубулиновые микротрубочки, взаимодействующие с моторными белками динеинами и кинезинами.

Причем во второй группе фибрилл цитоскелета (микрофиламенты и микротрубочки) могут осуществляться два принципиально различных способа движения. Первый из них основан на способности основного белка микро-



**Рис. 19.2.** Схема цитоскелетных компонентов клеток:

1 — микрофиламенты; 2 — микротрубочки; 3 — промежуточные филаменты; 4 — плазматическая мембрана; 5 — ядро; 6 — митохондрии; 7 — рибосомы

филаментов — актина и основного белка микротрубочек — тубулина к полимеризации и деполимеризации, что может при связи этих белков с плазматической мембраной вызывать ее морфологические изменения в виде образования выростов (псевдоподий и ламеллоподий) на краю клетки. Псевдоподии и тонкие выросты (филоподии) могут или втягиваться обратно в клетку, или закрепляться на поверхности клетки и затем участвовать в перемещении клетки по субстрату.

При другом способе передвижения фибриллы актина (микрофиламенты) или тубулина (микротрубочки) являются направляющими структурами, по которым перемещаются специальные подвижные белки-моторы. Последние могут связываться с мембранными или фибриллярными компонентами клетки и тем самым участвовать в их перемещении.

# Глава 19

## Промежуточные филаменты

Промежуточные филаменты (ПФ) строятся из фибриллярных мономеров. Поэтому основная конструкция промежуточных филаментов напоминает канат, имеющий толщину около 8–10 нм. Они локализуются главным образом в околоядерной зоне и в пучках фибрилл, отходящих к периферии клеток и располагающихся под плазматической мембраной (рис. 19.3, 19.4). Встречаются промежуточные филаменты во всех типах клеток животных, но особенно обильны в тех, которые подвержены механическим воздействиям: клетки эпидермиса, нервные отростки, гладкие и исчерченные мышечные клетки.

В состав промежуточных филаментов входит большая группа изобелков, родственных белков, которую можно разделить на четыре типа. Первый — **кератины**, кислые и нейтральные, встречающиеся в эпителиальных клетках; они образуют гетерополимеры из этих двух подтипов. Кератины, кроме того, имеют некоторую гетерогенность, зависящую от тканевого источника. Так, в эпителиях встречается до 20 форм кератинов, 10 форм других кератинов найдено в волосах и ногтях. Молекулярный вес кератинов колеблется от 40 до 70 тыс.

Второй тип белков ПФ включает в себя три вида белков, имеющих сходный молекулярный вес (45–53 тыс.). Это **виментин**, характерный для клеток мезенхимного происхождения, входящий в состав цитоскелета клеток соединительной ткани, эндотелия, клеток крови. **Десмин** — характерен для мышечных клеток, как гладких, так и исчерченных. **Глиальный фибриллярный белок** входит в состав ПФ некоторых клеток нервной глии — в астроциты и некоторые Шванновские клетки. **Периферин** — входит в состав периферических и центральных нейронов.

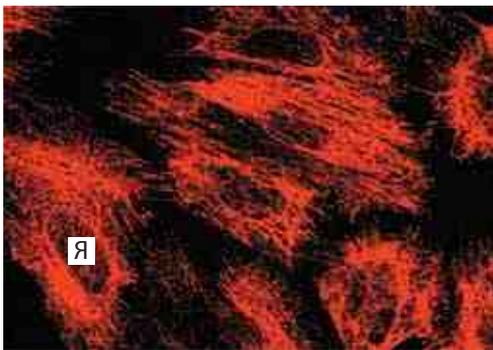


Рис. 19.3. Фибробласт в культуре ткани, промежуточные филаменты, окрашенные флуоресцирующими антителами к виментину: Я — ядро

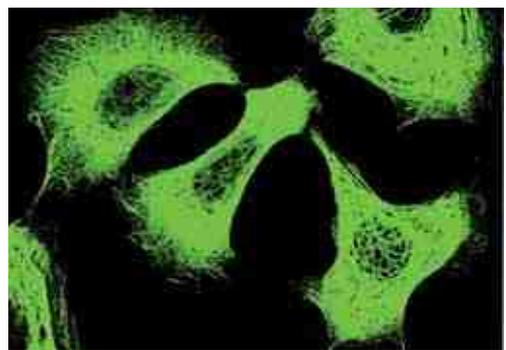


Рис. 19.4. Расположение промежуточных филаментов кератина в клетках эпителия

Третий тип — **белки нейрофиламентов** (мол. вес от 60 до 130 тыс.) встречается в аксонах нервных клеток.

И наконец, четвертый тип — **белки ядерной ламины**. Хотя эти последние имеют ядерную локализацию, они сходны по строению и свойствам со всеми белками промежуточных филаментов.

Как уже говорилось, промежуточные филаменты построены из фибриллярных белков наподобие каната. При этом некоторые белки могут образовывать сополимеры, например виментин с десмином, или виментин с глиальными белками.

Все белки промежуточных филаментов обладают сходной аминокислотной последовательностью из 130 остатков в центральной части фибриллярной молекулы, которая обладает  $\alpha$ -спиральным строением. Концевые же участки молекул имеют разные последовательности аминокислот, разную длину, и не имеют  $\alpha$ -спирального строения. Наличие протяженных  $\alpha$ -спиральных участков позволяет двум молекулам образовывать двойную спираль, подобно тому, что приводит к образованию палочковидного димера, длиной около 48 нм. Два димера, объединяясь бок о бок, образуют короткий протофиламент, тетрамер, толщиной около 3 нм. Такие протофиламенты могут объединяться в более толстые и длинные фибриллы и в конечном итоге в промежуточный полный филамент, состоящий из 8 продольных протофиламентов (рис. 19.5).

Иначе полимеризуются белки ядерной ламины: они образуют димеры с головками на одном конце и полимеризуются, образуя рыхлую прямоугольную решетку. Такие слои ламины быстро разрушаются во время митоза при фосфорилировании ламинов.

Цитоплазматические промежуточные филаменты относятся к самым стабильным и долгоживущим элементам цитоскелета. ПФ устойчивы к действию солей низкой и высокой концентрации, разрушаются только после воздействия денатурирующих растворов, таких как мочевины.

Топографически в клетке расположение промежуточных филаментов повторяет расположение микротрубочек, они как бы идут бок о бок. При разрушении микротрубочек колхицином, происходит т.н. коллапс промежуточных филаментов: они собираются в плотные пучки или кольца вокруг ядра. Восстановление новой сети промежуточных филаментов начинается от зоны клеточного центра.

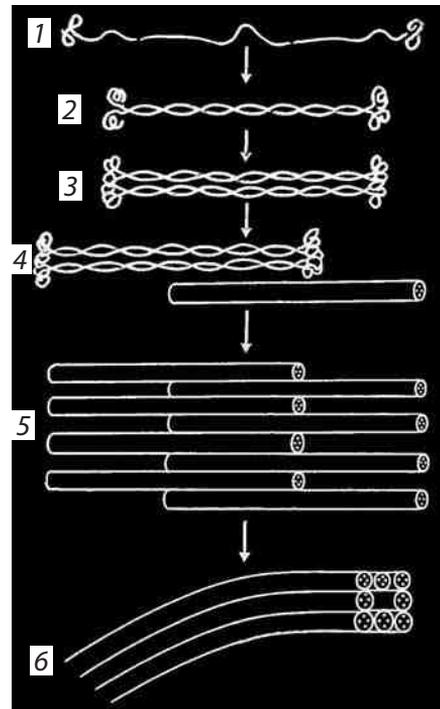


Рис. 19.5. Полимеризация белков и строение промежуточных филаментов:

1 — отдельная молекула; 2 — димер; 3 — тетрамер-протофиламент; 4–5 — полимеризация протофиламентов; 6 — сформированный промежуточный филамент

Это наводит на мысль, что центром их полимеризации или нуклеации могут быть центры, общие с микротрубочками.

Такая структура и химическая устойчивость промежуточных филаментов определяет и их физическую устойчивость. Они служат как бы истинно опорной системой в клетках, подвергающихся значительным физическим нагрузкам. В клетках кожного эпидермиса промежуточные филаменты образуют пучки (тонофиламенты), связанные с десмосомами, и создают жесткую внутриклеточную сеть. Так, в нервных аксонах, простирающихся на многие десятки сантиметров, ПФ или нейрофиламенты создают жесткую основу, обеспечивающую гибкость и целостность тонких цитоплазматических отростков нервных клеток. В поперечно исчерченных мышечных клетках десминовые филаменты входят в состав z-дисков и связывают их друг с другом как в составе саркомера, так и в соседних миофибриллах, а также с плазматической мембраной.

В отличие от кератинов и других цитоплазматических промежуточных филаментов ламины ядры деполимеризуются при переходе клетки к митозу за счет фосфорилирования этих белков.

При мутациях кератинов K4 и K14 у мышей возникает поражение кожи, напоминающее пузырчатку у человека. При этом не происходит образования нормальных кератиновых пучков в базальных клетках эпидермиса, эти клетки становятся чувствительными к повреждениям, что приводит к отделению слоя эпидермиса от подлежащей соединительной ткани.

Скопление кератиновых филаментов и нейрофиламентов ассоциируется с некоторыми видами клеточных нарушений. Например, тельца Мэллори или «алкогольный гиалин» в виде эозинофильных клеточных включений в печени является характерным признаком алкогольных заболеваний. Нейрофибрилярные сплетения в нейронах мозга при болезни Альцгеймера состоят из белков, ассоциированных с микротрубочками и нейрофиламентами, что отражает нарушения в цитоскелете нейронов.

# Глава 20

## Микрофиламенты

### 1. Общие свойства микрофиламентов

Микрофиламенты (МФ) встречаются во всех клетках эукариот. Особенно они обильны в мышечных волокнах и высокоспециализированных клетках, выполняющих функции сокращения мышц. Микрофиламенты (МФ) входят также в состав специальных клеточных компонентов, таких как микроворсинки, ленточные соединения эпителиальных клеток, в состав стереоцилий чувствительных клеток. МФ образуют пучки в цитоплазме подвижных клеток животных, и образуют слой под плазматической мембраной — кортикальный слой (рис. 20.1).

Основным белком микрофиламентов является актин. **Актин** — неоднородный белок, в различных клетках могут быть разные его варианты или изоформы, каждая из которых кодируется своим геном. Так, у млекопитающих есть 6 различных актинов: один в скелетных мышцах, один в сердечной мышце, два типа — в гладких мышцах (один из них в сосудах), и два, немышечных, цитоплазматических актина, являющихся универсальным компонентом любых клеток млекопитающих. Все эти изоформы актина очень сходны по аминокислотным последовательностям, вариантными в них являются концевые участки, которые определяют скорость полимеризации, но не влияют на сокращение. Такое сходство актинов, несмотря на некоторые отличия, определяет их общие свойства. Актин имеет молекулярный вес около 42 тыс. и в мономерной форме имеет вид глобулы (G-актин), содержащей в своем составе молекулу АТФ. При его полимеризации образуется тонкая фибрилла (F-актин) толщиной 8 нм, представляющая собой пологую спиральную ленту (рис. 20.2). Актиновые микрофиламенты полярны по своим свойствам. При достаточной концентрации G-актин начинает самопроизвольно полимеризоваться. При такой спонтанной полимеризации актина на образовавшейся нити микрофиламента один из ее концов быстро связывается с G-актином (+)-конец микрофиламента) и поэтому растет быстрее, чем противоположный (-)-конец). Если концентрация G-актина будет недостаточной, то образовавшиеся фибриллы

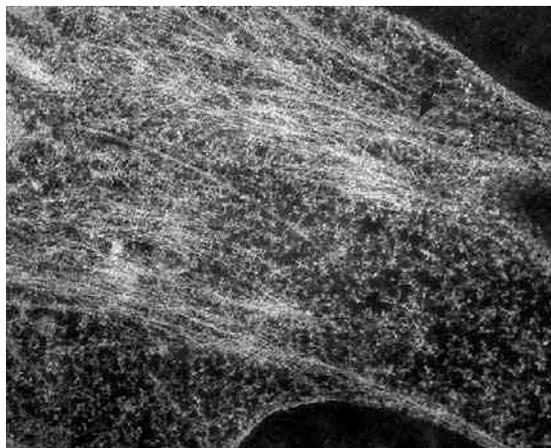
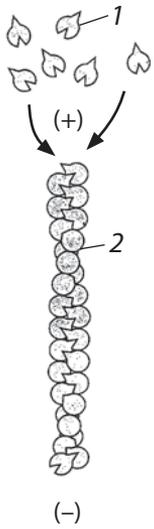


Рис. 20.1. Микрофиламенты в зоне ламеллоплазмы

образовавшейся фибриллы

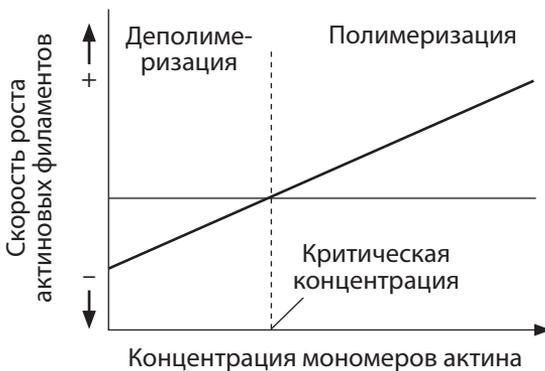


**Рис. 20.2.** Поляризованный рост актинового филамента имеет большую скорость на (+) конце:

1 — актиновый мономер (G-актин); 2 — актиновый филамент (F-актин)

друг с другом, чем мономеры, связанные с АДФ.

В клетках такая, казалось бы, неустойчивая фибриллярная система, стабилизируется массой специфических белков, ассоциирующих с F-актином. Так, белок **тропомиозин**, взаимодействуя с микрофиламентами, придает им необходимую жесткость. Целый ряд белков, например **филамин** и  **$\alpha$ -актинин** образуют поперечные скрепки между нитями F-актина, что приводит к образованию сложной трехмерной сети, придающей гелеобразное состояние цитоплазме. Другие дополнительные белки могут связывать филаменты в пучки (**фимбрин**) и т.д. Кроме того, существуют белки, взаимодействующие с концами микрофиламентов и предотвращая их разборку, стабилизируют их. Взаимодействие F-актина со всей этой группой белков регулирует агрегатное состояние микрофиламентов, их рыхлое или наоборот тесное расположение, связь их с другими компонентами. Особую



**Рис. 20.3.** Скорость роста актиновых микрофиламентов при различных концентрациях свободного актина

F-актина начинают разбираться. В растворах, содержащих т.н. критическую концентрацию G-актина, будет устанавливаться динамическое равновесие между полимеризацией и деполимеризацией, в результате чего фибрилла F-актина будет иметь постоянную длину (рис. 20.3). Из этого следует, что актиновые микрофиламенты представляют собой очень динамичные структуры, которые могут возникать и расти или же, наоборот, разбираться и исчезать в зависимости от наличия глобулярного актина. На растущем конце нити актина встраиваются мономеры, содержащие АТФ. По мере нарастания полимера происходит гидролиз АТФ, и мономеры остаются связанными с АДФ. Молекулы актина, связанные с АТФ, прочнее взаимодействуют

роль при взаимодействии с актином играют белки **миозинового типа**, которые образуют вместе с актином комплекс, способный к сокращению при расщеплении АТФ (см. ниже).

Таким образом, МФ представляют собой фибриллы полимеризованного актина, связанного с многими другими белками. В принципе микрофиламенты во всех немышечных клетках могут осуществлять по крайней мере два ряда функций: быть частью сократительного аппарата,

взаимодействуя с моторными белками (миозин), или участвовать в формировании скелетных структур, способных к собственному движению за счет процессов полимеризации и деполимеризации актина.

Особенно много сведений о цитоскелете и о микрофиламентах получено при изучении фибробластов в культуре ткани, обладающих способностью к амебоидному движению. Эти клетки не имеют ответственных за движение постоянных фибриллярных структур, их фибриллярный аппарат все время находится в реорганизации: часть фибриллярных элементов разбирается в одних участках клетки и новообразуется в других.

Обычно ползущий по поверхности субстрата фибробласт поляризован: у него есть движущийся конец и «хвостовой» отдел (рис. 20.4, 20.5). На движущемся конце, который часто более распластан по субстрату, чем боковые и хвостовые участки фибробласта, постоянно возникают и убираются тонкие нитевидные или пластинчатые выросты — *ламеллоподии*. Это — ведущий край клетки (ламеллоплазма), который и обеспечивает движение фибробласта вперед. В таком движущемся фибробласте с помощью антител можно узнать места расположения актина. Он будет распределяться по трем основным частям клетки: он в виде тонкого слоя (1) располагается по всему периметру клетки под плазматической мембраной. Это кортикальный (*cortex* — кора) слой. Обильно актин выявляется в выростах цитоплазмы ведущего края клетки (2) и (3) в пучках актиновых филаментов, отходящих от ведущего края вглубь клетки (рис. 20.6).

Кортикальный слой состоит из плотной трехмерной сети актиновых филаментов, ассоциированных с плазматической мембраной. Он обеспечивает механическую устойчивость

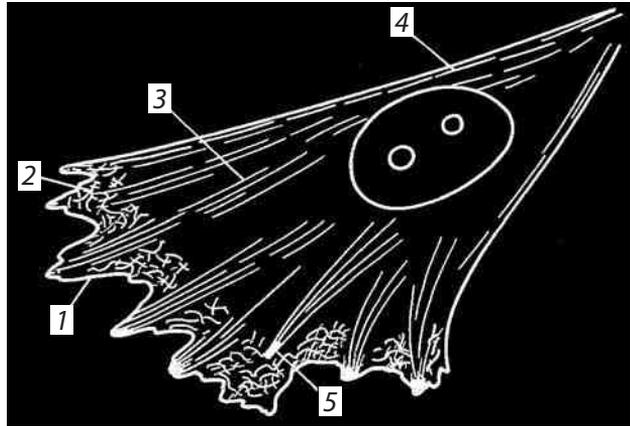
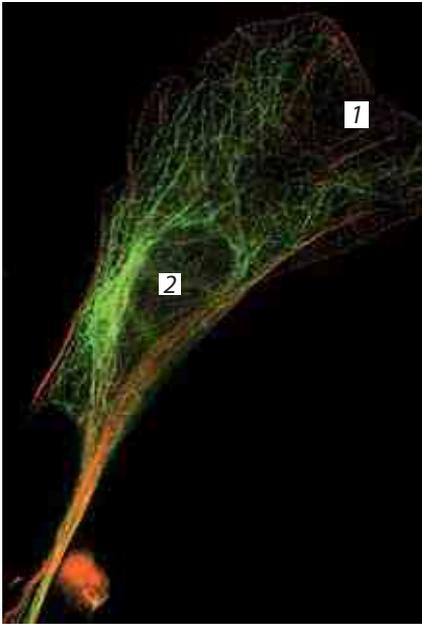


Рис. 20.4. Микрофиламенты поляризованного движущегося фибробласта:

1 — ламеллоподии движущегося края; 2 — сеть актиновых филаментов ламеллы; 3 — пучки микрофиламентов; 4 — микрофиламенты кортикального слоя; 5 — фокальный контакт



Рис. 20.5. Микрофотография поляризованных движущихся фибробластов в культуре ткани (фото И.С. Григорьева)



**Рис. 20.6.** Поляризованный движущийся фибробласт: красным окрашены антителами к актину микрофиламенты и их пучки, зеленым — микротрубочки, окрашенные антителами к тубулину:

1 — ламеллоплазма; 2 — ядро (фото И.С. Григорьева)

поверхностному слою цитоплазмы и создает условия, позволяющие клетке изменять свою форму и двигаться. Этот слой постоянно меняет свое агрегатное состояние, переходя из состояния структурированного геля в жидкий золь. Такие переходы гель-золь связаны с изменениями в структуре кортикального слоя. Здесь в ассоциации с актиновыми филаментами находятся фибриллярные белки-стабилизаторы (например, **филамин**), которые образуют сшивки в местах пересечения филаментов, что придает жесткость всему кортикальному слою. Однако эта жесткость может быть легко снята за счет взаимодействия с другими белками, такими как **гель-золин**, которые вызывают фрагментацию и разборку филаментов и тем разжижают гель. Такая перестройка подмембранного слоя особенно выражена в ведущем крае, что позволяет быстро менять форму его поверхности, образовывать ламеллоподии и двигаться вперед. С другой стороны, сеть актиновых филаментов способна к сокращению, т.к. в ней обнаружены короткие миозиновые агрегаты. Это приводит или к втягиванию ламеллоподий или же к подтаскиванию клеток вперед.

Сеть актиновых филаментов в ведущем крае организована более определенно, чем в остальном кортексе. Здесь от небольших начальных выростов плазмалеммы внутрь клетки отходят пучки актиновых филаментов, оканчивающихся своими (+)-концами на плазматической мембране.

Сам процесс образования актиновых филаментов и их роста в зоне ламеллоплазмы зависит от ряда регуляторных белков. Один из них белок WASp/Scar связывается с плазматической мембраной. В его составе есть участки, связывающиеся с актином, другой специальный белковый комплекс Arp2/3, который связывается с (-)-концом растущей цепи полимера, препятствуя его деполимеризации. Такие сложные взаимодействия двух групп регуляторных белков приводят к тому, что на границе с плазматической мембраной происходит надстраивание растущих филаментов, которые могут прогибать плазматическую мембрану так, что возникает тонкий вырост — филоподия (рис. 20.7).

Иначе происходит полимеризация актина при образовании ламеллоподий. Здесь также ведущую роль играют белки WASp/Scar, которые закрепляются на плазматической мембране и связываются с комплексом Arp2/3 и прикрепляют его к боковой поверхности уже готовой актиновой фибриллы. Комплекс Arp2/3 инициирует полимеризацию новой актиновой фибриллы, которая начинает расти под углом около  $70^\circ$  по отношению к первичной нити актина и закрепляется на плазматической

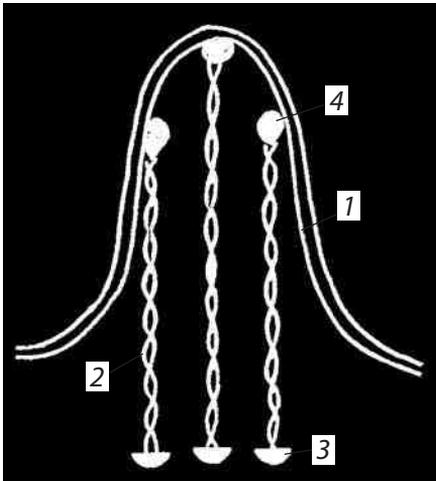


Рис. 20.7. Образование филоподии:

1 — плазматическая мембрана; 2 — актиновый микрофиламент; 3 — белок Arp 2/3; 4 — белок WASp

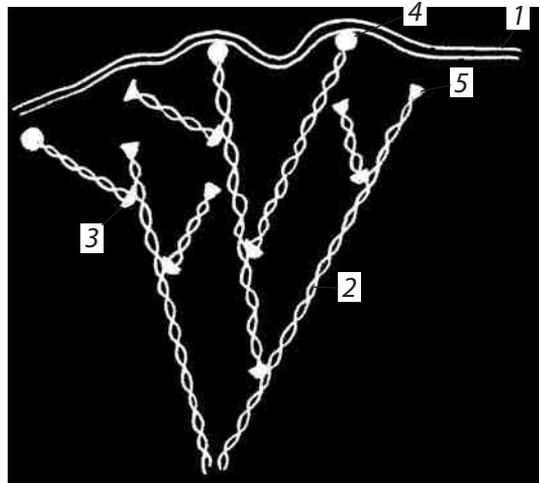


Рис. 20.8. Образование ламеллоподии.

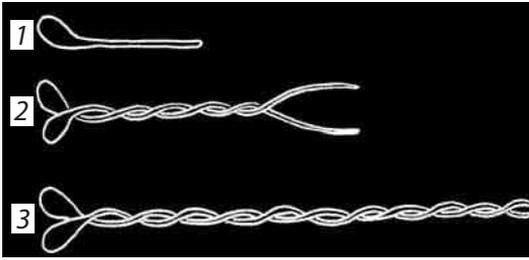
Обозначения те же, 5 — кэпирующий белок

мембране. Таких новых белковых цепей возникает несколько, и они как бы веером простираются к плазматической мембране и толкают ее вперед. Так образуется псевдоподия или ламеллоподия (рис. 20.8) за счет наращивания актиновых филаментов на (+) концах. Одновременно с этим происходит деполимеризация тех (-) концов филаментов, которые не заблокированы комплексами Arp2/3 и подвергаются воздействию белков, способствующих деполимеризации МФ.

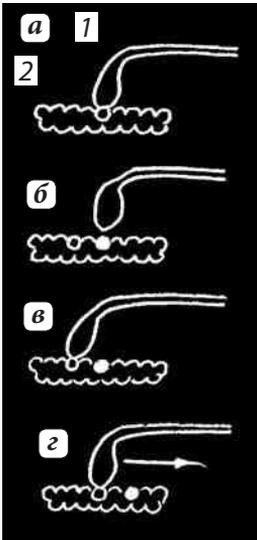
Таким образом, сложный процесс роста МФ приводит к перемещению в пространстве края движущейся клетки. По мере возникновения ламеллоподий их плазматическая мембрана с помощью белков интегринов образует с субстратом фокальные контакты, от которых отходят пучки актиновых филаментов, участвующие уже в другой форме подвижности, связанной со взаимодействиями между актиновыми филаментами и моторными белками-миозинами.

**Миозины** являются одним из составных компонентов МФ. Основная работа по перемещению клеток или их внутренних компонентов с помощью МФ происходит за счет работы **акто-миозинового комплекса**, где актиновые фибриллы играют роль направляющих («рельсы»), а миозины — транслокаторы. Весь акто-миозиновый комплекс представляет собой АТФ-азу, и движение происходит за счет энергии гидролиза АТФ.

Миозины представляют собой семейство сходных белков. У всех из них есть **головная** (моторная) часть, отвечающая за АТФ-азную активность комплекса, **шейка**, которая связана с несколькими регуляторными белковыми субъединицами, и **хвост**, характерный для каждого типа миозина, определяющего специфичность функции в клетке. Существуют три основных типа миозинов. Миозин II и миозин V являются димерами, у которых  $\alpha$ -спиральный участок хвоста образует сверхспиральный палочковидный участок. Миозин I представляет собой



**Рис. 20.9.** Основные типы миозинов:  
1 — миозин I; 2 — миозин V; 3 — миозин II



**Рис. 20.10.** Последовательности акто-миозинового движения:

**а** — исходное положение: головка миозина связана с актиновым филаментом; **б** — головка миозина отходит от актинового филамента; **в** — головка миозина связывается с другой субъединицей актина; **г** — головка миозина переходит в исходное положение: перемещение актинового филамента

мономерную молекулу (рис. 20.9). Две молекулы миозина II могут ассоциировать друг с другом, образуя биполярную толстую фибриллу, участвующую в мышечном сокращении, при сокращении внутриклеточных пучков МФ и при делении клетки. Миозины I и V типа участвуют во взаимодействиях между элементами цитоскелета и мембранами, например в транспорте везикул.

Механизмы работы актомиозиновых комплексов очень сходен, независимо от типа миозина: он начинается со связи миозиновой головки с актиновым филаментом, ее изгибанием и последующим откреплении. За каждый цикл миозиновая головка перемещается в направлении (+)-конца актинового филамента на 5–25 нм при гидролизе одной молекулы АТФ. Таким образом происходит однонаправленное смещение или скольжение МФ относительно молекул миозина (рис. 20.10).

## 2. Акто-миозиновые комплексы неммышечных клеток

Акто-миозиновые комплексы участвуют в движении ламеллоплазмы. Так, молекулы миозина I были выявлены на ведущем краю движущихся амебных форм диктиостелиума, в то время как миозин II типа обнаруживался в теле и конце клетки. Миозин I типа участвует в движении микроворсинок энтероцитов. Микроворсинки представляют собой тонкие (0,1 мкм) и длинные (около 1 мкм) выросты,

тесно расположенные друг около друга, напоподобие густой щетки, покрывающей всю поверхность клетки, смотрящую в просвет кишечника. На каждой клетке кишечного эпителия насчитывается несколько тысяч микроворсинок, которые увеличивают всасывающую поверхность в десятки раз. Внутри каждой микроворсинки располагается плотный пучок из 20–30 актиновых микрофиламентов. Актиновые нити закреплены своими (+)-концами в вершине микроворсинки. Жесткость всего пучка определяется рядом белков, связывающих актин поперечными связками, **фимбрином** и **фасцином** (рис. 20.11). Нижняя часть актинового пучка вплетена в сеть из молекул спектрина, примембранного белка. Такая фибриллярная арматура делает тонкие микроворсинки жесткими и прочными. В этом проявляется каркасная, скелетная роль микрофиламентов. Но оказалось, что в составе микроворсинок обнаруживается также миозин, относящийся к миозину I, содержащему только одну головку и короткий хвост, которым он связан с плазматической мембраной. Головки миозина I связываются с актиновыми филаментами и могут вызывать укорачивание или удлинение микроворсинок по принципу скользящих нитей.

Миозин I также вовлекается в транспорт вакуолей. Например, в клетках кишечного эпителия миозин I связан с некоторыми везикулами аппарата Гольджи. С везикулами аппарата Гольджи в клетках мозга позвоночных связан миозин V типа.

Наиболее широко представлен в актомиозиновых комплексах миозин II типа. Так он входит в состав пучков МФ как в ведущем крае фибробластов, так и в пучках МФ в теле клетки. Считается, что сокращение этих комплексов приводит к подтягиванию клетки вперед (рис. 20.12). Актиновые пучки в комплексе с миозином II особенно хорошо выявляются в

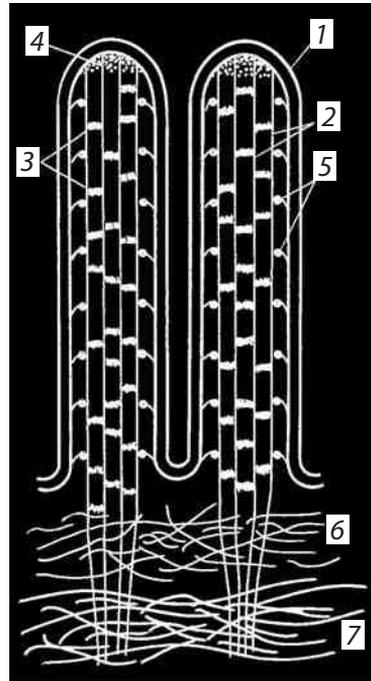


Рис. 20.11. Строение микроворсинок:

1 — плазматическая мембрана; 2 — актиновые микрофиламенты; 3 — белки, связывающие актин в пучки (фимбрин, фасцин); 4 — аморфная «шапочка»; 5 — латеральные ручки, минимиозин; 6 — спектриновая терминальная сеть; 7 — слой промежуточных филаментов

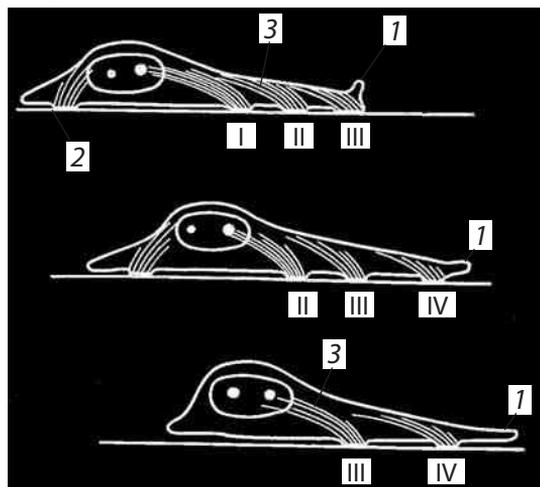


Рис. 20.12. Перемещение фибробласта по субстрату:

1 — ламеллоподии; 2 — фокальный контакт; 3 — пучок микрофиламентов

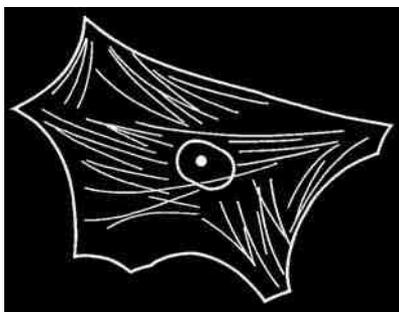


Рис. 20.13. Стресс-фибриллы фибробласта

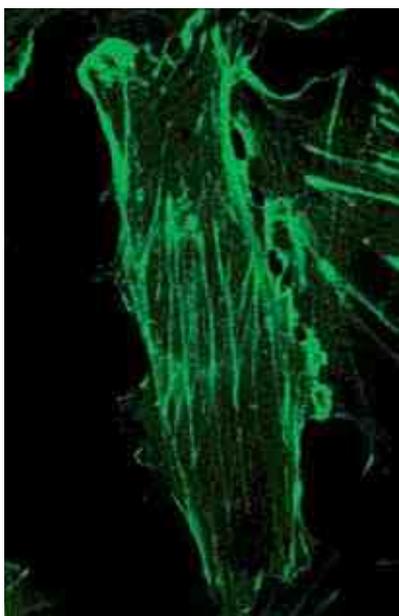


Рис. 20.14. Стресс-фибриллы, окрашенные антителами к актину в клетке культуры ткани (фото Буракова А.В.)

остановившихся фибробластах, где они исполняют совсем другую роль. Эти фибриллярные пучки (они носят название напряженных нитей, или *стресс-фибрилл*) тоже содержат все компоненты мышечных тканей (рис. 20.13, 20.14). Они крепятся с помощью фокальных контактов на плазматической мембране и при сокращении их вызывают вне клетки натяжение на фибриллах матрикса (коллагеновые волокна), что, вероятно, способствует ориентированной полимеризации компонентов внеклеточного матрикса. Это доказывается тем, что если фибробласты посадить на тонкие пленочные подложки, то после образования стресс-фибрилл пленка около клеток начинает морщиться, собираться в складки.

Другие примеры связи актиновых микрофиламентов с плазматической мембраной были приведены при описании клеточных контактов, таких как адгезионный поясок в клетках кишечного эпителия и фокальный контакт фибробластов. Адгезивный поясок контактирует с циркулярным пучком микрофиламентов, в составе которых кроме актина есть и миозиновые молекулы. При акте сокращения этот циркулярный периферический пучок может сжимать клетку, изменять ее форму.

Во время митоза в нормальных условиях клетки животных делятся путем образования перетяжки или борозды деления. Это происходит вследствие того, что в делящейся клетке в ее кортикальном слое образуется скопление параллельно идущих актиновых фибрилл,

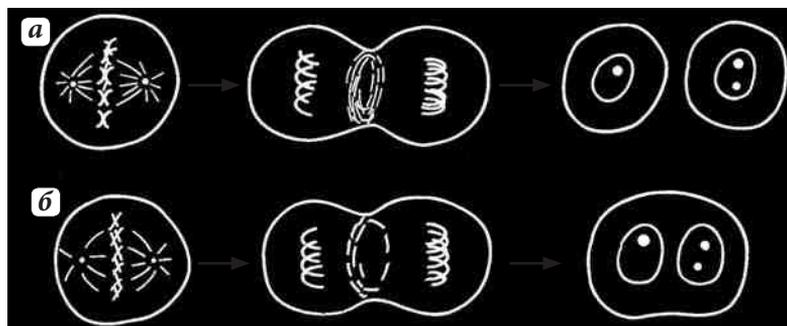


Рис. 20.15. Разделение тела (цитотомия) клетки с помощью кольцевого пучка микрофиламентов (а) и блокада этого процесса с помощью цитохалазина (б)

образующих под плазмалеммой сократимое кольцо. В состав кольца кроме актина входит миозин II и другие мышечные белки; сокращение кольца приводит к возникновению перетяжки на исходной клетке, что, в конце концов, приводит к делению клетки надвое (рис. 20.15).

Цитохалазин — ингибитор полимеризации актина — вызывает деполимеризацию актина в сократимом кольце, цитотомии не происходит, и в результате возникает двудерная клетка, т.к. при этом расхождение хромосом не нарушается.

Актиновые микрофиламенты являются одним из динамичных элементов цитоскелета, который подвержен быстрым перестройкам, особенно в движущихся клетках.

### 3. Мышечные клетки

Специализированные мышечные клетки многоклеточных животных организмов имеют в цитоплазме сократимые фибриллы, миофибриллы. Особенно много миофибрилл в скелетных мышечных клетках и клетках сердечной мышцы, в гладкомышечных клетках. Скелетные мышцы состоят не из отдельных клеток, а из мышечных волокон, симпластов, образовавшихся за счет слияния мышечных клеток — миобластов. В скелетной и сердечной мускулатуре миофибриллы имеют характерную особенность — они выглядят исчерченными или поперечнополосатыми (отсюда и название — поперечнополосатая мышечная ткань) (рис. 20.16, 20.17). В световой микроскоп видно, что пучки миофибрилл окрашиваются неравномерно: через равные промежутки длины в них видно чередование темных и светлых участков. Темные участки называются анизотропными дисками (А-дисками), а светлые — изотропными (I-диски). Светлый I-диск пересекается поперечной Z. Таким образом, миофибрилла представляет собой нить (толщиной 1–2 мкм) с чередующимися участками:

$A + 1/2 I + Z + 1/2 I + A + 1/2 I \dots$  и т.д.

Оказалось, что единицей строения и функционирования является **саркомер** — участок между двумя Z-дисками. Величина саркомеров в расслабленном состоянии всегда одинакова (1,8–2,8 мкм в зависимости от вида животных). Подробности строения саркомера были получены только при изучении миофибрилл в электронном микроскопе. Оказалось, что миофибрилла подразделяется на ряд более тонких — протофибрилл. Их диаметр в разных частях саркомера различный. В I-дисках встречаются

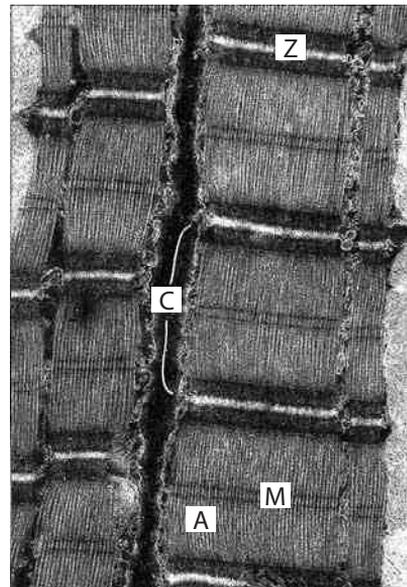
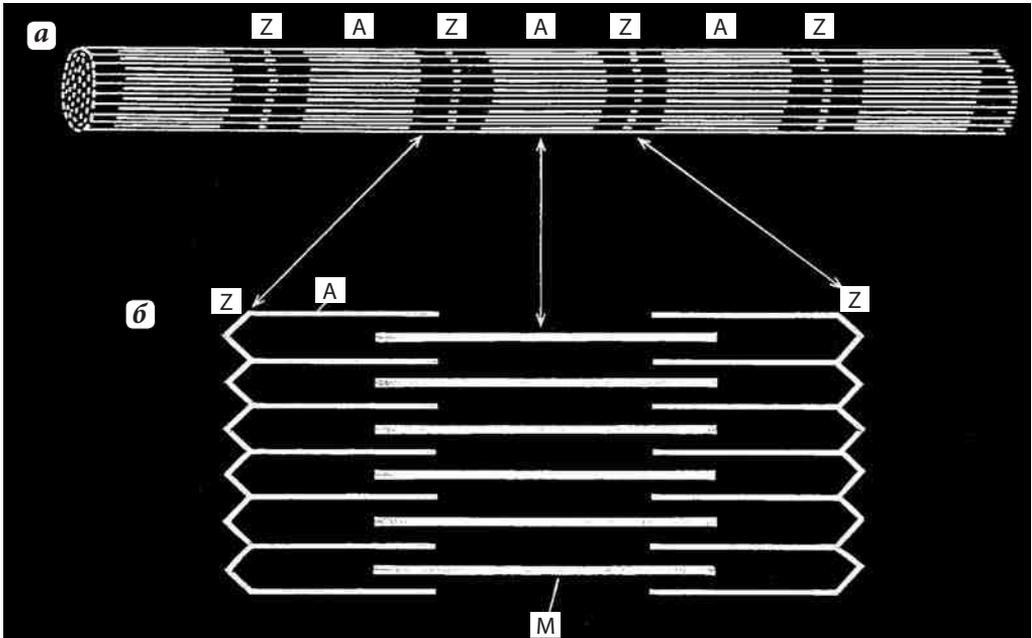


Рис. 20.16. Миофибриллы в кардиомиоцитах крысы:

C — саркомер; Z — Z-полоска; A — анизотропный диск; M — M-полоска (фото Липиной Т.В.)



**Рис. 20.17.** Строение миофибрилл поперечнополосатой мышечной ткани:

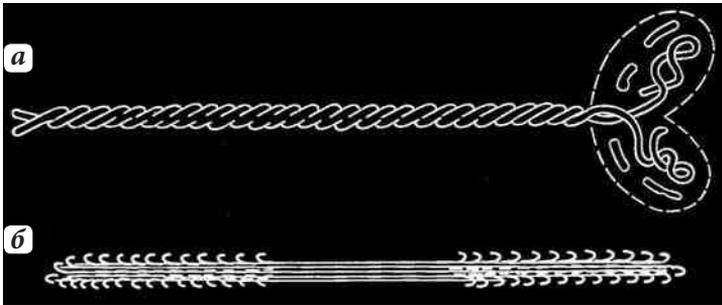
**а** — строение одиночной миофибриллы: А — анизотропный диск, z — z-диск;

**б** — схема строения саркомера: А — актиновые (тонкие) протофибриллы; М — миозиновые (толстые) протофибриллы, z — диск, содержащий  $\alpha$ -актинин

тонкие (около 8 нм) нити длиной около 1 мкм, а в А-дисках кроме тонких присутствуют толстые (около 16 нм толщиной) нити длиной до 1,5 мкм. Все эти нити, протофибриллы, располагаются параллельно друг другу и в друг друга не переходят. Если рассматривать строение саркомера более подробно, то видно, что вдоль него располагаются три участка протофибрилл: тонкие, связанные с Z-диск, затем толстые и снова тонкие, связанные со следующим Z-диск (см. рис. 20.17). В зоне А-дисков кроме толстых фибрилл располагаются концы тонких, идущих от двух Z-дисков.

Была выяснена химическая природа всех компонентов миофибрилл. Оказалось, что тонкие нити состоят в основном из белка актина, а толстые — из белка миозина II. Z-диски имеют в своем составе белок  $\alpha$ -актинин и десмин. В тонких нитях кроме актина находятся белки тропомиозин и тропонин.

Миозин, входящий в состав толстых нитей, — очень крупный белок (мол. вес 500 тыс.), состоящий из шести цепей: двух длинных, спирально обвивающихся одна вокруг другой (тяжелые цепи), и четырех коротких (легкие цепи), которые связываются с глобулярными головками длинных цепей. Последние обладают АТФ-азной активностью, могут реагировать с фибриллярным актином, образуя актомиозиновый комплекс, способный к сокращению. Толщина миозиновых фибрилл связана с тем, что длинные (150 нм) молекулы миозина агрегируют так, что образуют пучки, в которые входит около 300 таких молекул. В миозиновых



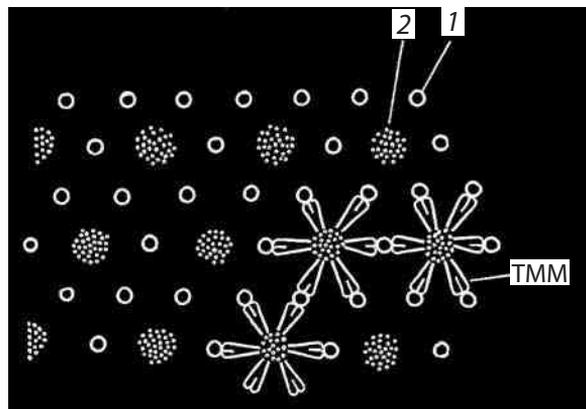
**Рис. 20.18.** Молекула миозина (а) и миозиновый протофиламент (б)

толстых (16 нм) протофибриллах длинные молекулы лежат «хвост к хвосту» так, что головки миозина располагаются на концах таких нитей, в средней их части головок нет (рис. 20.18). Головки образуют поперечные мостики, связывающие между собой актиновые и миозиновые нити.

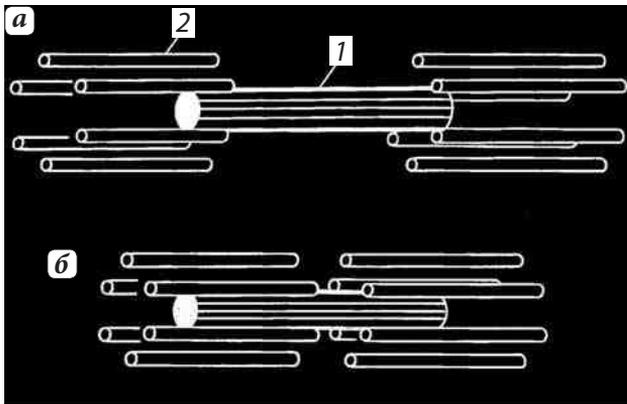
За счет такой связи головок миозина с актином возникают актомиозиновые комплексы, активность которых в сотни раз выше, чем АТФ-азная активность одних миозинов.

Актиновые протофибриллы связаны на одном конце с Z-дисксом, который состоит из палочковидных, биполярных молекул белка  $\alpha$ -актинина, который связывает актиновые фибриллы в пучки. С двух сторон к Z-дисксу прикрепляются (+)-концы актиновых нитей соседних саркомеров. Функция Z-дисксов заключается как бы в связывании соседних саркомеров друг с другом; Z-дисксы не являются сократимыми структурами.

Толстые, миозиновые, протофиламенты также связаны с Z-дисксом: концы толстых протофиламентов также закорены в Z-дисксе с помощью длинных и гибких фибриллярных белков — титинов. Миозиновые нити в поперечнике миофибриллы располагаются в гексагональном порядке, так, что каждая миозиновая нить окружается шестью актиновыми нитями (рис. 20.19). Вообще говоря, в мышце нет сокращающихся, уменьшающих свою длину молекул. Сокращение происходит за счет уменьшения расстояния между Z-дисксами, т.е. за счет уменьшения длины саркомеров примерно на 20%. Механизм мышечного сокращения заключается в кооперативном укорачивании всех саркомеров по всей длине миофибриллы. Г. Хаксли показал, что в основе сокращения лежит перемещение относительно друг друга тонких и толстых нитей. При этом толстые миозиновые нити как бы входят

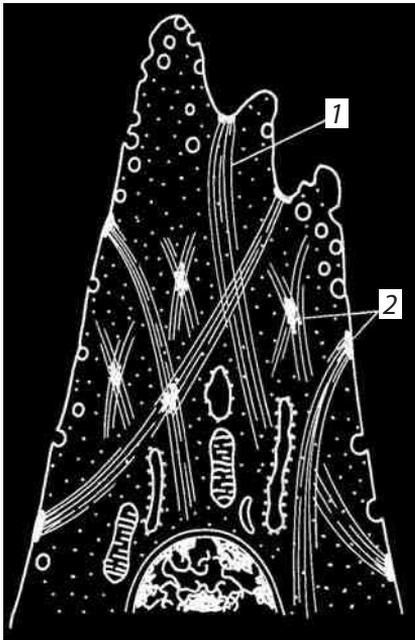


**Рис. 20.19.** Взаимное расположение актиновых (1) и миозиновых (2) молекул в анизотропной области саркомера: TMM — головки миозина



**Рис. 20.20.** Схема мышечного сокращения за счет взаимного скольжения нитей:

**а** — расслабление; **б** — сокращение; **1** — толстые нити (миозин); **2** — тонкие нити (актин)



**Рис. 20.21.** Схема строения гладкомышечной клетки:

**1** — акто-миозиновые пучки; **2** — плотные примембранные и цитоплазматические тельца

в пространства между актиновыми нитями, приближая друг к другу Z-диски. Эта модель *скользящих нитей* может объяснить не только сокращение поперечнополосатых мышц, но и любых сократимых структур (рис. 20.20).

В гладких мышечных клетках также имеются актиновые и миозиновые нити, но они не так правильно расположены, как в исчерченных мышцах. Здесь нет саркомеров, а среди пучков актиновых протофибрилл без особого порядка располагаются миозиновые молекулы, которые не образуют толстых агрегатов как в случае соматических мышц, а представляют собой комплексы из 15–20 миозиновых молекул (рис. 20.21).

# Глава 21

## Микротрубочки

### 1. Общая характеристика микротрубочек

Одним из обязательных компонентов цитоскелета эукариот являются *микротрубочки* (рис. 21.1). Это нитчатые неветвящиеся структуры, толщиной 25 нм, состоящие из белков-тубулинов и ассоциированных с ними белков. Тубулины микротрубочек при полимеризации образуют полые трубки, откуда и их название. Длина их может достигать нескольких мкм; самые длинные микротрубочки встречаются в составе аксонемы хвостов спермиев.

Микротрубочки встречаются в цитоплазме интерфазных клеток, где они располагаются поодиночке или небольшими рыхлыми пучками, или в виде плотноупакованных микротрубочек в составе центриолей, базальных телец и в ресничках и жгутиках. При делении клеток большая часть микротрубочек клетки входит в состав веретена деления.

В морфологическом отношении микротрубочки представляют собой длинные полые цилиндры с внешним диаметром 25 нм (рис. 21.2). Стенка микротрубочек состоит из полимеризованных молекул белка тубулина. При полимеризации молекулы тубулина образуют 13 продольных протофиламентов, которые скручиваются в полую трубку (рис. 21.3). Размер мономера тубулина составляет около 5 нм, равного толщине стенки микротрубочки, в поперечном сечении которой видны 13 глобулярных молекул.

Молекула тубулина представляет собой гетеродимер, состоящий из двух разных субъединиц, из  $\alpha$ -тубулина и  $\beta$ -тубулина, которые при ассоциации образуют собственно белок тубулин, изначально поляризованный. Обе субъединицы мономера тубулина связаны с ГТФ, однако на  $\alpha$ -субъединице ГТФ не подвергается гидролизу, в отличие от ГТФ на  $\beta$ -субъединице, где при полимеризации происходит гидролиз ГТФ до ГДФ. При полимеризации молекулы тубулина объединяются таким образом, что с  $\beta$ -субъединицей одного

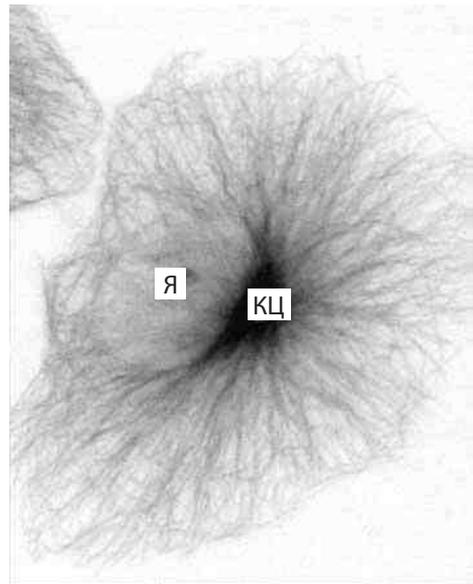
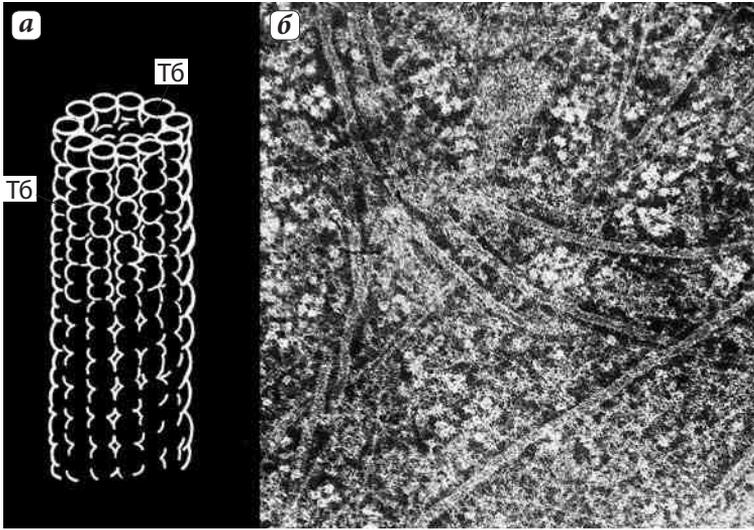


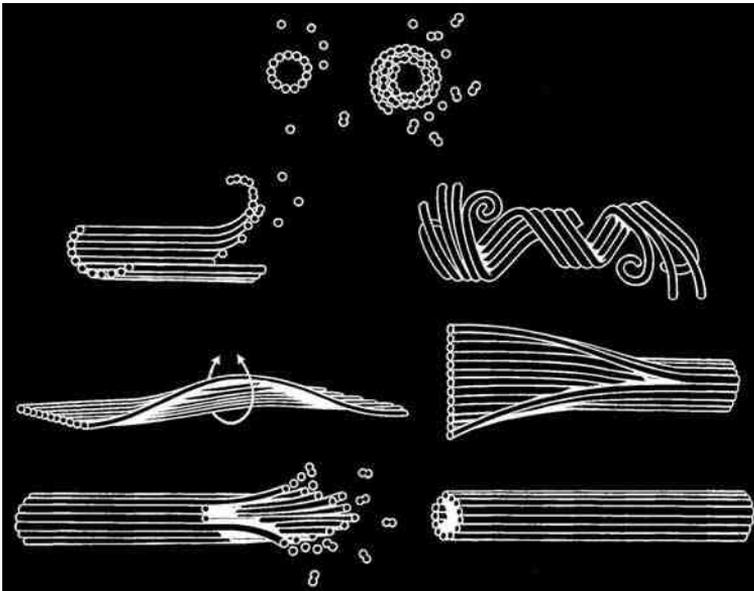
Рис. 21.1. Микротрубочки фибробласта, окрашенные антителами к тубулину:

Я — ядро; КЦ — клеточный центр (фото Буракова А.В.)



**Рис. 21.2.** Строение микротрубочек:

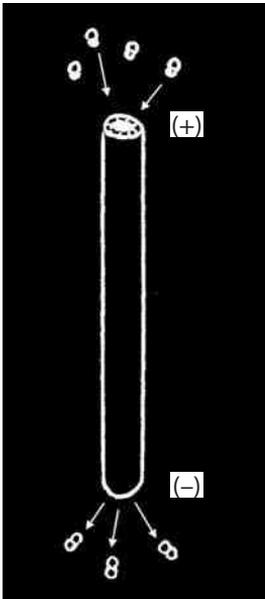
**а** — Тб-субъединица, димер тубулина в составе микротрубочки; **б** — микротрубочки в цитоплазме клетки



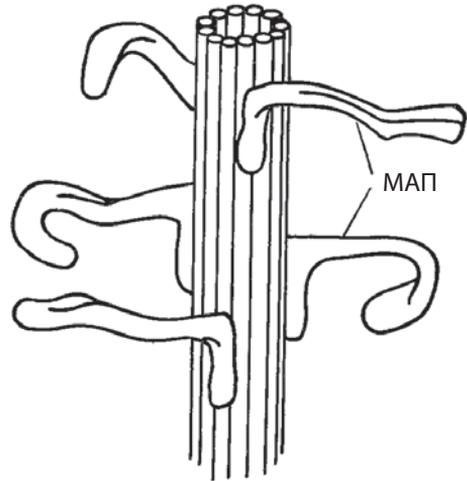
**Рис. 21.3.** Стадии самосборки микротрубочек

белка ассоциируется  $\alpha$ -субъединица следующего белка и т.д. Следовательно, отдельные протофибриллы возникают как полярные нити, и соответственно вся микротрубочка тоже является полярной структурой, имеющей быстро растущий (+)-конец и медленно растущий (-)-конец (рис. 21.4).

При достаточной концентрации белка полимеризация происходит спонтанно. При спонтанной полимеризации тубулинов происходит гидролиз одной молекулы ГТФ, связанной с  $\beta$ -тубулином. Во время наращивания длины микротрубочки связывание тубулинов происходит с большей скоростью на растущем (+)-конце. Но при недостаточной концентрации тубулина микротрубочки могут



**Рис. 21.4.** Полимеризация тубулинов. На плюс-конце микротрубочки происходит включение димеров тубулинов, связанных с ГТФ, на минус-конце преобладает диссоциация тубулинов



**Рис. 21.5.** Стабилизация микротрубочек с помощью МАП

разбираться с обоих концов. Разборке микротрубочек способствует понижение температуры и наличие ионов  $\text{Ca}^{2+}$ .

Существует ряд веществ, которые влияют на полимеризацию тубулина. Так, алкалоид колхицин, содержащийся в безвременнике осеннем (*Colchicum autumnale*), связывается с отдельными молекулами тубулина и предотвращает их полимеризацию. Это приводит к падению концентрации свободного тубулина, способного к полимеризации, что вызывает быструю разборку цитоплазматических микротрубочек и микротрубочек веретена деления. Таким же действием обладают колцемид и нокодозол, при отмывании которых происходит полное восстановление микротрубочек.

Стабилизирующим действием на микротрубочки обладает таксол, который способствует полимеризации тубулина даже при его низких концентрациях.

Все это показывает, что микротрубочки являются очень динамичными структурами, которые могут достаточно быстро возникать и разбираться.

В составе выделенных микротрубочек обнаруживаются ассоциированные с ними дополнительные белки, т.н. МАП-белки (МАП- microtubule associated proteins). Эти белки, стабилизируя микротрубочки, ускоряют процесс полимеризации тубулина (рис. 21.5).

В последнее время процесс сборки и разборки микротрубочек стали наблюдать в живых клетках. После введения в клетку меченных флуорохромами антител к тубулину и при использовании электронных систем усиления сигнала

в световом микроскопе, можно видеть, что в живой клетке микротрубочки растут, укорачиваются, исчезают, т.е. постоянно находятся в динамической нестабильности. Оказалось, что среднее время полужизни цитоплазматических микротрубочек составляет всего лишь 5 мин. Так за 15 мин около 80% всей популяции микротрубочек обновляется. При этом отдельные микротрубочки могут на растущем конце медленно (4–7 мкм/мин) удлиняться, а затем достаточно быстро (14–17 мкм/мин) укорачиваться. В живых клетках микротрубочки в составе веретена деления имеют время жизни около 15–20 с. Считается, что динамическая нестабильность цитоплазматических микротрубочек связана с задержкой гидролиза ГТФ, это приводит к тому, что на (+)-конце микротрубочки образуется зона, содержащая негидролизованые нуклеотиды («ГТФ-колпачок»). В этой зоне молекулы тубулина связываются с большим сродством друг к другу, и, следовательно, скорость роста микротрубочки возрастает. Наоборот, при потере этого участка, микротрубочки начинают укорачиваться.

Однако 10–20% микротрубочек остаются относительно стабильными достаточно долгое время (до нескольких часов). Такая стабилизация наблюдается в большой степени в дифференцированных клетках. Стабилизация микротрубочек связана или с модификацией тубулинов или с их связыванием с дополнительными (МАР) белками микротрубочек и с другими клеточными компонентами.

Сами микротрубочки не способны к сокращению, однако они являются обязательными компонентами многих движущихся клеточных структур, таких как реснички и жгутики, как веретено клетки во время митоза, как микротрубочки цитоплазмы, которые обязательны для целого ряда внутриклеточных транспортов, таких как экзоцитоз, движение митохондрий и др.

В целом же роль цитоплазматических микротрубочек может быть сведена к двум функциям: скелетной и двигательной. Скелетная, каркасная, роль заключается в том, что расположение микротрубочек в цитоплазме стабилизирует форму

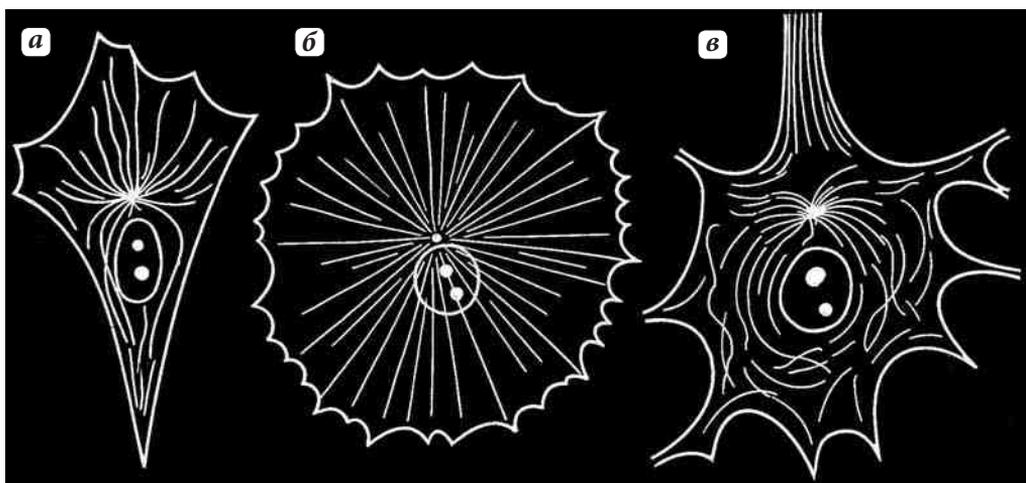


Рис. 21.6. Расположение микротрубочек в цитоплазме фибробласта (а), меланоцита (б), нейрона (в)

клетки; при растворении микротрубочек клетки, имевшие сложную форму, стремятся приобрести форму шара. Двигательная роль микротрубочек заключается не только в том, что они создают упорядоченную, векторную, систему движения. Микротрубочки цитоплазмы в ассоциации со специфическими ассоциированными моторными белками образуют АТФ-азные комплексы, способные приводить в движение клеточные компоненты.

Практически во всех эукариотических клетках в гиалоплазме можно видеть длинные неветвящиеся микротрубочки. В больших количествах они обнаруживаются в цитоплазматических отростках нервных клеток, в отростках меланоцитов, амёб и других изменяющих свою форму клетках (рис. 21.6). Они могут быть выделены сами или же можно выделить их образующие белки: это те же тубулины со всеми их свойствами.

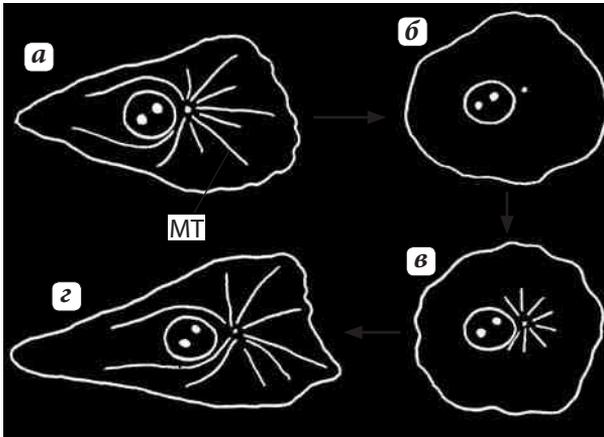
## 2. Центр организации микротрубочек

Рост микротрубочек цитоплазмы происходит полярно: наращивается (+)-конец микротрубочки. Так как время жизни микротрубочек очень коротко, то должно постоянно происходить образование новых микротрубочек. Процесс начала полимеризации тубулинов, **нуклеация**, происходит в четко ограниченных участках клетки, в т.н. **центрах организации микротрубочек** (ЦОМТ). В зонах ЦОМТ происходит закладка коротких микротрубочек, обращенных своими (-)-концами к ЦОМТ. Считается, что в зонах ЦОМТ (-)-концы заблокированы специальными белками, предотвращающими или ограничивающими деполимеризацию тубулинов. Поэтому при достаточном количестве свободного тубулина будет происходить наращивание длины микротрубочек, отходящих от ЦОМТ. В качестве ЦОМТ в клетках животных участвуют главным образом **клеточные центры**, содержащие **центриоли**, о чем будет сказано позже. Кроме того в качестве ЦОМТ может служить ядерная зона, и во время митоза полюса веретена деления.

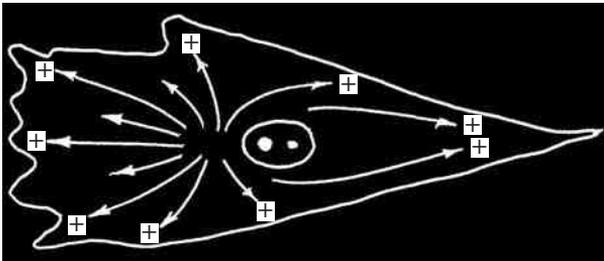
Наличие центров организации микротрубочек доказывается прямыми экспериментами. Так, если в живых клетках полностью деполимеризовать микротрубочки или с помощью колцемида или путем охлаждения клеток, то после снятия воздействия первые признаки микротрубочек будут появляться в виде радиально расходящихся лучей, отходящих от одного места (цитастер). Обычно у клеток животного происхождения цитастер возникает в зоне клеточного центра. После такой первичной нуклеации микротрубочки начинают отрастать от ЦОМТ и заполнять всю цитоплазму. Следовательно, растущие периферические концы микротрубочек будут всегда (+)-концами, а (-)-концы будут располагаться в зоне ЦОМТ (рис. 21.7, 21.8).

Цитоплазматические микротрубочки возникают и расходятся от одного клеточного центра, с которым многие теряют связь, могут быстро разбираться, или, наоборот, могут стабилизироваться при ассоциации с дополнительными белками.

Действие колхицина, вызывающего деполимеризацию тубулинов, сильно меняет форму клетки. Так, если отросчатую и плоскую клетку в культуре фибробластов



**Рис. 21.7.** Динамика восстановления микротрубочек (МТ): **а** — исходный фибробласт; **б** — исчезновение МТ после охлаждения клетки; **в** — появление первых микротрубочек в виде цитастера в зоне клеточного центра; **г** — восстановление цитоплазматических микротрубочек



**Рис. 21.8.** Полярность в расположении микротрубочек в цитоплазме: все плюс-концы МТ направлены от центра к периферии клетки

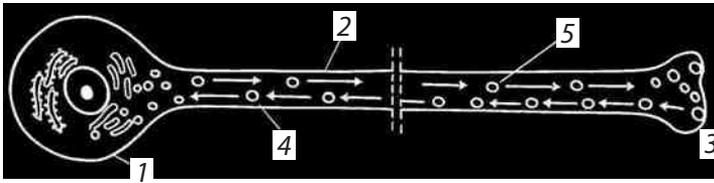
веществ и для перемещения крупных структур. Так, в случае меланофоров (клетки, содержащие пигмент меланин) при росте клеточных отростков гранулы пигмента передвигаются вдоль пучков микротрубочек. Разрушение микротрубочек колхицином приводит к нарушению транспорта веществ в аксонах нервных клеток, к прекращению экзоцитоза и блокаде секреции. При разрушении микротрубочек цитоплазмы вакуолей происходит фрагментация и разбегание по цитоплазме аппарата Гольджи, разрушение митохондриального ретикулула.

### 3. Динеины и кинезины — моторные белки

Долгое время считалось, что участие микротрубочек в движении цитоплазматических компонентов заключается лишь в том, что они создают систему упорядоченного движения. Вопрос был решен при изучении т.н. аксонального транспорта в гигантских нейронах кальмара. Аксоны, отростки нервных клеток, могут иметь

обработать колхицином, то она теряет полярность. Точно таким же образом ведут себя другие клетки: колхицин прекращает рост клеток хрусталика, отростков нервных клеток, образование мышечных трубок и т.д. Так как при этом не исчезают элементарные формы присущего клеткам движения, такие, как пиноцитоз, ундулирующие движения мембран, образование мелких псевдоподий, то роль микротрубочек заключается в образовании каркаса для поддержания клеточного тела, для стабилизации и укрепления клеточных выростов. Кроме того, микротрубочки участвуют в процессах роста клеток.

Создавая такой внутриклеточный скелет, микротрубочки могут быть факторами ориентированного движения внутриклеточных компонентов, задавать своим расположением пространства для направленных потоков разных



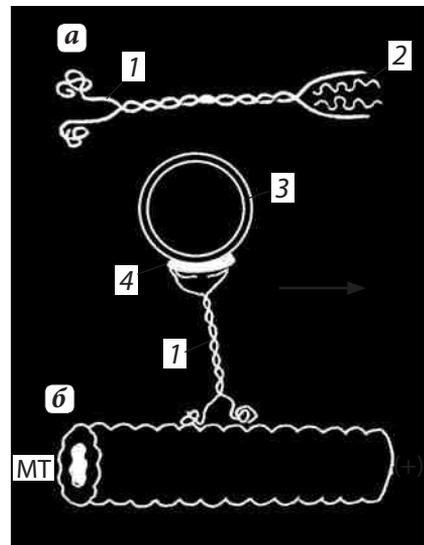
**Рис. 21.9.** Схема движения частиц в аксоне:

1 — тело нейрона; 2 — аксон; 3 — нервное окончание; 4 — ретроградный транспорт; 5 — антероградный транспорт

большую длину и заполнены большим числом микротрубочек и нейрофиламентов. В аксонах живых нервных клеток можно наблюдать перемещение различных мелких вакуолей и гранул, которые двигаются как от тела клетки к нервному окончанию (антероградный транспорт), так и в противоположном направлении (ретроградный транспорт). Эти движения происходят с относительно высокой скоростью: от тела нейрона — 400 мм в сутки, в направлении к нейрону — 200–300 мм в сутки (рис. 21.9).

Оказалось, что из отрезка гигантского аксона кальмара можно выделить аксоплазму, содержащую аксона. В капле выделенной аксоплазмы продолжается движение мелких вакуолей и гранул. С помощью видеоконтрастного устройства можно видеть, что движение мелких пузырьков происходит вдоль тонких нитчатых структур, вдоль микротрубочек. Из этих препаратов были выделены белки, ответственные за движение вакуолей. Один из них **кинезин**, белок с молекулярным весом около 300 тыс. Он состоит из двух сходных тяжелых полипептидных цепей и нескольких легких. Каждая тяжелая цепь образует глобулярную головку, которая при ассоциации с микротрубочкой обладает АТФ-азной активностью, в то время как легкие цепи связываются с мембраной пузырьков или других частиц (рис. 21.10). При гидролизе АТФ изменяется конформация молекулы кинезина и генерируется перемещение частицы в направлении к (+)-концу микротрубочки.

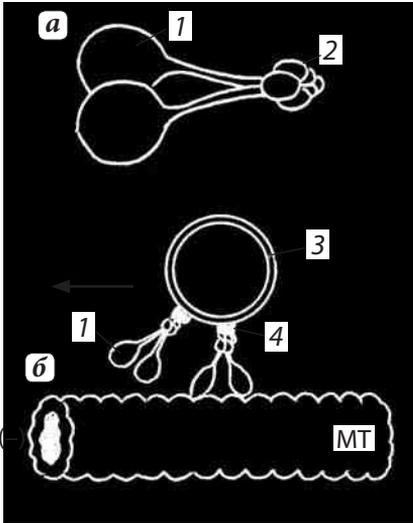
Существует целое семейство кинезинов, обладающих сходными моторными головками, но отличающихся хвостовыми доменами. Так, цитозольные кинезины участвуют в транспорте по микротрубочкам везикул, лизосом и других мембранных органелл. Многие из кинезинов связываются специфически со своими грузами. Так некоторые участвуют в переносе только митохондрий, другие — только синаптических пузырьков. Кинезины связываются с мембранами через мембранные белковые комплексы — кинектины. Кинезины веретена деления участвуют в образовании этой структуры и в расхождении хромосом.



**Рис. 21.10.** Внутриклеточное перемещение вакуоли с помощью кинезина в направлении к плюсу-концу микротрубочки (MT):

**а** — молекула кинезина: 1 — тяжелые цепи; 2 — легкие цепи.

**б** — участие кинезина в транспорте: 1 — кинезин; 3 — мембранный груз; 4 — кинектин



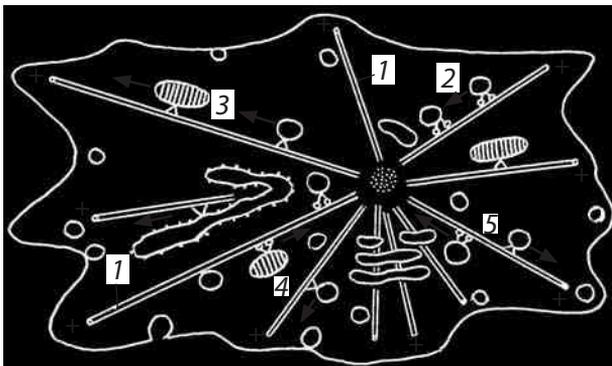
**Рис. 21.11.** Внутриклеточное перемещение вакуоли с помощью цитоплазматического динеина в минус-конце микротрубочки (MT):

**а** — молекула динеина: 1 — тяжелые цепи; 2 — легкие цепи.

**б** — участие динеина в транспорте: 1 — динеин; 3 — мембранный груз; 4 — динактин

триклеточного транспорта заключается в том, что образуется двойной комплекс (микротрубочка + движатель), обладающий высокой АТФ-азной активностью.

Как мы видим, микротрубочки образуют в клетке радиально расходящиеся поляризованные фибриллы, (+)-концы которых направлены от центра клетки к периферии. Наличие же (+) и (-)-направленных моторных белков (кинезинов и динеинов) создает возможность для переноса в клетке ее компонентов как от периферии к центру (эндоцитозные вакуоли, рециклизация вакуолей ЭПР и аппарата Гольджи и др.), так и от центра к периферии (вакуоли ЭПР, лизосомы, секреторные вакуоли и др.) (рис. 21.12). Такая полярность транспорта создается за счет организации системы микротрубочек, возникающих в центрах их организации, в клеточном центре.



**Рис. 21.12.** Ориентация движения внутриклеточных мембранных компонентов:

1 — микротрубочки; 2, 4 — движение к центру клетки, к минус-концам MT за счет динеинов; 3, 5 — движение к периферии клетки к плюс-концам MT за счет кинезинов

За ретроградный транспорт в аксоне отвечает другой белок — цитоплазматический **динеин** (рис. 21.11). Он состоит из двух тяжелых цепей — головок, взаимодействующих с микротрубочками, нескольких промежуточных и легких цепей, которые связываются с мембранными вакуолями. Цитоплазматический динеин является моторным белком, переносящим грузы к минус-концу микротрубочек. Динеины также делятся на два класса: цитозольные — участвующие в переносе вакуолей и хромосом, и аксонемные — отвечающие за движение ресничек и жгутиков.

Цитоплазматические динеины и кинезины были обнаружены практически во всех типах клеток животных и растений.

Таким образом, и в цитоплазме движение осуществляется по принципу скользящих нитей, только вдоль микротрубочек перемещаются не нити, а короткие молекулы — движатели, связанные с перемещаемыми клеточными компонентами. Сходство с актомиозиновым комплексом этой системы вну-

# Глава 22

## Клеточный центр

Итак, в клетках животных и одноклеточных микротрубочки поляризованы, так что большей частью их растущие (+)-концы направлены к периферии клетки. Это связано с тем, что МТ начинают свой рост от специальных участков в клетке, от центров организации микротрубочек (ЦОМТ), содержащих специальные образования — **центросомы**, которые большей частью могут иметь сложно организованные **центриоли**, или же не иметь их.

### 1. Центросомы и центриоли

Центросомы были обнаружены и описаны более ста лет назад (Флемминг, 1875; Бенеден, 1876) — это очень мелкие тельца, размер которых находится на границе разрешающей способности светового микроскопа, обычно располагаются в геометрическом центре клетки, откуда и их название. В некоторых объектах удавалось видеть, что мелкие плотные тельца (**центриоли**), обычно в паре (диплосома), окружены зоной более светлой цитоплазмы (собственно центросома), от которой отходят радиально тонкие фибриллы (**центросфера**) (рис. 22.1).

Центросомы характерны и обязательны для клеток животных, и нет у высших растений, у низших грибов и некоторых простейших. Было замечено, что центросомы в делящихся клетках принимают участие в формировании веретена деления и располагаются на его полюсах. В интерфазе центросомы в качестве ЦОМТ участвуют в организации тубулинового цитоскелета. В неделящихся клетках центросомы часто определяют полярность клеток эпителия и располагаются вблизи аппарата Гольджи. Такая связь центросом с аппаратом Гольджи характерна для многих клеток, в том числе для клеток крови и нервных клеток.

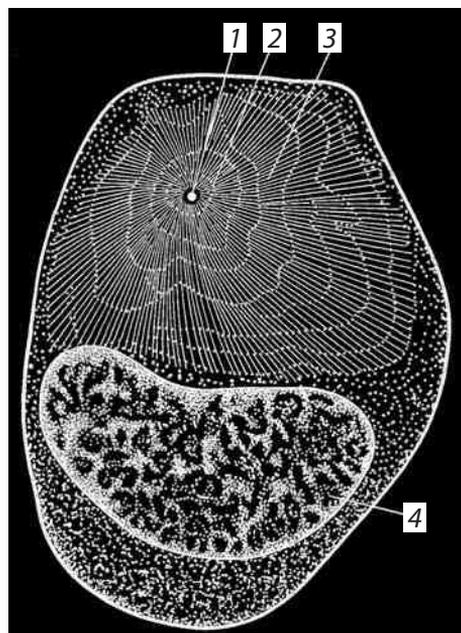


Рис. 22.1. Клеточный центр в сперматогонии саламандры:

1 — центриоль; 2 — окружающий центриоль участок светлой цитоплазмы; 3 — центросфера (астросфера); 4 — ядро (по Heidenhain, 1907)

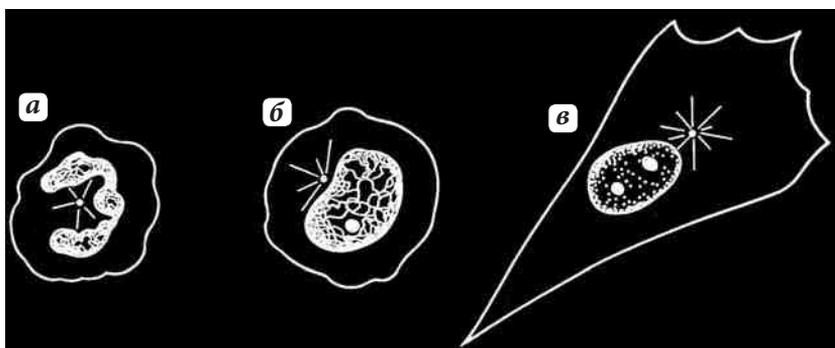


Рис. 22.2. Расположение centrosомы в различных клетках:

**а** — нейтрофил; **б** — лимфоцит; **в** — фибробласт

Часто centrosомы лежат рядом с ядром, располагаясь в зонах его впячивания. Например, в полиморфных лейкоцитах (нейтрофилы) centrosома лежит внутри подковоидного ядра (рис. 22.2).

Типичное строение **клеточный центр** имеет в клетках животных. Он представляет собой зону, состоящую из центриолей и окружающей их аморфной фибриллярной массы или **матрикса**.

В ряде случаев в состав клеточного центра или centrosомы входит только эта фибриллярная масса, от которой отходят микротрубочки.

Наиболее же часто кроме матрикса в состав клеточного центра входят **центриоли**, как мелкие тельца, с трудом наблюдаемые в световом микроскопе.

Тонкое строение центриолей удалось изучить только с помощью электронного микроскопа. Основу строения центриолей составляют расположенные по окружности девять триплетов микротрубочек, образующие таким образом полый цилиндр (рис. 22.3). Его ширина около 0,15 мкм, а длина такого цилиндра 0,3–0,5 мкм (рис. 22.4).

Первая микротрубочка триплета (А-микротрубочка) имеет диаметр около 25 нм и толщину стенки 5 нм, которая состоит из 13 глобулярных субъединиц. Длина каждого триплета равна длине центриоли. Вторая и третья (В и С) микротрубочки отличаются от А-микротрубочки тем, что они

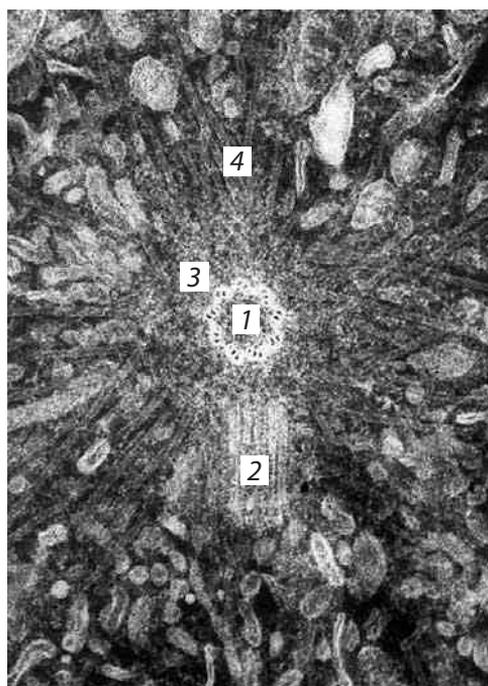
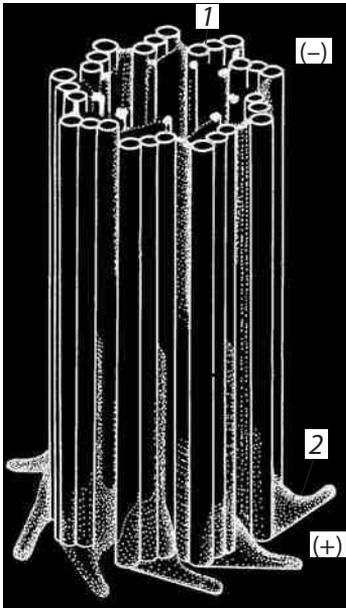


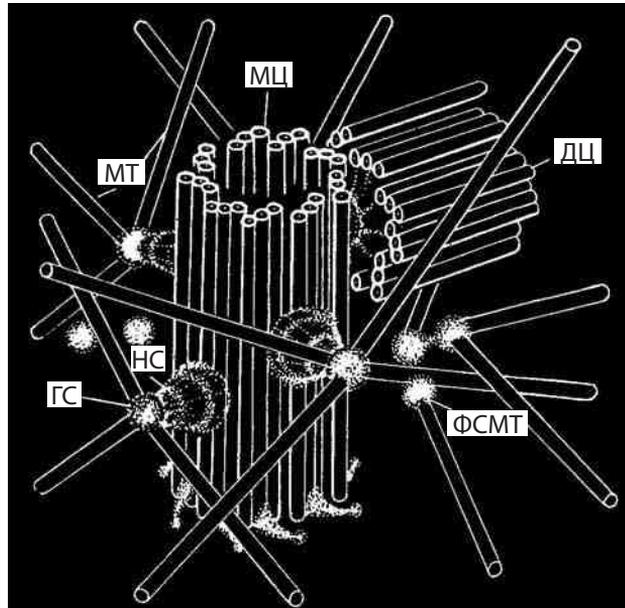
Рис. 22.3. Centrosома в клетке СПЭВ во время митоза. Видны триплеты микротрубочек на поперечном срезе центриоли:

1 — материнская центриоль; 2 — дочерняя центриоль; 3 — centrosомное гало; 4 — микротрубочки цитастера (фото И.А. Воробьева)



**Рис. 22.4.** Трехмерная модель центриольного цилиндра:

1 — триплет микротрубочек; 2 — придатки



**Рис. 22.5.** Схема строения диплосомы лейкоцита аксолотля:

МЦ — материнская центриоль; ДЦ — дочерние центриоли; НС — ножка сателлита; ГС — головка сателлита; ФСМТ — фокусы схождения микротрубочек; МТ — микротрубочки

являются неполными, содержат 11 субъединиц и вплотную примыкают к своим соседям. Кроме микротрубочек в состав центриоли входит ряд дополнительных структур. От А-микротрубочки отходят так называемые «ручки», выросты, один из которых (внешний) направлен к С-микротрубочке соседнего триплета, а другой (внутренний) — к центру цилиндра.

Обычно в интерфазных клетках всегда присутствуют две центриоли, располагающиеся рядом друг с другом, образуя дуплет центриолей, или **диплосому** (рис. 22.5). В диплосоме центриоли располагаются под прямым углом по отношению друг к другу. Из двух центриолей различают «материнскую» и «дочернюю», продольная ось последней перпендикулярна продольной оси материнской центриоли. Обе центриоли сближены своими концами так, что проксимальный конец дочерней центриоли как бы смотрит на поверхность материнской. В дистальном участке материнской центриоли располагается аморфный материал в виде выростов или шпор — это **придатки**. Их нет на дочерней центриоли (см. рис. 22.5).

Дочерняя центриоль несколько отличается от материнской. Центральная часть цилиндра центриоли занята структурой, напоминающей тележное колесо; она имеет центральную «втулку» диаметром около 25 нм и 9 спиц, направленных по одной к А-микротрубочке каждого из триплетов. Такие структуры внутри центриоли расположены в одном из ее концов, проксимальном, что делает строение цилиндра центриоли полярным. На дистальном конце центриоли внутри ее нет таких структур. Объем, занимаемый внутри центриоли втулкой со спицами, может составлять у разных клеток от 3/4 до 1/5 длины центриоли. У некоторых видов втулка

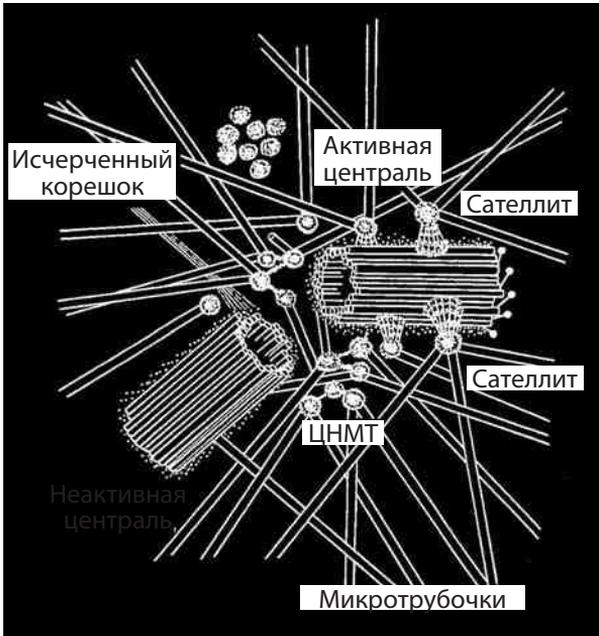


Рис. 22.6. Клеточный центр в клетках позвоночных в интерфазе (Воробьев И.А., Надеждина Е.С., 1987)

отсутствует или заменена скоплением аморфного материала. Торцы центриолярного цилиндра, кроме системы втулки и спиц на проксимальном конце, ничем не закрыты.

Систему микротрубочек центриоли обычно описывают формулой  $(9 \times 3) + 0$ , подчеркивая отсутствие микротрубочек в ее центральной части.

Вокруг каждой центриоли расположен бесструктурный, или тонковолокнистый матрикс. Все схемы центриолей в этой книге, как и во многих других, значительно упрощены и не включают материал муфты центриолярного цилиндра.

Часто около центриолей и в связи с ним можно обнару-

жить несколько дополнительных структур: сателлиты, фокусы схождения микротрубочек, исчерченные волокнистые корешки, дополнительные микротрубочки, образующие особую зону — центросферу вокруг центриоли (см. рис. 22.6).

При исследовании в электронном микроскопе интерфазных центриолей было найдено, что лучистое сияние центросферы, обнаруживаемое в световом микроскопе, представляет собой большое число микротрубочек, радиально расходящихся от зоны диплосомы. В диплосоте лишь одна из центриолей, материнская, содержит ряд дополнительных структур. Одни из них, *перицентриолярные сателлиты*, состоят из имеющей тонкое фибриллярное строение конусовидной ножки, расположенной на стенке центриоли, и головки, заканчивающейся на этой ножке. Ножки сателлитов часто имеют поперечную исчерченность (рис. 22.7). Количество таких перицентриолярных сателлитов непостоянно, они могут располагаться на разных уровнях по длине центриоли. Кроме этих структур рядом с диплосомой, но не связанные с ней структурно, могут располагаться плотные мелкие (20–40 нм) тельца, к которым подходят одна или несколько микротрубочек (*фокусы схождения микротрубочек*). Микротрубочки отходят и от головок сателлитов. Эти центросомные микротрубочки не отходят непосредственно от микротрубочек цилиндров центриолей, а связаны или с сателлитами, или с матриксом. Такие микротрубочки и образуют как бы лучистую сферу (центросферу) вокруг центриоли, где (-)-концы МТ связаны с ЦОМТ, а (+)-концы радиально расходятся на периферию клетки. При образовании центросферы в интерфазной клетке только специальные структуры центриоли, сателлиты и матрикс, каким-то образом связаны с

образованием микротрубочек; микротрубочки самих центриолей в этом процессе не участвуют. Было найдено, что восстановление прицентриолярных микротрубочек после их деполимеризации на холоду происходит за счет появления новых микротрубочек, отходящих от головок сателлитов.

Химия центриолей изучена недостаточно, потому что еще не разработаны методы получения этой структуры в виде чистой фракции. Трудности биохимического изучения центриолей связаны с тем, что это одиночная клеточная структура, имеющая объем всего  $0,03 \text{ мкм}^3$ . Для сравнения, вспомним, что в клетке имеется: около тысячи штук митохондрий, около миллиона рибосом, около сотни хромосом, около  $110\,000 \text{ мкм}^2$  мембран.

Сложное строение centrosомы отражает и ее сложную биохимическую композицию — centrosома является мультибелковым комплексом. В настоящее время охарактеризовано более сотни белков, ассоциированных с centrosомой. Хотя локализация этих белков и их функциональная нагрузка еще мало изучены. Так в составе centrosомы описаны 7 видов тубулинов. Три из них достаточно хорошо изучены:  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулины входят в состав триплетов центриолы,  $\gamma$ -тубулин локализуется в перичентриолярной зоне и служит затравками (зародышами) для полимеризации микротрубочек.

По функциональным нагрузкам выявляют несколько групп centrosомных белков: структурные белки, белки-моторы, белки-регуляторы (киназы и фосфатазы) и белки, связанные с нуклеацией и удержанием centrosомных микротрубочек.

В интерфазных клетках центриолы оказываются связаны с ядром и с ядерной мембраной. При выделении ядер практически все центриолы клеток печени и селезенки крыс оказываются в этой фракции. Связь центриолей с ядром осуществляется главным образом промежуточными филаментами. Если живые клетки подвергнуть ультрацентрифугированию, то центриолы опускаются к центробежному полюсу вместе с ядрами.

Многие белки centrosом (например, тектины, центрин, ценексин) участвуют в процессах удвоения и созревания центриолей, что обязательно для нормального прохождения митоза.

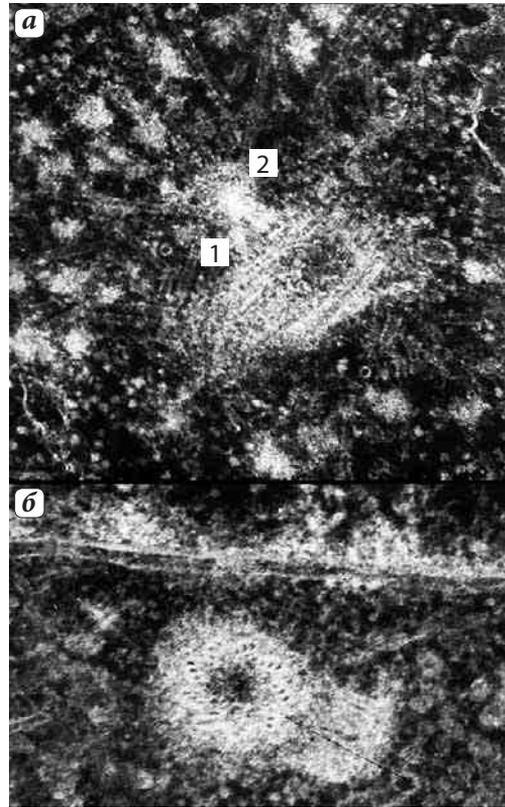


Рис. 22.7. Ультраструктура центриолы в интерфазе:

**а** — центриоль в G<sub>1</sub>-фазе; **б** — центриоль в S-фазе;

1 — сателлит; 2 — головка сателлита; 3 — МТ; 4 — процентриоль

## 2. Центросомный цикл

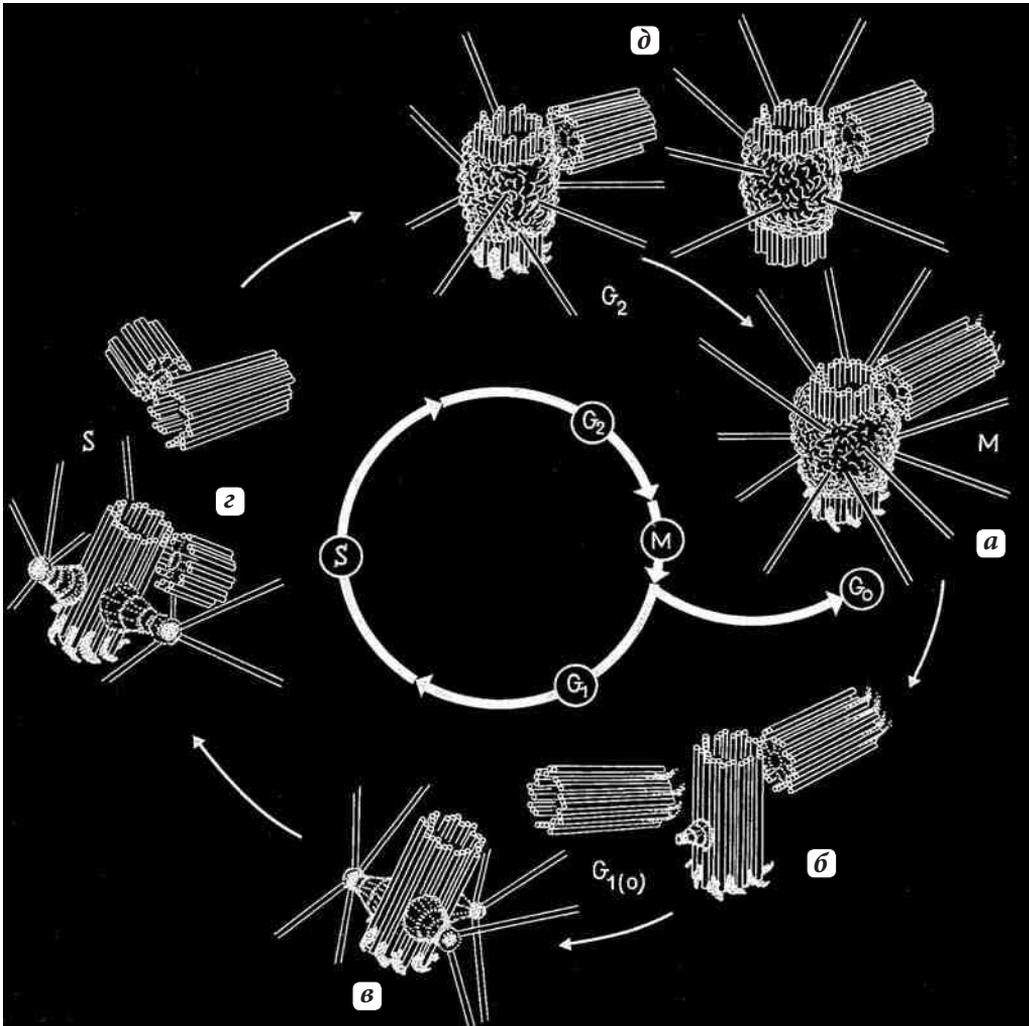
Было обнаружено, что строение и активность центросом меняются в зависимости от периода клеточного цикла, в течение которого клеточный центр претерпевает тоже циклические изменения (рис. 22.8).

Начиная с профазы и кончая телофазой, центросомы имеют сходное строение, несмотря на то, что за время митоза происходит ряд существенных клеточных перестроек: конденсация хромосом, разрушение ядерной оболочки, образование веретена деления, расхождение хромосом. В митозе в клеточных центрах (их два, по одному на каждый полюс клетки) находится по диплосоме. Как полагают, дочерняя центриоль своим концом направлена на материнскую. Материнская центриоль на всех стадиях митоза окружена довольно широкой (до 0,3 мкм) зоной тонких фибрилл — центриольное **фибрилярное гало** (см. рис. 22.3). От этого гало радиально отходят микротрубочки. Важно подчеркнуть, что у дочерних центриолей ни гало, ни отходящих от центриолей микротрубочек нет. В это время происходит формирование веретена митотического аппарата, состоящего из микротрубочек. Эта структура действительно имеет форму веретена, где на концах его на полюсах клетки располагаются диплосомы, окруженные радиальными микротрубочками (центросфера). В данном случае можно говорить о том, что зоны диплосом, клеточные центры, являются центрами организации (полимеризации) микротрубочек. Интересно, что рост новых микротрубочек не связан с микротрубочками триплетов центриольного цилиндра, они начинают отрастать от зоны гало, расположенной на материнской центриоли. Микротрубочки цитоплазмы разбираются, а пул освободившихся тубулиновых мономеров идет на образование микротрубочек веретена и центросферы, которые образуются на фибриллярном гало, как на ЦОМТ. Этот процесс полимеризации митотических микротрубочек отражает первую форму активности центриольного аппарата (см. рис. 22.8).

Примерно сходное строение имеют клеточные центры на всех стадиях митоза, но к телофазе толщина фибриллярного гало уменьшается.

К концу телофазы, когда произошло разделение клетки надвое, а хромосомы начали деконденсироваться и образовывать новые интерфазные ядра, происходит разрушение веретена деления, его микротрубочки деполимеризуются. Клеточные центры при этом меняют свою структуру. Материнская и дочерняя центриоли теряют взаимно перпендикулярное расположение и отходят друг от друга на небольшие (0,5–2 мкм) расстояния, но все же держатся в одном месте. Вокруг материнской центриоли гало и микротрубочки не выявляются. В это время микротрубочек в цитоплазме также практически нет.

В начале  $G_1$ -периода на поверхности материнской центриоли возникают сателлиты, имеющие ножку и головку, от которой радиально отходят микротрубочки, которые начинают расти в длину и заполнять собой цитоплазму (см. рис. 22.7a). Следовательно, вторая форма активности клеточного центра — образование цитоплазматических микротрубочек в интерфазных клетках. Надо подчеркнуть, что



**Рис. 22.8.** Центросомный цикл:

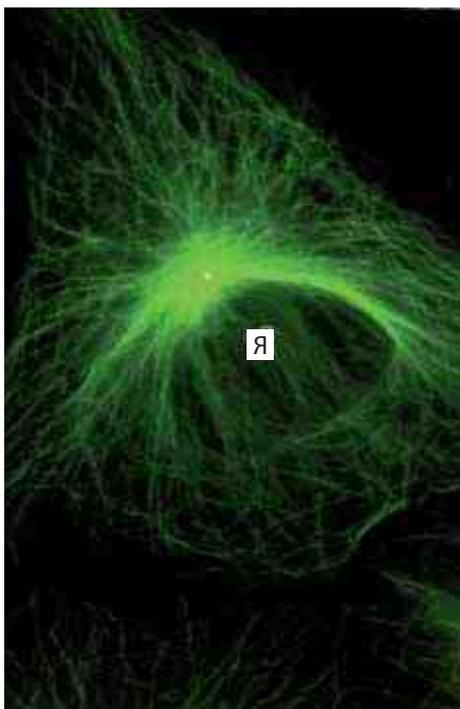
**а** — диплосома во время митоза; **б** — центриоль в начале G<sub>1</sub>-периода; **в** — центриоль в G<sub>1</sub>-периоде; **з** — центриоли в S-периоде, удвоение центриолей; **д** — центриоли в G<sub>2</sub>-периоде

активной здесь является только материнская центриоль, которую легко узнать по придаткам в ее дистальной части.

По мере роста микротрубочек часть из них теряет связь с областью центриолей и может находиться в цитоплазме долгое время. Центросомы же индуцируют полимеризацию новых микротрубочек, которые приходят на смену постепенно деполимеризующимся старым. Вероятно, в цитоплазме есть несколько генераций микротрубочек: «старые», не связанные с клеточным центром, и новые, растущие от центросом. Таким образом, в клетке происходит как бы конвейерная смена и репродукция цитоплазматических микротрубочек.

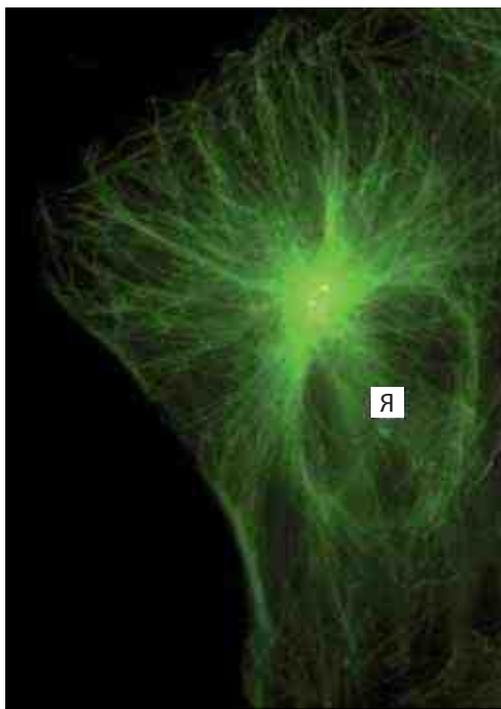
Если клеткам запретить переходить в S-период, они могут существовать в фазе клеточного покоя (G<sub>0</sub>-период). В это время материнская центриоль продолжает функционировать, как центр образования микротрубочек цитоскелета. Но одновременно она может проявить еще одну форму активности — образовать *ресничку*, вырост плазматической мембраны, заполненный аксонемой (осевой нитью), состоящей из девяти дублетов микротрубочек. Эти микротрубочки отрастают, как от затравок, от А- и В-микротрубочек триплетов материнской центриоли в дистальной ее части. Это — третья форма активности центриолей как центров организации микротрубочек (см. ниже).

При наступлении S-периода (или в середине его) клеточный центр приступает к четвертой форме своей активности: происходит удвоение числа центриолей. В это время около каждой из разошедшихся еще в конце телофазы центриолей, материнской и дочерней, происходит закладка новых центриольярных цилиндров — *процентриолей* (рис. 22.7б, 22.8г, 22.9, 22.10). В районе проксимальных концов каждой центриоли перпендикулярно длинной оси закладывается сначала девять синглетов (одиночных) микротрубочек, затем они преобразуются в девять дуплетов, а потом — в девять триплетов растущих микротрубочек новых центриольярных цилиндров.



**Рис. 22.9.** Сеть микротрубочек, окрашенная мечеными антителами к тубулину в клетке культуры ткани в G<sub>1</sub>-периоде.

В клеточном центре желтым окрашена центриоль, связанная с антителами к  $\gamma$ -тубулину. Я — ядро



**Рис. 22.10.** То же. Клетка в S–G<sub>2</sub> периоде, видны две реплицированные центриоли (фото А.В. Буракова)

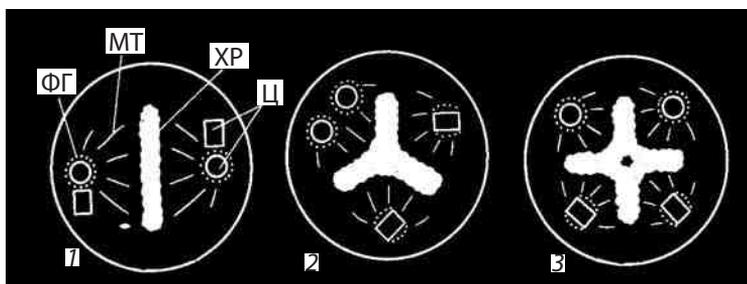
Благодаря такому росту структур образуется сначала короткая дочерняя центриоль — процентриоль — которая затем дорастает до размера материнской. Этот способ увеличения числа центриолей был назван *дупликацией*. Важно отметить, что размножение центриолей не связано с их делением, почкованием или фрагментацией, а происходит путем образования зачатка, процентриоли, вблизи и перпендикулярно к исходной центриоли. Факт удвоения центриолей привел некоторых исследователей к предположению, что центриоли, так же как митохондрии и пластиды, принадлежат к саморедуплицирующимся компонентам цитоплазмы, хотя прямых данных о наличии ДНК в составе центриолей нет. В S-периоде во время удвоения (дупликации) центриолей материнская продолжает быть центром образования цитоплазматических микротрубочек.

В результате процесса дупликации около каждой центриоли вырастает новая дочерняя центриоль (первая материнская центриоль и дочерняя на бывшей дочерней центриоли могут считаться как бы «бабушкой» и «внучкой»). Поэтому в клетке после завершения S-периода находятся уже две диплосомы (а всего четыре центриольярных цилиндра) (см. рис. 22.8д).

После этого наступает следующий период клеточного цикла, постсинтетический ( $G_2$ -период), когда в клетке начинается подготовка к очередному делению. В это время исчезают сателлиты на материнской диплосоме (так можно назвать старую материнскую центриоль с новой дочерней), а обе материнские центриоли в обеих диплосомах покрываются фибриллярным гало, от которого в профазе начинают отрастать митотические микротрубочки. Параллельно этому в цитоплазме происходит исчезновение микротрубочек, и клетка стремится приобрести шаровидную форму. Вся такая последовательность событий повторяется от цикла к циклу у клеток, способных к длительному размножению. В большинстве случаев клетки организма находятся в  $G_0$ -периоде, поэтому у них центриоль участвует в полимеризации цитоплазматических микротрубочек и в образовании реснички (или множества ресничек). В последнем случае она входит в состав так называемого базального тельца.

Обычно в клетку после деления попадают два центриольярных цилиндра в составе диплосомы. В различных экспериментальных условиях можно запретить разделение клетки надвое и получить клетки с удвоенным числом хромосом (полиплоидные клетки). Совершенно очевидно, что в таких клетках будет и удвоенное число центриолей. Клетки могут снова вступать в клеточный цикл, при этом будет удваиваться как количество ДНК, так и число центриолей. У нормальных тетраплоидных (с четырехкратным набором хромосом) клеток печени в  $G_0$ -периоде в цитоплазме видны не два, а четыре центриольярных цилиндра, а в полюсах при делении таких клеток было обнаружено по две диплосомы в каждом. Аналогичная ситуация замечена и у других полиплоидных клеток (мегакариоциты костного мозга, полиплоидные гибридные клетки и др.). В связи с этим предположили, что между числом плоидности клетки (числом хромосомных наборов) и числом центриолей существует прямая связь.

Нарушения центриольярного цикла могут вызвать ряд патологических изменений клеток, в первую очередь появление многополюсных митозов. Так, при



**Рис. 22.11.** Патологические многополюсные митозы:

1 — нормальный митоз; 2 — трехполюсный митоз; 3 — четырехполюсный митоз; фг — фибриллярное гало; Ц — центриоль; мт — микротрубочка; хр — хромосомы

действии  $\beta$ -меркаптоэтанола происходит блокада нормального митоза, при этом диплосомы расходятся на отдельные центриоли. При отмывании от этого вещества клетка снова приступает к делению, но в этом случае каждая центриоль активируется и образует полюс веретена. Таким образом, возникают трех- или четырехполюсные митозы, приводящие к неравномерному распределению хромосом между дочерними клетками. Это в свою очередь приводит к изменению числа хромосом (анэуплоидия), которое часто вызывает гибель клетки. Иногда при образовании многополюсных митозов в некоторых полюсах отсутствуют центриоли: в полюсе располагается только фибриллярный материал центросомы (бесцентриолярные полюса). Сходные картины появления многополюсных митозов встречаются при различных патологических процессах, связанных с размножением клеток, но особенно часто в опухолях, где анэуплоидия ядер очень характерна (рис. 22.11).

Итак, в жизнедеятельности клеток центросомы выступают как центры организации микротрубочек, участвующих во внутриклеточных перемещениях органелл и в движении самих клеток. Центросомы играют ведущую роль в образовании веретена клеточного деления. Правда, в некоторых случаях деление клеток млекопитающих может происходить при участии только фибриллярного компонента центросомы (см. ниже). Наконец, центросомы участвуют в образовании локомоторных аппаратов некоторых клеток — ресничек и жгутиков, когда микротрубочки самих центриолей служат затравками для полимеризации тубулинов при росте аксонемы реснички, когда центриоль становится базальным тельцем.

### 3. Базальные тельца. Строение и движение ресничек и жгутиков

Как уже указывалось, у многих клеток, вышедших из клеточного цикла, в  $G_0$ -стадии центриоли принимают участие в образовании аппарата движения — ресничек. Их две группы: **кинетоцилии**, подвижные реснички, характерные для специальных эпителиев (ресничные эпителии трахеи, яйцеводов)

или свободно плавающих клеток (сперматозоиды, простейшие), и так называемые **первичные реснички**, встречающиеся во многих клетках, не обладающих способностью к движению.

Кинетоцилии в световом микроскопе видны как тонкие выросты клетки, в их основании в цитоплазме видны хорошо красящиеся мелкие гранулы — **базальные тельца**, аналоги центриолей (рис. 22.12).

У многоресничных клеток (клетки ресничного эпителия трахеи могут содержать около 300 ресничек) движение ресничек не хаотично, а строго упорядочено. В этом случае реснички расположены рядами. В продольном ряду отдельные реснички начинают движение и проходят отдельные его фазы по очереди, метасинхронно. В поперечном же ряду все реснички находятся в одной фазе движения (синхронны). Это создает движущую волну по поверхности клетки (рис. 22.13, 22.14).

При движении ресничек и жгутиков не происходит уменьшения их длины, поэтому неправильно называть это движение сокращением. Траектория движения ресничек очень разнообразна (рис. 22.15). В различных клетках это движение может быть маятникообразным, крючкообразным, воронкообразным или волнообразным.

Общая архитектура реснички представлена на рис. 22.16, 22.17. Ресничка представляет собой тонкий цилиндрический вырост цитоплазмы с постоянным диаметром 300 нм. Этот вырост от основания

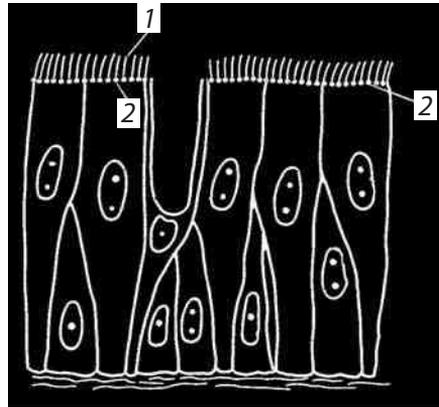


Рис. 22.12. Многорядный мерцательный эпителий трахеи:

1 — реснички; 2 — базальные тельца



Рис. 22.13. Волны, пробегающие по поверхности мерцательного эпителия, покрытого ресничками

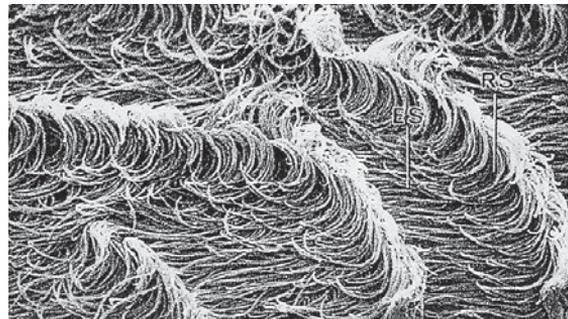


Рис. 22.14. Волны движения ресничек (сканирующий электронный микроскоп)

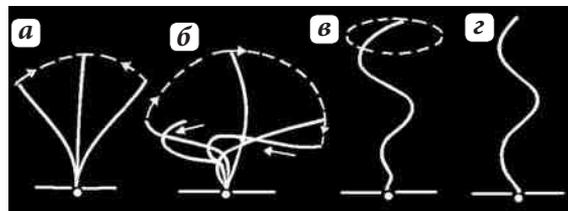
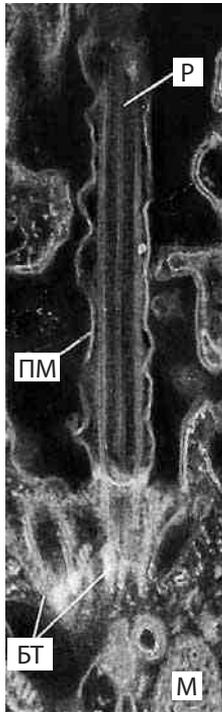


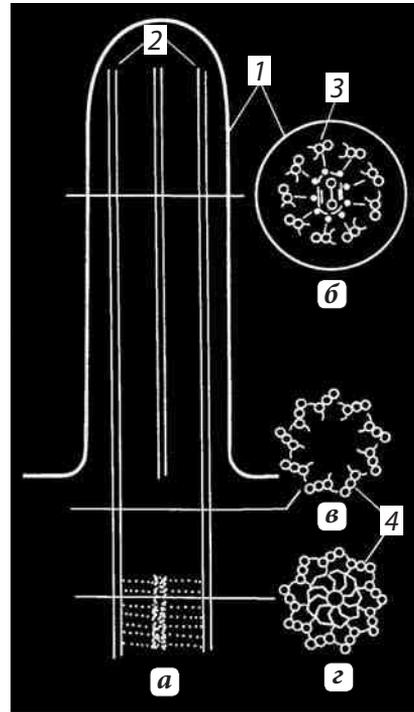
Рис. 22.15. Траектории движения ресничек:

а — маятникообразное; б — крючкообразное; в — воронкообразное; г — волнообразное



**Рис. 22.16.** Ультраструктура реснички

Р — ресничка; ПМ — плазматическая мембрана;  
БТ — базальные тельца; М — митохондрия



**Рис. 22.17.** Общее строение реснички:

**а** — продольный срез; **б** — поперечный срез тела реснички;  
**в, г** — срезы базального тела.

1 — плазматическая мембрана; 2 — микротрубочки; 3 — дуплеты микротрубочек (А и В); 4 — триплеты микротрубочек (А, В и С)

до самой его верхушки покрыт плазматической мембраной. Внутри выроста расположена **аксонема**, сложная структура, состоящая в основном из микротрубочек. Нижняя, проксимальная часть реснички, **базальное тельце**, погружена в цитоплазму. Диаметры аксонемы и базального тельца одинаковы (около 200 нм).

Образование аксонемы ресничек происходит за счет роста А- и В-микротрубочек центриолей, которые в этом случае становятся базальным тельцем. В простейшем случае при образовании одиночных ресничек или так называемых первичных ресничек материнская центриоль подходит к плазматической мембране своим дистальным торцом, связывается с ней своими придатками. В это время начинается рост микротрубочек на (+)-концах А- и В-микротрубочек триплетов. Возникают девять **дублетов** микротрубочек аксонемы, которые, нарастая с (+)-концов на верхушке аксонемы как бы вытягивают плазматическую мембрану, образуя вырост — ресничку. Кроме того, две центральные микротрубочки возникают в связи с плотным веществом, лежащим на границе бывшей центриоли и выроста плазматической мембраны (рис. 22.18).

На поперечном сечении реснички видна плазматическая мембрана, окружающая аксонему. Аксонема в своем составе имеет девять **дублетов** микротрубочек,

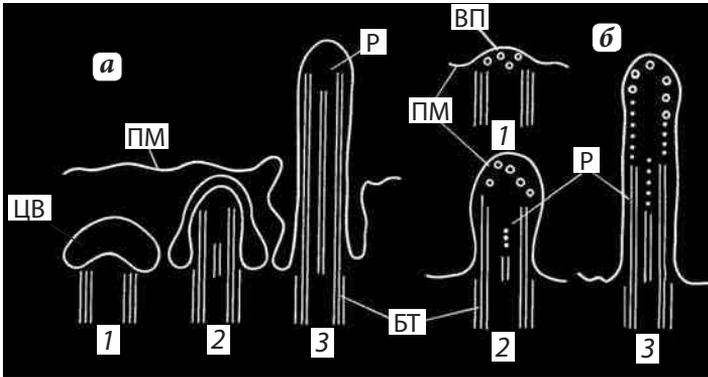


Рис. 22.18. Два способа (а, б) роста микротрубочек аксономы реснички от базального тельца:

пл — плазмалемма; Р — ресничка; БТ — базальное тельце; ЦВ — цитоплазматическая вакуоль; ВП — вырост плазмолеммы;

1–3 — стадии роста ресничек

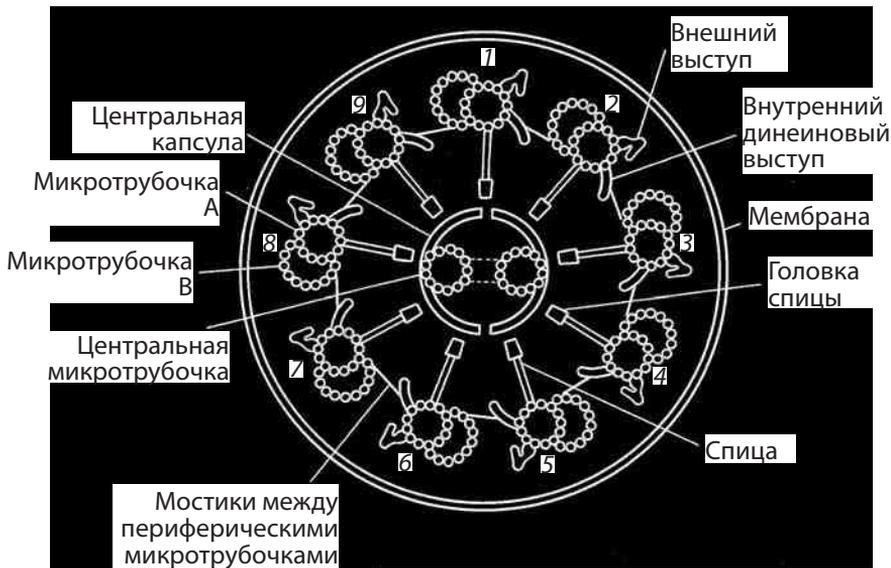


Рис. 22.19. Схема поперечного разреза реснички

образующих внешнюю стенку цилиндра аксономы. Кроме периферических дублетов микротрубочек в центре аксономы располагается пара **центральных микротрубочек**. В целом систему микротрубочек реснички описывают как  $(9 \times 2) + 2$ . В дублетах микротрубочек также различают А-микротрубочку, состоящую из 13 субъединиц, и В-микротрубочку, неполную, содержащую 11 субъединиц. А-микротрубочка несет на себе «ручки», которые направлены к В-микротрубочке соседнего дуплета. От А-микротрубочки к центру аксономы отходит радиальная связка, или **спица**, оканчивающаяся головкой, присоединяющейся к центральной **муфте**, имеющей диаметр около 70 нм, окружающей две центральные микротрубочки. Последние лежат отдельно друг от друга на расстоянии около 25 нм. Таким образом, в аксономе располагается 20 продольных микротрубочек, в то время как в базальном тельце их 27 (рис. 22.19).

Базальное тельце (бывшая центриоль) состоит из 9 триплетов микротрубочек (как и центриоль), имеет ручки, втулку и спицы, расположенные в проксимальной

(нижней) ее части. На участке базального тельца, примыкающем к плазматической мембране, есть девять придатков, выступов, идущих от каждого триплета микротрубочек к плазматической мембране и связывающих его с клеточной поверхностью.

Базальное тельце и аксонема структурно связаны друг с другом и составляют единое целое: А- и В-микротрубочки триплетов базального тельца продолжают в А- и В-микротрубочках дуплетов аксонемы. В зоне перехода базального тела в аксонему наблюдают аморфную поперечную пластинку, которая как бы отделяет эти две части. Центральные микротрубочки аксонемы начинаются от этой пластинки так же, как в этом месте начинается и центральная муфта (капсула) (см. рис. 22.17, 22.19).

При движении ресничек не происходит изменения их длины, они не «сокращаются», а изгибаются, бьются. Оказалось, что механически отделенные реснички способны к биению в присутствии АТФ. При отделении ресничек базальные тельца остаются в теле клетки. Это означает, что для механической работы ресничек базальное тело не нужно, а только аксонема участвует в генерации движения. Удалось показать, что за движение ресничек отвечают «ручки», сидящие на А-микротрубочках. При экстракции компонентов ручек реснички перестают биться в присутствии АТФ.

Было найдено, что в состав ручек входят белки **динеины**. Это большие белковые компоненты, состоящие из 9–12 полипептидных цепей, содержащие 2–3 глобулярные головки, связанные в общий корешок гибкими хвостами (рис. 22.20). Каждая головка динеина обладает АТФ-азной активностью, которая возрастает примерно в 6 раз при ассоциации с микротрубочками. Так как экстракция ручек прекращает биение ресничек, то можно считать, что именно динеин ответственен за это движение, то есть динеин является мотором или двигателем при биении ресничек. Но каков механизм этого движения?

Этот вопрос был решен при использовании выделенных ресничек, лишенных плазматической мембраны, радиальных спиц и связок после частичной обра-

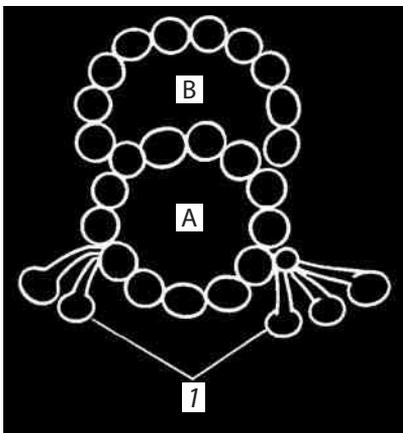


Рис. 22.20. Динеиновые ручки на А-микротрубочке дублета ресничек

ботки аксонем протеазами. Оказалось, что такие аксонемы, содержащие динеиновые ручки, но лишенные связок и плазматических мембран, при добавлении к ним АТФ начинают увеличиваться в длину почти до девяти раз и одновременно утончаются. В электронном микроскопе видно, что такая аксонема увеличилась в длину за счет смещения пар микротрубочек одна относительно другой (рис. 22.21). Другими словами, произошло продольное скольжение дуплетов один относительно другого: аналогично скольжению миозиновых нитей относительно актиновых. В случае динеина повторные циклы ассоциации с субъединицами тубулина, изменения конформации

при связывании АТФ и его гидролизе, вызывают перемещение головок вдоль микротрубочки от (+)-конца к (-)-концу. При этом соседний дублет двигается к верхушке реснички. Когда ресничка содержит все компоненты, и дублеты микротрубочек связаны друг с другом и с центральной парой микротрубочек, такие кооперативные смещения дублетов микротрубочек приводят не к удлинению реснички, а к ее изгибу (рис. 22.22). Как регулируется последовательное перемещение дублетов один относительно другого, еще не ясно.

При образовании многоресничных клеток происходит многочисленная репликация centriолой и образование многочисленных ресничек.

Рост ресничек, удлинение микротрубочек их аксоном происходит на вершине реснички. Следовательно, там локализованы (+)-концы микротрубочек.

В ресничном эпителии яйцеводов позвоночных множественные базальные тельца возникают вокруг так называемых *дейтеросом* — аморфных электронноплотных структур размером от 60 до 700 нм, по периферии которых происходит закладка множественных зачатков базальных телец. Вокруг одной дейтеросомы образуются до десятка новых базальных телец. Они затем мигрируют к плазматической мембране и принимают участие в образовании аксоном (рис. 22.23).

Необходимо отметить, что клетки с множеством ресничек теряют способность к делению и не могут выходить из  $G_0$ -стадии клеточного цикла. На смену им из эпителиального пласта приходят стволовые недифференцированные клетки, которые могут делиться и давать новые поколения многоресничных клеток.

Микротрубочки аксономы устойчивы к действию колхицина, но при росте реснички колхицин полностью прекращает включение новых молекул тубулина, что приводит к торможению роста ресничек.

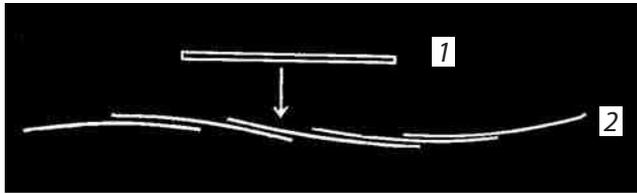


Рис. 22.21. Изолированная аксонома после добавления АТФ: дублеты микротрубочек сместились относительно друг друга

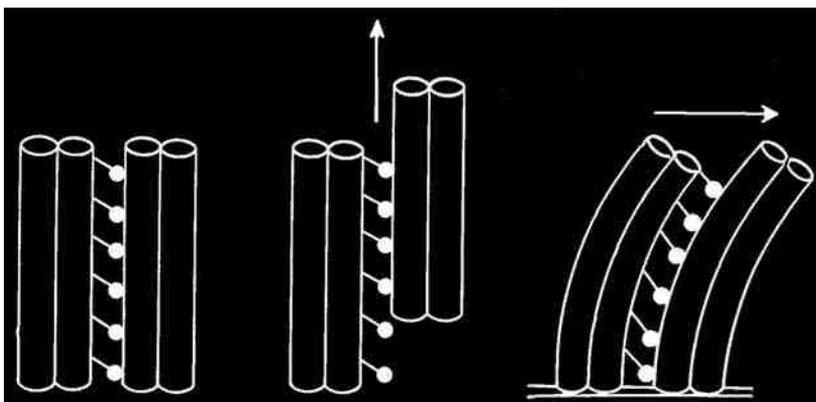


Рис. 22.22. Смещение дублетов при закреплении концов микротрубочек

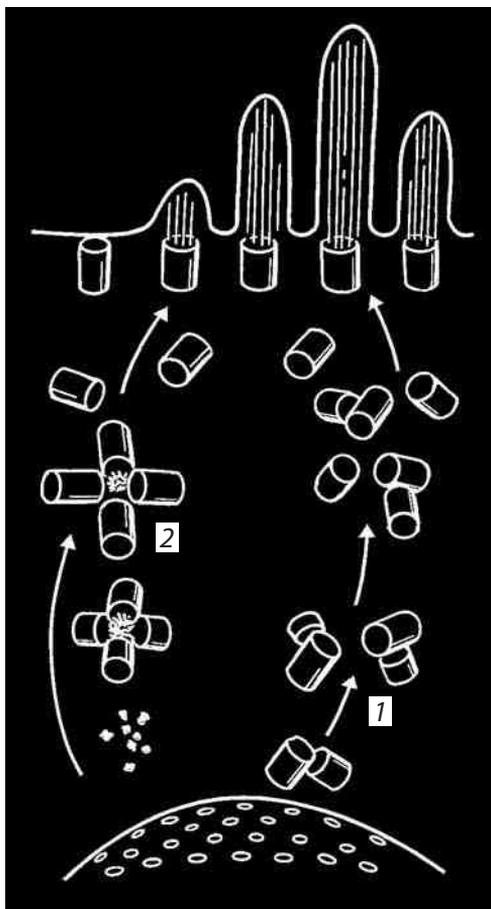


Рис. 22.23. Образование ресничек в многореснитчатом мерцательном эпителии:

1 — размножение центриолей; 2 — возникновение базальных телец около дейтеросом

Патология кинетоцилий и жгутиков выражается в потере их подвижности. Целый ряд генетических нарушений в их структуре, связанных с их дискинезией, хорошо изучен на мутантных формах зеленой водоросли *Chlamydomonas*. Сходные дефекты ресничек и жгутиков обнаружены и у человека при различных формах наследственного мужского бесплодия, связанного с неподвижностью спермиев. Так же как и у *Chlamydomonas* такая потеря подвижности может быть связана с рядом различных структурных нарушений: потеря динеиновых ручек, радиальных спиц, центральных микротрубочек и др. У таких индивидуумов одновременно сходные нарушения обнаруживаются в составе базальных телец и ресничек эпителия. Эти морфологические аномалии обычно сопровождаются хроническими респираторными заболеваниями (хронические бронхиты, синуситы). Эта группа наследственных заболеваний называется синдромом неподвижных ресничек, или **синдромом Картеннегера**. Многие из людей, страдающих этим синдромом, имеют обратную симметрию тела: сердце располагается справа, печень и аппендикс слева и т.д.

Вторая категория ресничных клеток — клетки с так называемыми **первичными ресничками** не обладает способностью к движению. Практически все типы клеток, за исключением клеток крови, мышц и кишечного эпителия, в  $G_0$ -периоде образуют первичные реснички, которые отличаются от настоящих ресничек, или киноцилий, тем, что они не имеют пары центральных микротрубочек и не способны к движению. Такими первичными ресничками обладают, например, хондроциты, клетки извитых канальцев почек, нейроны и др. Они образуются в результате того, что диплосома подходит к плазматической мембране и от материнской центриоли начинается рост аксономы, но без двух центральных микротрубочек. Если клетки культуры фибробластов, обладающих в  $G_0$ -периоде такими ресничками, стимулировать к делению, то эти реснички исчезают, а базальное тельце-центриоль начинает свой цикл как обычная центриоль в клетках, способных к размножению.

Функциональное значение этих первичных ресничек не ясно. Но интересно отметить, что при развитии сенсорных клеток сетчатки их наружные сегменты палочек и колбочек возникают сначала за счет образования первичных ресничек. Возможно, что у нерцепторных клеток, имеющих такие первичные реснички, последние выполняют функции внешних анализаторов, являются как бы «антеннами», на поверхности которых рецепторные молекулы плазматической мембраны могут регистрировать механические и химические сигналы, поступающие из внешней межклеточной среды.

# Часть VI

## ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ КЛЕТКИ

### Глава 23

## Митотическое деление клеток. Общая организация митоза

Как постулирует клеточная теория, увеличение числа клеток происходит исключительно за счет деления исходной клетки, предварительно удвоившей свой генетический материал. Это — главное событие в жизни клетки как таковой, а именно завершение воспроизведения себе подобных. При этом исходная клетка «исчезает», а вместо нее образуются две новые (Король умер, да здравствуют два новых короля!). Вся «интерфазная» жизнь клеток направлена на полное осуществление клеточного цикла, заканчивающегося клеточным делением. Само же деление клетки — процесс неслучайный, строго генетически детерминированный, где в последовательный ряд выстроена целая цепочка событий.

Как уже указывалось, деление прокариотических клеток протекает без конденсации хромосом, хотя должен существовать ряд метаболических процессов и, в первую очередь, синтезов ряда специфических белков, участвующих в «простом» делении бактериальной клетки надвое.

Деление всех эукариотических клеток связано с конденсацией удвоенных (реплицированных) хромосом, которые приобретают вид плотных нитчатых структур. Эти нитчатые хромосомы переносятся в дочерние клетки специальной структурой — *веретеном деления*. Такой тип деления эукариотических клеток — *митоз* (от греч. *mitos* — нити), или *кариокinesis*, или *непрямое деление* — является единственным полноценным способом увеличения числа клеток. Прямое деление клеток или амитоз достоверно описано только при делении полиплоидных макронуклеусов инфузорий, их микронуклеусы делятся только митотическим путем.

Деление всех эукариотических клеток связано с образованием специального *аппарата клеточного деления*. При удвоении клеток происходят два события: расхождение реплицированных хромосом и разделение клеточного тела, *цитотомия*. Первая часть события у эукариот осуществляется с помощью так называемого *веретена деления*, состоящего из микротрубочек, а вторая часть происходит за счет участия акто-миозиновых комплексов, вызывающих образование перетяжки у клеток животного происхождения (рис. 23.1).

В образовании веретена деления у всех эукариотических клеток принимают участие два рода структур: полярные тельца (полюса) веретена и кинетохоры хромосом. Полярные тельца, или centrosомы, являются центрами организации (или нуклеации) микротрубочек веретена деления. От них своими «+»-концами отрастают микротрубочки, образующие пучки, тянущиеся к хромосомам. У клеток животных centrosомы включают в свой состав и центриоли.

Но у многих эукариот центриолей нет, а центры организации микротрубочек присутствуют в виде бесструктурных аморфных зон, от которых отходят многочисленные микротрубочки. Как правило, при организации аппарата деления участвуют две centrosомы или два полярных тельца, находящиеся на противоположных концах сложного, веретенообразного тела, состоящего из микротрубочек. Второй структурой, характерной для митотического деления клеток, связывающей микротрубочки веретена с хромосомой, являются **кинетохоры** — сложные белковые комплексы. Именно кинетохоры, взаимодействуя с микротрубочками, ответственны за перемещение хромосом при клеточном делении.

Все эти компоненты, а именно полярные тельца (centrosомы), микротрубочки веретена и кинетохоры хромосом встречаются у всех эукариотических клеток и обеспечивают сложный процесс расхождения реплицированных хромосом.

Митотический аппарат млекопитающих относится к т.н. открытому ортомитозу, при образовании которого хромосомы не связаны с мембранами, а ядерная оболочка при переходе от интерфазы к митозу полностью распадается на множество мелких мембранных вакуолей. Эта форма митоза представлена астральным и анастральным типами (см. ниже).

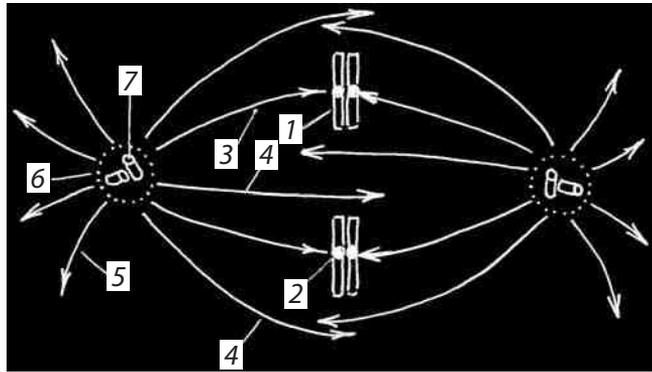


Рис. 23.1. Общая схема организации митотического веретена:

1 — хромосомы; 2 — кинетохор; 3 — кинетохорные микротрубочки; 4 — полюсные микротрубочки; 5 — астральные микротрубочки; 6 — полюс веретена; 7 — центриоль

## 1. Морфология митотической фигуры

Как уже говорилось, митотический аппарат наиболее подробно изучен у клеток высших растений и животных. Особенно хорошо он бывает выражен на стадии метафазы митоза (рис. 23.2). В живых или фиксированных клетках в метафазе в экваториальной плоскости клетки располагаются хромосомы, от которых в противоположных направлениях тянутся т.н. **нити веретена**, сходящиеся на двух разных полюсах митотической фигуры. Так что **митотическое веретено** — это

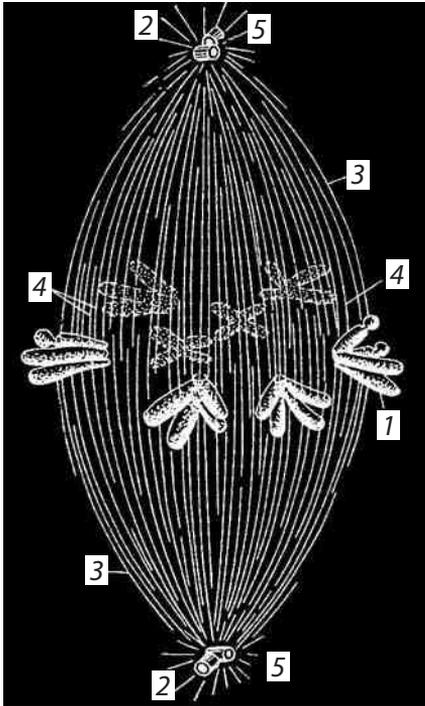


Рис. 23.2. Схема строения веретена деления:

1 — хромосомы; 2 — полюса веретена, centrosомы; 3 — межполюсные микротрубочки; 4 — кинетохорные микротрубочки; 5 — астральные микротрубочки

**совокупность хромосом, полюсов и волокон.**

Волокна веретена представляют собой одиночные микротрубочки или их пучки. Начинаются микротрубочки от полюсов веретена и часть из них направляется к центромерам, где расположены кинетохоры хромосом (кинетохорные микротрубочки), часть проходит дальше по направлению к противоположному полюсу, но до него не доходит — «межполюсные микротрубочки». Кроме того от полюсов отходит группа радиальных микротрубочек, образуя вокруг них как бы «лучистое сияние» — это астральные микротрубочки.

По общей морфологии митотические фигуры делятся на два типа: астральный и анастральный (рис. 23.3).

**Астральный** тип веретена (или конвергентный) характеризуется тем, что его полюса представлены небольшой зоной, к которой сходятся (конвергируют) микротрубочки. Обычно в полюсах астральных веретен располагаются centrosомы, содержащие центриоли. Хотя известны случаи бесцентриолярных астральных митозов (при мейозе некоторых беспозвоночных). От полюсов, кроме того, расходятся радиальные микротрубочки,

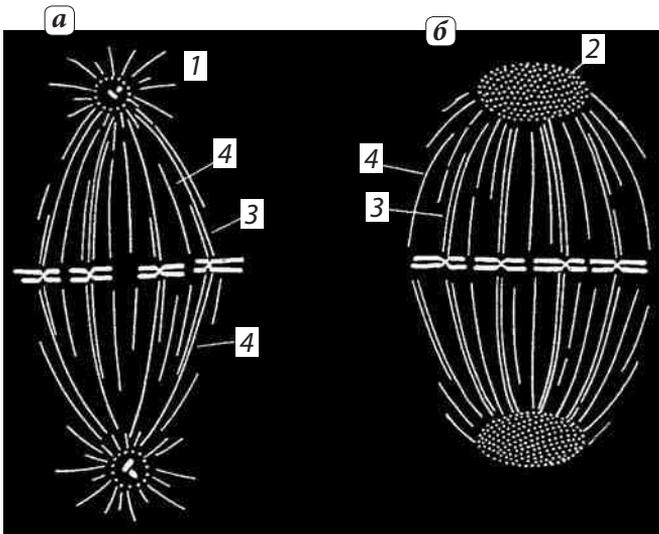


Рис. 23.3. Астральный (а) и анастральный (б) типы веретена деления в метафазе:

1 — астер, лучистое сияние, вокруг центриолей на полюсе веретена; 2 — аморфная полярная «шапочка» на полюсе веретена; 3 — кинетохорные микротрубочки; 4 — межполюсные микротрубочки

не входящие в состав веретена, а образующие звездчатые зоны — цитастеры. В целом же такой тип митотического веретена напоминает скорее гантель (рис. 23.3а).

Анастральный тип митотической фигуры не имеет на полюсах цитастеров. Полярные области веретена здесь широкие, их называют «полярными шапочками», в их состав не входят центриоли. Волокна веретена в данном случае не отходят от одной точки, а расходятся широким фронтом (дивергируют) от всей зоны полярных шапочек. Этот тип веретена характерен для делящихся клеток высших растений, хотя иногда встречается и у высших животных. Так, например, в раннем эмбриогенезе млекопитающих при делении созревания ооцита и при I и II делении зиготы наблюдаются бесцентриолярные (дивергентные) митозы. Но уже начиная с третьего клеточного деления и во всех последующих, клетки делятся при участии астральных веретен, в полюсах которых всегда обнаруживаются центриоли.

В целом же для всех форм митоза общими структурами остаются хромосомы с их кинетохорами, полярные тельца (центросомы) и волокна веретена.

## 2. Центромеры и кинетохоры

Центромеры, или первичные центросомные перетяжки, как участки связывания хромосом с микротрубочками, могут иметь различную локализацию по длине хромосом (см. метацентрические, субметацентрические, телоцентрические). В области первичных перетяжек, где к сложному кинетохору подходит пучок микротрубочек. Несмотря на разнообразие зон центромер, все они связаны со сложной структурой **кинетохора**, имеющего принципиальное сходство строения и функций у всех эукариот (рис. 23.4).

Проще всего строение моноцентрического кинетохора у клеток пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Он связан со специальным участком ДНК на хромосоме (центромерный или CEN-локус).

Центромеры млекопитающих состоят из многократно повторяющихся CEN-локусов, обогащенных участками конститутивного гетерохроматина, содержащего сателлитную ДНК, связанную с кинетохорами.

Кинетохоры — специальные белковые структуры, располагающиеся в зонах центромер хромосом (рис. 23.5). Кинетохоры лучше изучены у высших организмов. Кинетохоры — это сложные комплексы, состоящие из многих белков. Морфологически они очень сходны, имеют сходное строение, начиная от диатомовых водорослей, кончая человеком. Кинетохоры

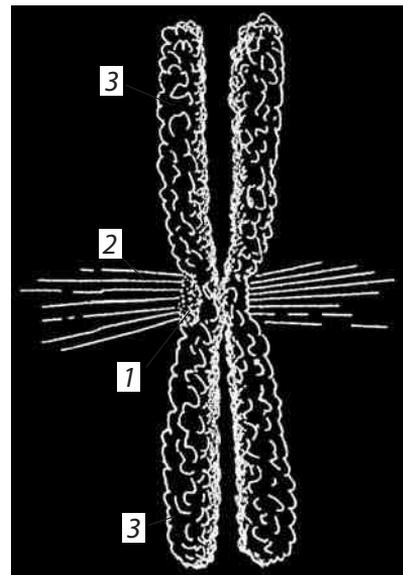
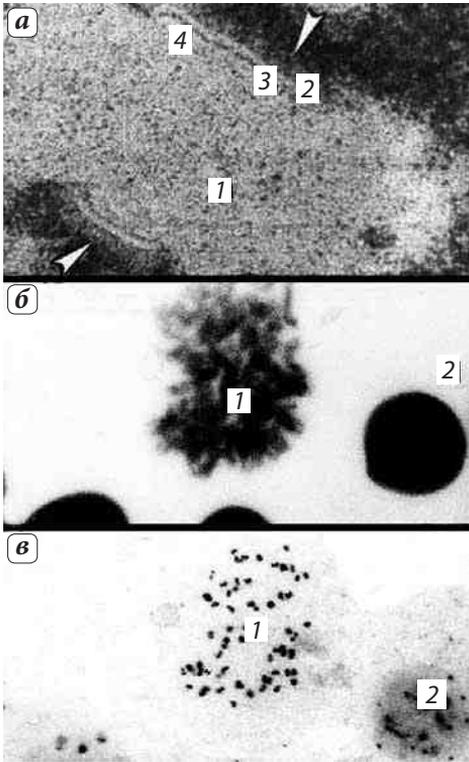


Рис. 23.4. Кинетохоры располагаются в центромерном районе хромосом:

1 — кинетохор; 2 — пучок кинетохорных микротрубочек; 3 — хроматида

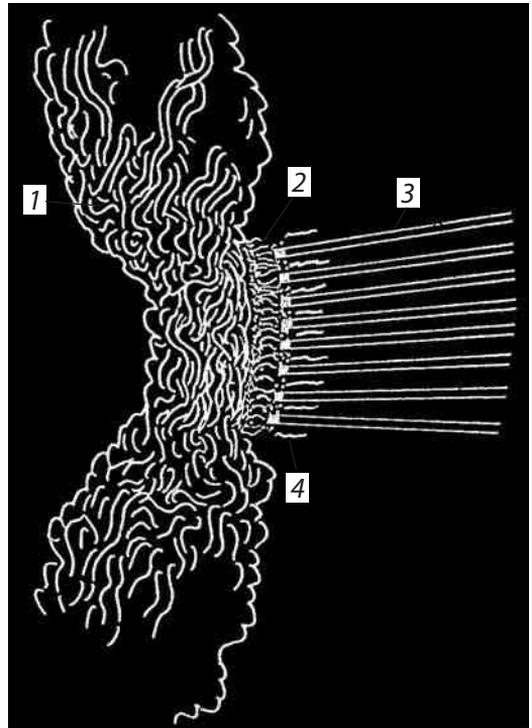


**Рис. 23.5.** Кинетохор:

**а** — электронная микроскопия кинетохора метафазной хромосомы клетки культуры СПЭВ: 1 — хромосома; 2 — внешний слой; 3 — промежуточная зона; 4 — внутренний слой. Стрелки показывают слой короны.

**б** — окраска клеток культуры СПЭВ ядерным флуорохромом Дари: 1 — хромосомы делящейся клетки; 2 — интерфазные ядра.

**в** — окраска тех же клеток антителами к кинетохорному белку CENP-A. Видны двойные светящиеся точки в центромерах хромосом (1) и в интерфазных ядрах (2). (фото И.С. Кудрявцева)



**Рис. 23.6.** Ультраструктура кинетохора:

1 — анафазная хроматида; 2 — трехслойный кинетохор; 3 — кинетохорные микротрубочки; 4 — фиброзная корона

представляют собой трехслойные структуры (см. рис. 23.5): внутренний плотный слой, примыкающий к телу хромосомы, средний рыхлый слой, и внешний плотный слой. От внешнего слоя отходят множество фибрилл, образуя т.н. фиброзную корону кинетохора (рис. 23.6).

В общей форме кинетохоры имеют вид пластинок или дисков, лежащих в зоне первичной перетяжки хромосомы, в центромере. На каждую хроматиду (хромосому) обычно приходится по одному кинетохору. До анафазы кинетохоры на каждой сестринской хроматиде располагаются оппозитно, связываясь каждый со своим пучком микротрубочек.

Кинетохоры представляют собой сложные комплексы, где кроме специфической ДНК участвует множество кинетохорных белков (CENP-белки) (рис. 23.7).

В участке центромеры под трехслойным кинетохором расположен участок гетерохроматина, обогащенного  $\alpha$ -сателлитной ДНК. Здесь же обнаруживается ряд белков: CENP-B, который связывается с  $\alpha$ -ДНК, МСАК — кинезино подобный белок и белки, ответственные за спаривание сестринских хромосом (когезины). Во внутреннем слое кинетохора обнаружен также ряд белков: CENP-A, вариант гистона  $H_3$ , который, вероятно, связывается с особым CDE II участком ДНК, CENP-G, связывающийся с белками ядерного матрикса, консервативный белок CENP-C, с неизвестной пока функцией. В среднем рыхлом слое обнаружен белок 3F3/2, который, вероятно, как-то регистрирует натяжение пучков микротрубочек. Во внешнем плотном слое кинетохора обнаружены белки CENP-E и CENP-F, участвующие в связывании микротрубочек. Кроме того, здесь обнаружены белки семейства цитоплазматических динеинов. Интересно, что некоторые белки кинетохоров, например CENP-A, связаны с хромосомами даже в интерфазе (рис. 23.8).

Функциональная роль кинетохоров заключается в связывании между собой сестринских хроматид, в закреплении митотических

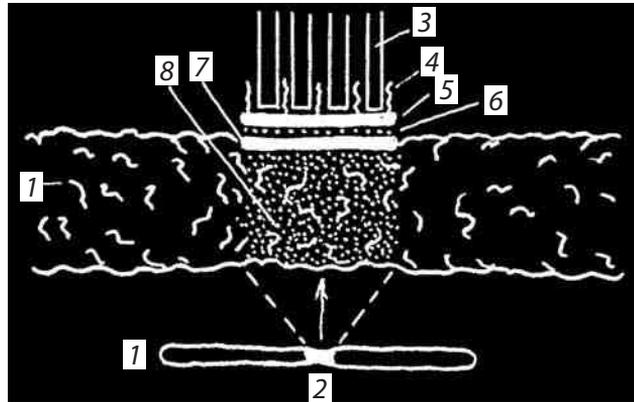


Рис. 23.7. Локализация центромерных белков и ДНК:

1 — хромосома; 2 — центромера; 3 — микротрубочки; 4 — фибрильная корона: CENP-E, динеины; 5 — внешний слой: CENP-E, CENP-F; 6 — промежуточная зона; 7 — внутренний слой: CENP-C, ДНК; 8 — центромерный гетерохроматин:  $\alpha$ -сателлитная ДНК, CENP-B, МСАК, INCENP (когезин)

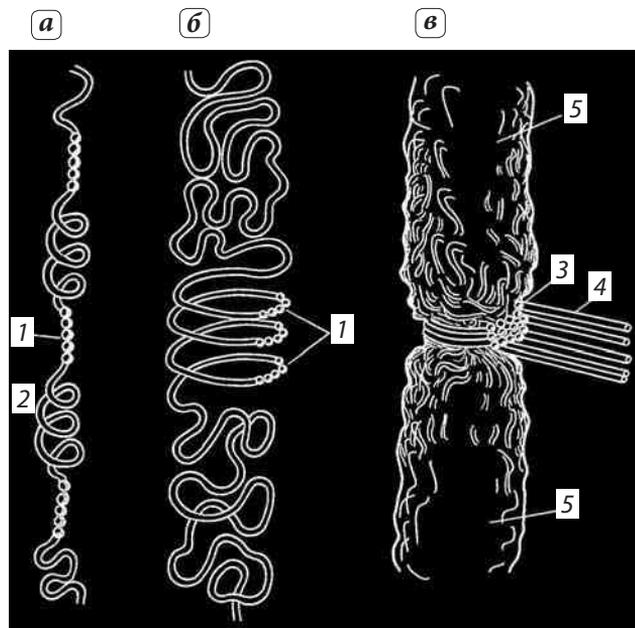


Рис. 23.8. Гипотетическая модель строения кинетохора:

**а** — деконденсированная центромера; **б** — частично конденсированная центромера; **в** — кинетохор в составе хроматиды:

1 — участок ДНК с белковыми сегментами, связывающими микротрубочки; 2 — линкерный участок ДНК; 3 — сформированный кинетохор; 4 — микротрубочки; 5 — плечи хромосом

микротрубочек, в регуляции разъединения хромосом и в собственно движении хромосом во время митоза при участии микротрубочек.

К кинетохорам подходят микротрубочки, растущие от полюсов, от centrosом. Минимальное их число у дрожжей — одна микротрубочка на каждую хромосому. Удалось показать, что сложные кинетохоры высших организмов представляют собой структуру, состоящую из повторяющихся субъединиц, каждая из которых способна образовывать связи с микротрубочками (см. рис. 23.8). По одной из моделей строения центромерного участка хромосомы (Зинковски, Мейне, Бринкли, 1991) предложено, что в интерфазе на специфических участках ДНК расположены субъединицы кинетохора, содержащие все характерные белки. По мере конденсации хромосом в профазе эти субъединицы группируются таким образом, что создается зона, обогащенная этими белковыми комплексами — кинетохор.

Кинетохоры, белковые в общем структуры, удваиваются в S-периоде, параллельно удвоению хромосом. Но их белки присутствуют на хромосомах во всех периодах клеточного цикла (см. рис. 23.5).

### 3. Механика митоза

Во многих разделах данной книги мы уже касались поведения различных клеточных компонентов (хромосом, ядрышек, ядерной оболочки и др.) при клеточном делении. Но вернемся к этим важнейшим процессам, чтобы разобраться в них уже в целом.

У клеток, вступивших в цикл деления, фаза собственно митоза, непрямого деления, занимает относительно короткое время, всего около 0,1 времени клеточного цикла. Цикл эпителиальных клеток кишечника мыши длится около 20–22 ч, на митоз же приходится всего 1 ч. При дроблении яйцеклеток весь клеточный период, включая митоз, может быть меньше часа. Как уже говорилось (см. главу 5), подготовка к делению клетки начинается уже в S-периоде, когда реплицированные хроматиды при участии SMC-белков, включая конденсины и когезины, связываются друг с другом, образуя митотическую хромосому.

Процесс митотического деления клеток принято подразделять на несколько основных фаз: профазу, прометафазу, метафазу, анафазу, телофазу. Границы между этими фазами установить точно очень трудно, потому что сам митоз представляет собой непрерывный процесс и смена фаз происходит очень постепенно: одна из них незаметно переходит в другую (рис. 23.9). Единственная фаза, которая имеет реальное начало, это анафаза — начало движения хромосом к полюсам. Длительность отдельных фаз митоза различна, наиболее короткая по времени анафаза (табл. 15).

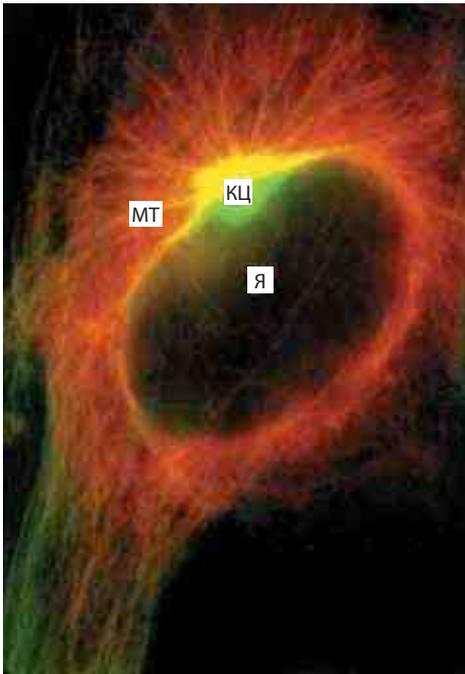
Определяется время отдельных фаз митоза лучше всего при прямом наблюдении за делением живых клеток в специальных камерах. Зная время митоза, можно рассчитать длительность отдельных фаз по проценту их встречаемости среди делящихся клеток.

Таблица 15. Длительность фаз митоза

Объект	Продолжительность, мин			
	профаза	метафаза	анафаза	телофаза
Клетки саркомы Иосидо	14	31	4	21
Клетки культуры селезенки мыши	20–35	6–15	8–14	9–26

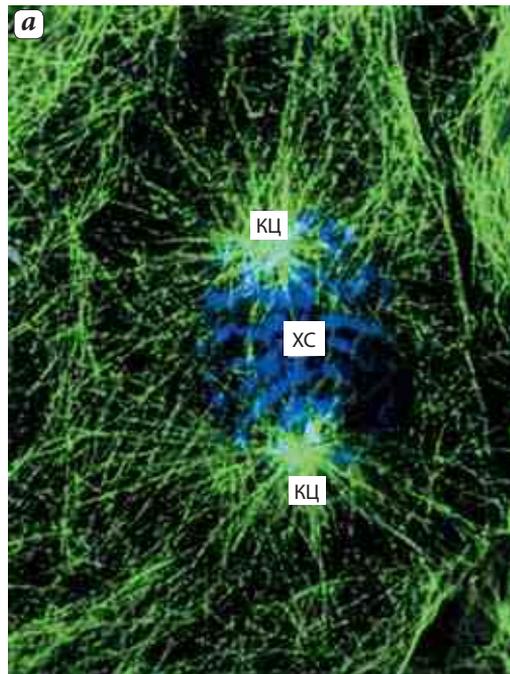
**Профаза.** Уже в конце  $G_2$ -периода в клетке начинают происходить значительные перестройки. Точно определить, когда наступает профаза, морфологически невозможно. Лучшим критерием для начала этой фазы митоза может служить появление в ядрах нитчатых структур — митотических хромосом (рис. 23.10а). Этому событию предшествует повышение активности фосфорилаз, модифицирующих гистоны, и, в первую очередь, гистон H1. В профазе сестринские хроматиды связаны друг с другом бок о бок с помощью белков-когезинов, которые образуют эти связи еще в S-периоде, во время удвоения хромосом. К поздней профазе связь между сестринскими хроматидами сохраняется только в зоне кинетохоров. В профазных хромосомах уже можно наблюдать зрелые кинетохоры, которые еще не имеют никаких связей с микротрубочками.

Конденсация хромосом в профазном ядре совпадает с резким уменьшением транскрипционной активности хроматина, которая полностью исчезает к



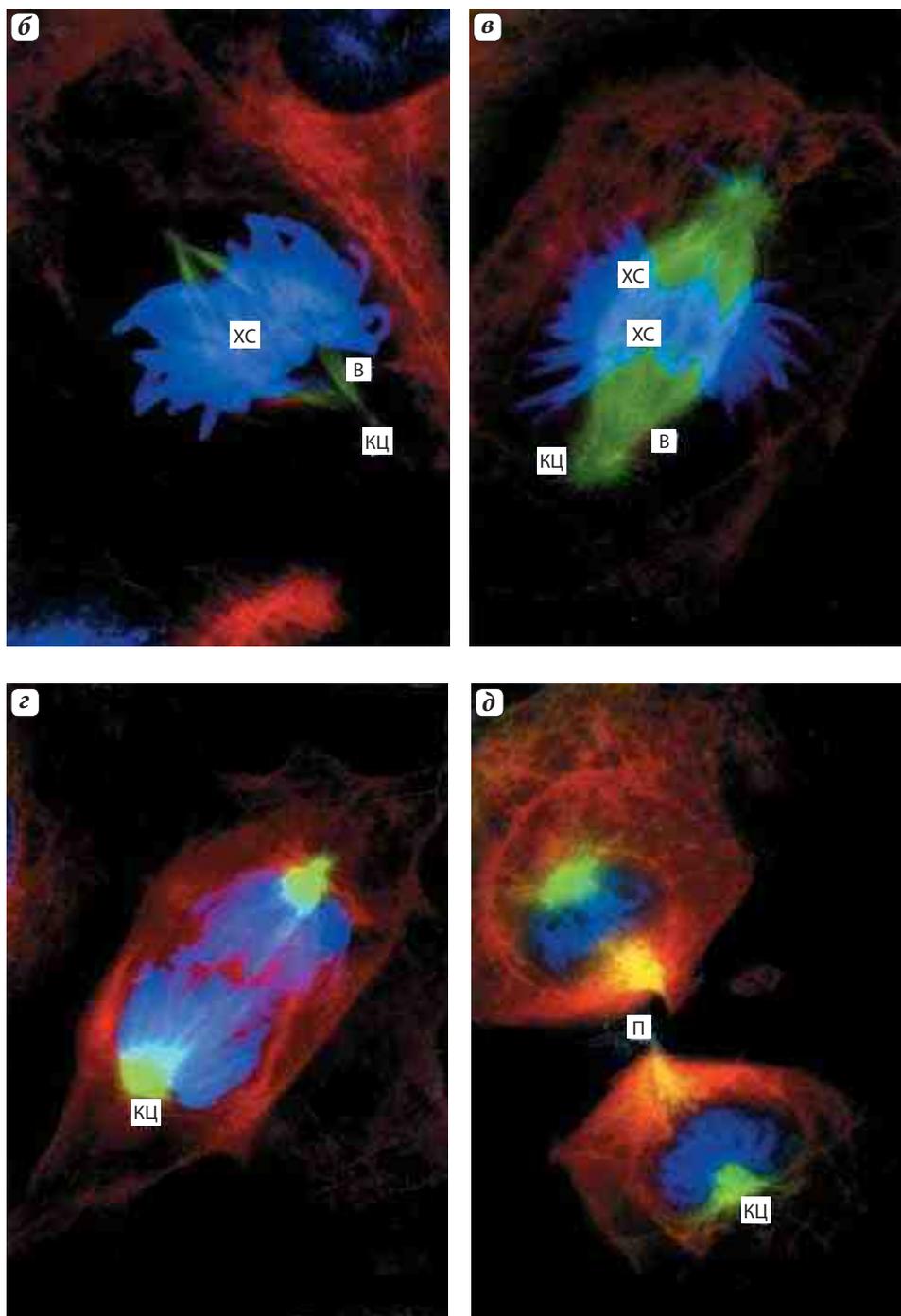
**Рис. 23.9.** Интерфазная клетка культуры ледяной ткани тритона:

МТ — микротрубочки (желтые), окрашенные мечеными антителами к тубулину; КЦ — клеточный центр; я — ядро (фото А.Л. Ходякова)



**Рис. 23.10.** Те же клетки в профазе:

**а** — расходящиеся клеточные центры (КЦ); зеленым обозначены микротрубочки, окрашенные антителами к тубулину; голубым цветом обозначены хромосомы (ХС), окрашенные флуорохромом Дарі (фото А.Л. Ходякова)



**Рис. 23.10.** Те же клетки в профазе:

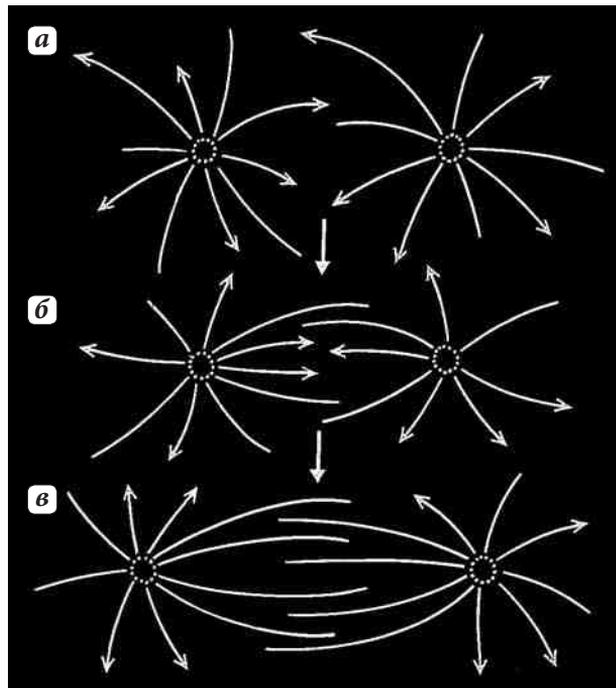
**б** — в метафазе: микротрубочки веретена (В) и клеточные центры (КЦ) обозначены желтым цветом, хромосомы голубые (ХС), красным обозначены промежуточные филаменты; **в** — в анафазе; **з** — в ранней телофазе; **д** — в поздней телофазе, цитотомия (фото А.Л. Ходякова)

середине профазы. В связи с падением синтеза РНК и конденсацией хроматина происходит инактивация и ядрышковых генов. При этом отдельные фибриллярные центры сливаются так, что превращаются в ядрышко-образующие участки хромосом, в ядрышковые организаторы. Большая часть ядрышковых белков диссоциирует и в свободном виде встречается в цитоплазме клетки или связывается с поверхностью хромосом.

Одновременно с этим происходит фосфорилирование ряда белков ламины ядерной оболочки, которая распадается. При этом теряется связь ядерной оболочки с хромосомами. Затем ядерная оболочка фрагментируется на мелкие вакуоли, а поровые комплексы исчезают.

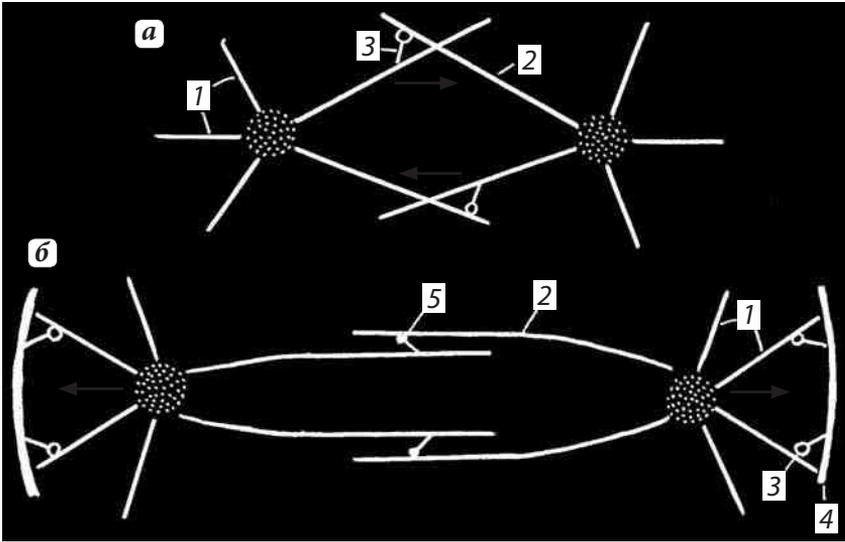
Параллельно этим процессам происходит активация клеточных центров. В начале профазы разбираются микротрубочки в цитоплазме и начинается бурный рост множества астральных микротрубочек вокруг каждой из удвоившихся диплосом. Скорость роста микротрубочек в профазе почти в два раза выше роста интерфазных микротрубочек, но лабильность их в 5–10 раз выше цитоплазматических. Так если время полужизни микротрубочек в цитоплазме составляет около 5 мин, то во время первой половины митоза — всего лишь 15 с. Здесь еще в большей степени проявляется динамическая нестабильность микротрубочек. Все микротрубочки, отходящие от centrosом, растут вперед своими (+)-концами.

Активированные centrosомы — будущие полюса веретена деления — начинают расходиться друг от друга на некоторое расстояние. Механизм такого профазного расхождения полюсов заключается в следующем: идущие навстречу друг другу антипараллельные микротрубочки взаимодействуют между собой, что приводит к их большей стабилизации и расталкиванию полюсов (рис. 23.11). Это происходит за счет взаимодействия с микротрубочками динеино-подобных белков, которые в центральной части веретена выстраивают межполюсные микротрубочки параллельно друг другу. Одновременно с этим продолжается их полимеризация и рост, которые сопровождаются одновременно с



**Рис. 23.11.** Механизм расталкивания полюсов за счет стабилизации антипараллельных микротрубочек, отходящих от разных полюсов:

**а** — ранняя; **б** — средняя; **в** — поздняя профазы. Стрелки указывают направление роста микротрубочек, их (+)-концы



**Рис. 23.12.** Участие моторных белков в расталкивании полюсов и образовании веретена.

**а** — ранняя стадия: 1 — астральные МТ, 2 — межполюсные МТ, 3 — динеин-подобные белки; **б** — поздняя стадия: 4 — плазматическая мембрана, 5 — кинезины

их расталкиванием в направлении к полюсам за счет работы кинезино-подобных белков (рис. 23.12). В это время при образовании веретена микротрубочки с кинетохорами хромосом еще не связаны.

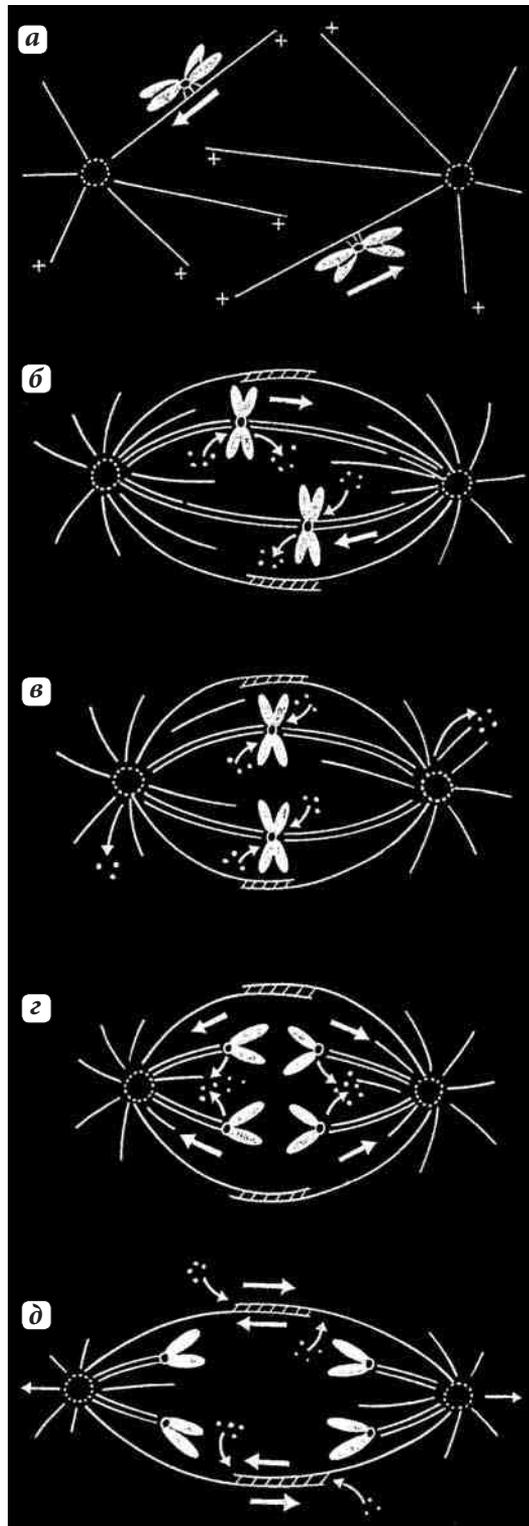
В профазе одновременно с разборкой цитоплазматических микротрубочек происходит дезорганизация эндоплазматического ретикулума (он распадается на мелкие вакуоли, лежащие по периферии клетки) и аппарата Гольджи, который теряет свою околядерную локализацию, распадается на отдельные диктиосомы, без порядка разбросанные в цитоплазме.

**Прометафаза.** После разрушения ядерной оболочки митотические хромосомы без особого порядка лежат в зоне бывшего ядра. В прометафазе начинается их движение и перемещение, которое в конечном итоге приведет к образованию экваториальной хромосомной «пластинки», к упорядоченному расположению хромосом в центральной части веретена уже в метафазе. В прометафазе наблюдается постоянное движение хромосом или метакинез, при котором они то приближаются к полюсам, то уходят от них к центру веретена, пока не займут среднее положение, характерное для метафазы (конгрессия хромосом).

В начале прометафазы хромосомы, лежащие ближе к одному из полюсов образующегося веретена, начинают быстро к нему приближаться. Это происходит не одновременно, но занимает определенное время. Было найдено, что такой первичный асинхронный дрейф хромосом к разным полюсам происходит с помощью микротрубочек. Используя видео-электронное усиление фазового контраста в световом микроскопе, удалось на живых клетках наблюдать, что отдельные отходящие от полюсов микротрубочки случайно достигают одного из кинетохоров хромосомы и связываются с ним, «захватываются» кинетохором. После

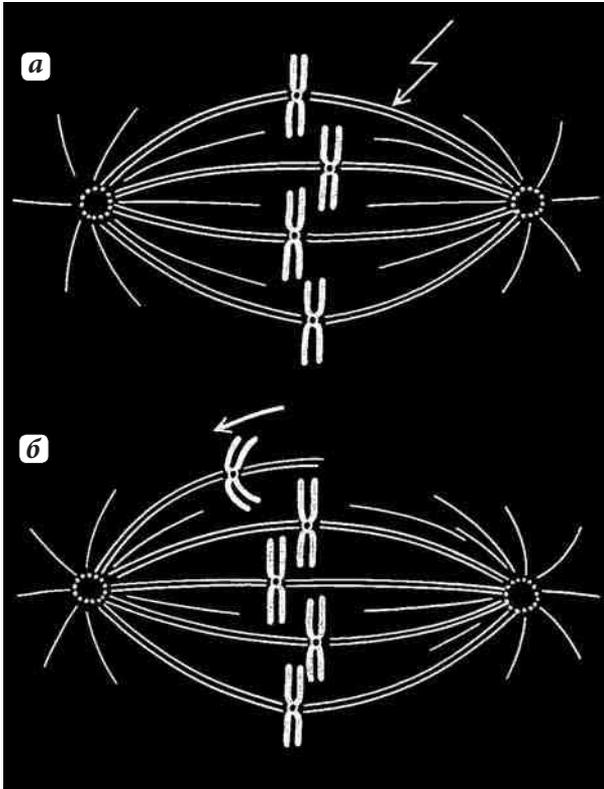
этого происходит быстро, со скоростью около 25 мкм/мин, скольжение хромосомы вдоль микротрубочки по направлению к ее (-)-концу. Это приводит к тому, что хромосома приближается к полюсу, от которого произошла эта микротрубочка (рис. 23.13). Важно отметить, что кинетохоры могут контактировать с боковой поверхностью таких микротрубочек. Во время такого движения хромосомы микротрубочки не разбираются. Вероятнее всего, что за такое быстрое перемещение хромосом отвечает моторный белок, аналогичный цитоплазматическому динеину, обнаруженному в короне кинетохоров.

В результате такого первичного прометафазного движения хромосомы оказываются случайным образом приближены к полюсам веретена, где продолжает происходить образование новых микротрубочек. Очевидно, что чем ближе к centrosome будет находиться хромосомный кинетохор, тем будет выше случайность его взаимодействия с другими микротрубочками. В этом случае новые, растущие (+)-концы микротрубочек «захватываются» зоной короны кинетохора; теперь с кинетохором



**Рис. 23.13.** Митотические движения хромосом:

**а** — профаза, дрейф сдвоенных хроматид к полюсам веретена; **б** — прометафаза, дрейф сдвоенных хроматид в экваториальную область веретена; **в** — метафаза; **г** — анафаза А, расхождение хроматид к полюсам; **д** — анафаза Б, расхождение полюсов (тонкие стрелки показывают поток мономеров тубулина, толстые — направление движения хромосом)



**Рис. 23.14.** Перерезка пучка кинетохорных микротрубочек (стрелка) в прометафазе вызывает движение хромосом к противоположному полюсу:

**а** — исходная позиция хромосом; **б** — после перерезки

оказывается связанным пучок из микротрубочек, рост которых продолжается на их (+)-конце. При росте такого пучка кинетохор, а вместе с ним и хромосома, должен перемещаться к центру веретена, удаляться от полюса. Но к этому времени от противоположного полюса ко второму кинетохору другой сестринской хроматиды подрастают свои микротрубочки, пучок которых начинает тянуть хромосому к противоположному полюсу. Наличие такой тянущей силы доказывается тем, что если лазерным микролучом перерезать пучок микротрубочек у одного из кинетохоров, то хромосома начинает двигаться к противоположному полюсу (рис. 23.14). В нормальных же условиях хромосома, совершая небольшие перемещения в сторону то одного, то другого полюса, в результате по-

степенно занимает срединное положение в веретене. В процессе прометафазного дрейфа хромосом происходит удлинение, наращивание микротрубочек на (+)-концах, когда кинетохор движется от полюса, и разборка, укорачивание микротрубочек тоже на (+)-конце, когда сестринский кинетохор движется по направлению к полюсу.

Эти переменные движения хромосом то туда, то сюда приводят к тому, что они в конце концов оказываются в экваторе веретена и выстраиваются в метафазную пластинку (см. рис. 23.10б).

**Метафаза.** В метафазе (см. рис. 23.10б), также как и в других фазах митоза, несмотря на некоторую стабилизацию пучков микротрубочек, продолжается их постоянное обновление за счет сборки и разборки тубулинов. Во время метафазы хромосомы располагаются так, что их кинетохоры обращены к противоположным полюсам. В это же время происходит постоянная переборка и межполюсных микротрубочек, число которых в метафазе достигает максимума. Если на метафазную клетку посмотреть со стороны полюса, то можно видеть, что хромосомы располагаются так, что их центромерные участки обращены к центру веретена,

а плечи — к периферии. Такое расположение хромосом носит название «материнской звезды» и характерно для клеток животных.

К концу метафазы завершается процесс обособления друг от друга сестринских хроматид. Их плечи лежат параллельно друг другу, между ними хорошо видна их разделяющая щель. Последним местом, где контакт между хроматидами сохраняется, является центромера; вплоть до самого конца метафазы хроматиды во всех хромосомах остаются связанными в центромерных участках с помощью белков когезинов (рис. 23.15).

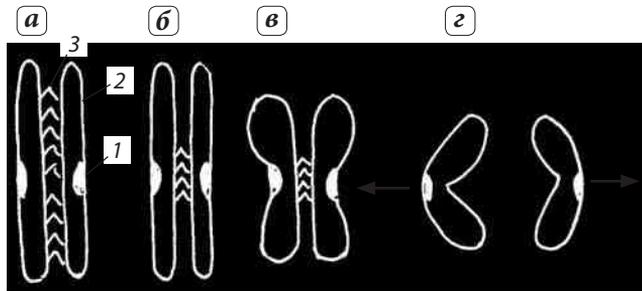


Рис. 23.15. Когезины в митотическом цикле:

**а** — S и G<sub>2</sub> — фазы; **б, в** — метафаза; **з** — анафаза; **1** — хромосома; **2** — когезины; **3** — кинетохор

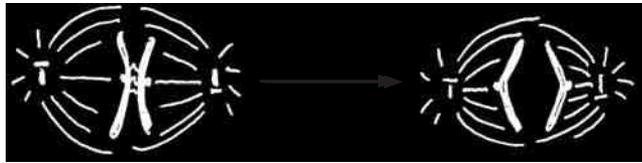
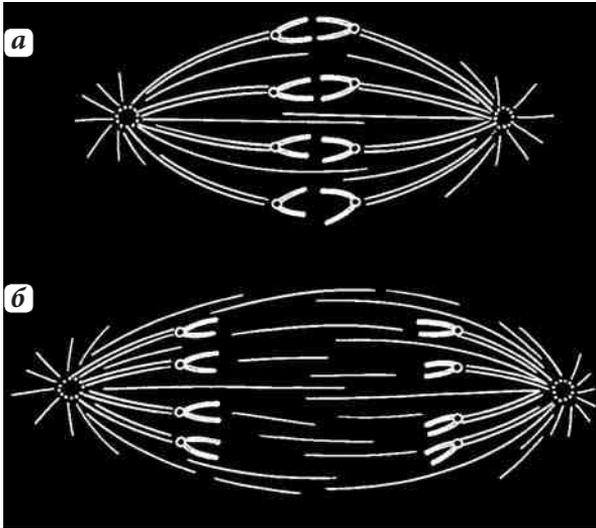


Рис. 23.16. В анафазе протеаза сепараза разрушает когезины в центромерном районе, что позволяет сестринским хроматидам отталкиваться друг от друга

**Анафаза** начинается внезапно, что хорошо можно наблюдать при витальном исследовании. Анафаза начинается с разъединения всех сразу хромосом в центромерных участках. В это время происходит одновременная дегградация центромерных когезинов, которые связывали до этого времени сестринские хроматиды. Такое одновременное отделение хроматид позволяет начать их синхронное расхождение. Хромосомы все вдруг теряют центромерные связки и синхронно начинают удаляться друг от друга по направлению к противоположным полюсам веретена (рис. 23.10, 23.16). Скорость движения хромосом равномерная, она может достигать 0,5–2 мкм/мин. Анафаза — самая короткая стадия митоза (несколько % от всего времени), но за это время происходит целый ряд событий. Главными из них являются сегрегация двух идентичных наборов хромосом и транспорт их в противоположные концы клетки.

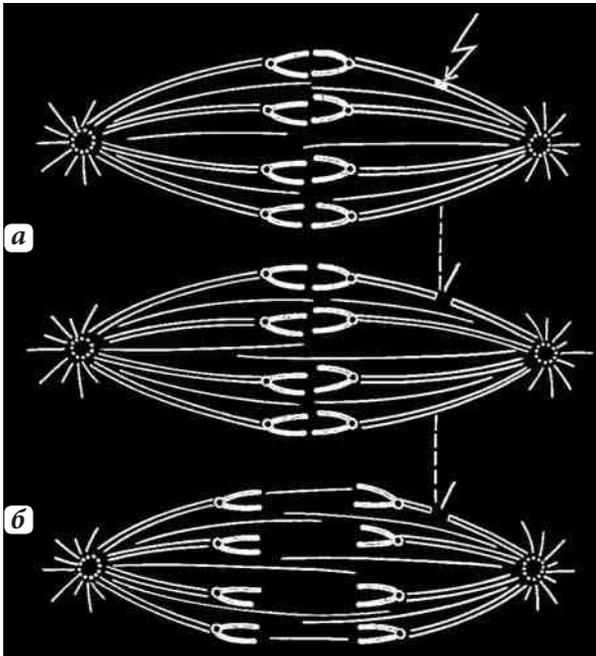
При движении хромосом они меняют свою ориентацию и часто принимают V-образную форму. Вершина их направлена в сторону полюсов деления, а плечи как бы откинута к центру веретена. Если перед анафазой произошел разрыв плеча хромосомы, то во время анафазы оно не будет участвовать в движении хромосом и останется в центральной зоне. Эти наблюдения показали, что именно центромерный участок вместе с кинетохором отвечает за движение хромосом. Создается впечатление, что за центромеру хромосома оттягивается к полюсу.

Собственно расхождение хромосом складывается из двух процессов: **1** — расхождение хромосом за счет кинетохорных пучков микротрубочек, **2** — расхождение хромосом вместе с полюсами за счет удлинения межполюсных микротрубочек.



**Рис. 23.17.** Анафазное расхождение хромосом:

**а** — анафаза А; **б** — анафаза В



**Рис. 23.18.** Хромосомы двигаются к полюсам за счет укорачивания микротрубочек у кинетохоров:

**а** — обесцвечивание пучка флуоресцирующих микротрубочек (стрелки); **б** — хромосома приближается к облученному участку

Первый из этих процессов носит название «анафаза А», второй — «анафаза В» (рис. 23.17).

Во время анафазы А, когда группы хромосом начинают двигаться по направлению к полюсам, происходит укорачивание кинетохорных пучков микротрубочек. Можно было ожидать, что в этом случае деполимеризация микротрубочек должна происходить на их (-)-концах, — концах, ближайших к полюсу. Однако было доказано, что микротрубочки действительно разбираются, но большей частью (80%) с (+)-концов, прилежащих к кинетохорам, а хромосома движется по направлению к (-)-концу микротрубочек, который расположен в зоне центросомы (рис. 23.18). Оказалось, что такое движение хромосом зависит от присутствия АТФ и от наличия достаточной концентрации ионов  $Ca^{2+}$ . То, что в составе короны кинетохора, в которую вмонтированы (+)-концы микротрубочек, обнаружен белок динеин, позволило считать, что именно он является мотором, который подтягивает хромосому к полюсу. Одновременно с этим происходит деполимеризация кинетохорных микротрубочек на (+)-конце (рис. 23.19).

После остановки хромосом у полюсов происходит дополнительное их расхождение за счет удаления полюсов друг от друга (анафаза В). Показано, что при этом происходит

наращивание (+)-концов межполюсных микротрубочек, которые могут значительно увеличиваться в длину. Взаимодействие между этими антипараллельными микротрубочками, приводящее к их скольжению друг относительно друга, определяется другими моторными кинезин-подобными белками. Кроме того, полюса дополнительно подтягиваются к периферии клетки за счет взаимодействия с астральными микротрубочками динеино-подобных белков на плазматической мембране.

Последовательность анафаз А и В и их вклад в процесс расхождения хромосом может быть различным у разных объектов. Так, у млекопитающих стадии А и В протекают практически одновременно.

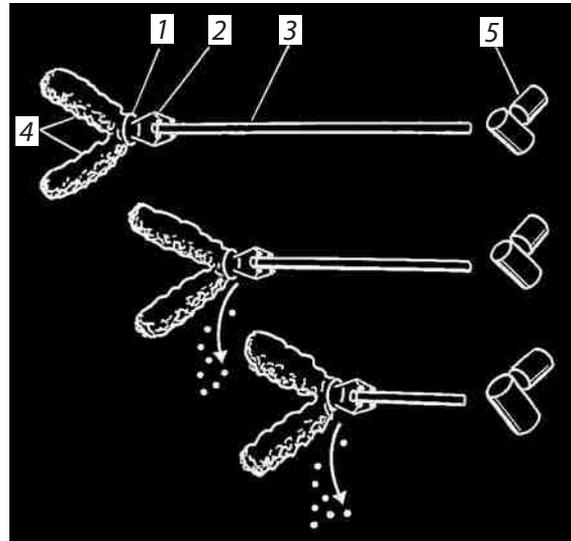
**Телофаза** начинается с остановки хромосом (ранняя телофаза, поздняя анафаза) (см. рис. 23.10в,з) и заканчивается началом реконструкции нового интерфазного ядра (ранний  $G_1$ -период) и разделением исходной клетки на две дочерние (цитокinesis).

В ранней телофазе хромосомы, не меняя своей ориентации (центромерные участки — к полюсу, теломерные — к центру веретена), начинают деконденсироваться и увеличиваться в объеме. В местах их контактов с мембранными пузырьками цитоплазмы начинает строиться новая ядерная оболочка, которая раньше всего образуется на латеральных поверхностях хромосом и позже — в центромерных и теломерных участках. После замыкания ядерной оболочки начинается формирование новых ядрышек. Клетка переходит в  $G_1$ -период новой интерфазы.

В телофазе начинается и заканчивается процесс разрушения митотического аппарата — разборка микротрубочек. Он идет от полюсов к экватору бывшей клетки: именно в средней части веретена микротрубочки сохраняются дольше всего (остаточное тельце).

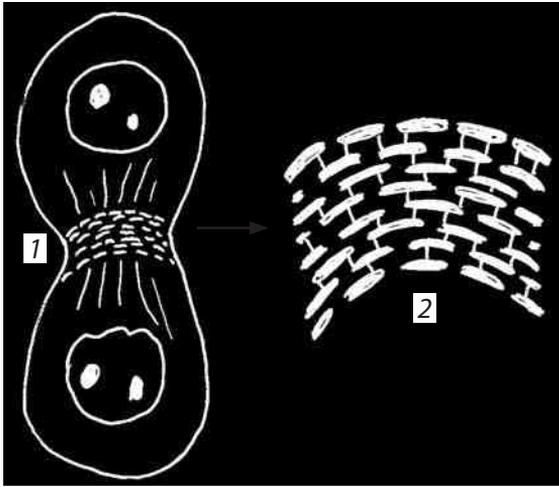
Одно из главных событий телофазы — разделение клеточного тела — **цитотомия**, или **цитокinesis**. Выше уже говорилось, что у клеток животных деление тела клетки происходит путем перетяжки, впячивания плазматической мембраны внутрь клетки.

Митоз не всегда заканчивается разделением тела клетки. Так, в конце митоза не происходит цитотомии у мегакариоцитов, у некоторых кардиомиоцитов и гепатоцитов млекопитающих. В этих случаях образуются двоядерные или многоядерные



**Рис. 23.19.** Схема участия динеиновых молекул в подтягивании хромосомы к полюсу при одновременной разборке микротрубочек:

1 — кинетохор; 2 — динеиновые ручки; 3 — микротрубочка; 4 — плечи хромосомы; 5 — клеточный центр



**Рис. 23.20.** Цитотомия — разделение тела клетки в телофазе — происходит за счет сокращения контрактильного кольца (1), состоящего из пучков актиновых филаментов и миозина II (2)

тра кольца и к появлению вдавления плазматической мембраны, что в конце приводит к перетяжке исходной клетки надвое.

После цитотомии две новые (дочерние) клетки переходят в стадию  $G_1$  клеточного периода. К этому времени возобновляются цитоплазматические синтезы, происходит реставрация вакуолярной системы, диктиосомы аппарата Гольджи снова концентрируются в околоядерной зоне в ассоциации с центросомой. От центросомы начинается отрастание цитоплазматических микротрубочек и восстановление интерфазного цитоскелета.

## 4. Патологические формы митотического деления

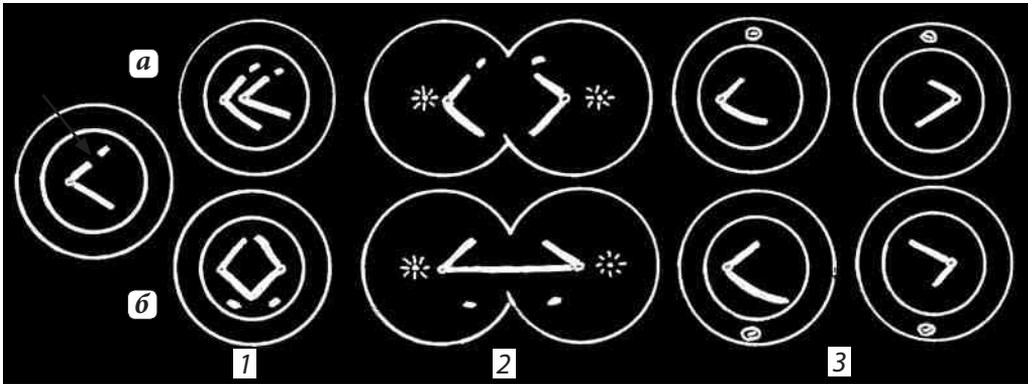
Различные патологические нарушения митотических делений клеток могут встречаться в нормальных естественных условиях, но особенно часто они возникают при воздействиях на клетки химических и физических факторов, при радиационных повреждениях, вирусных инфекциях и др. Большой процент аномалий митоза возникает при действии митотических канцерогенов, митостатиков.

Обычно в нормальных делящихся клетках человека и животных число спонтанных патологических митозов невелико. Так, в эпидермисе мышей встречается 0,3%, а в эпителии гортани и матки человека — около 2% аномалий. Нарушения клеточного деления наблюдаются как среди соматических, так и при мейозе.

Аномалии нормального течения митоза и распределения хромосом между дочерними клетками приводит к возникновению клеток с нарушениями кариотипа. В результате патологических митозов возникают анеуплоидные и мутантные

клетки, что особенно часто наблюдается при клеточных патологиях.

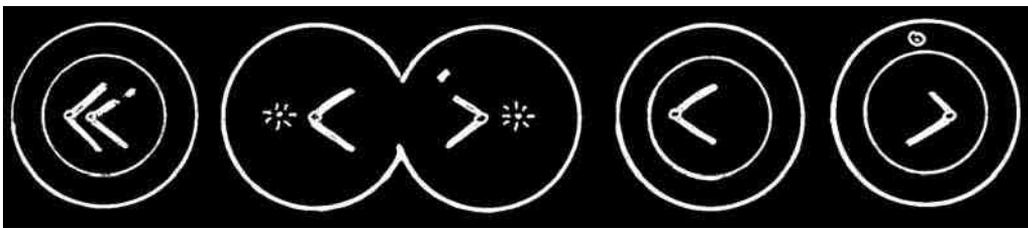
В большинстве случаев закладка перетяжки при делении клеток животных происходит строго в экваториальной плоскости веретена. Здесь в конце анафазы, в начале телофазы, образуется кортикальное скопление микрофиламентов, которые образуют сократимое кольцо (рис. 23.20). В состав микрофиламентов кольца входят актиновые фибриллы и короткие палочковидные молекулы из полимеризованного миозина II. Взаимное скольжение этих компонентов приводит к уменьшению диаметра кольца и к появлению вдавления плазматической мембраны, что в конце приводит к перетяжке исходной клетки надвое.



**Рис. 23.21.** Типы хромосомных aberrаций при одиночном разрыве хромосомы в  $G_1$ -периоде:

**а** — после S-периода обе сестринские хроматиды имеют потери — делеции, а их фрагменты не участвуют в митозе; **б** — то же, но участки разорванных хроматид могут объединяться в дицентрическую хромосому, которая в митозе образует «мост». Фрагменты этих хромосом в следующем  $G_1$ -периоде образуют микроядро

1 — профаза; 2 — анафаза; 3 — интерфаза

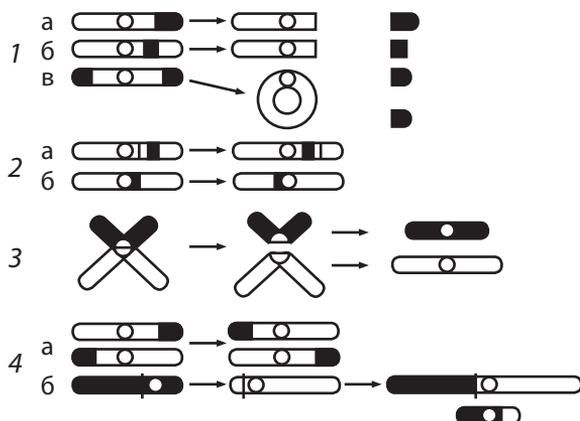


**Рис. 23.22.** Разрыв одной из дочерних хроматид  $G_2$ -периоде приводит к хромосомной aberrации (делеции) в одной из дочерних клеток. Фрагмент хромосомы может превращаться в микроядро

клетки, что приводит к их гибели или развитию ряда заболеваний, в том числе злокачественных опухолей.

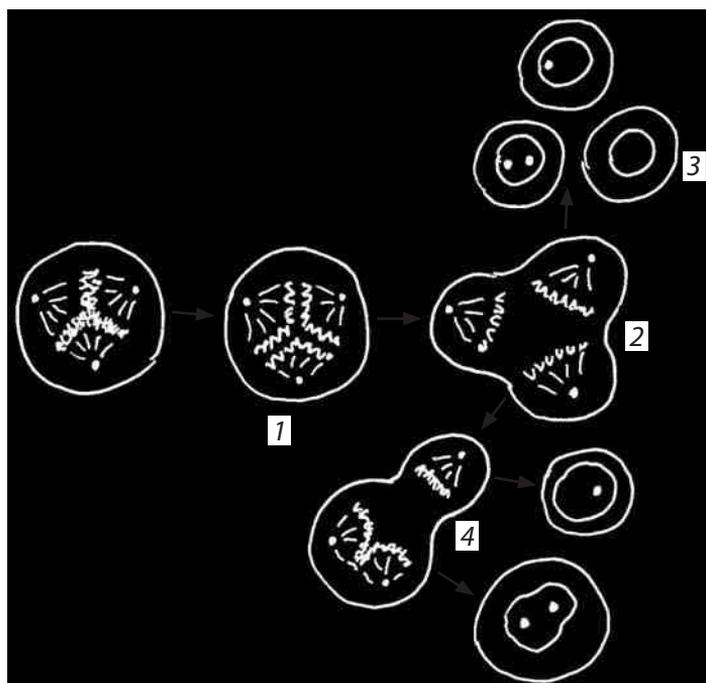
Одна из категорий патологии митоза связана с повреждениями структуры хромосомы — **хромосомными aberrациями**. Большой частью эти изменения происходят в интерфазе, но реализуются в митозе. Повреждения хроматид, возникающие в  $G_1$ -периоде, после репликации хромосом в следующем S-периоде реализуются в виде парных хромосомных aberrаций (рис. 23.21). При интерфазном повреждении хромосом в  $G_2$ -периоде в митозе выявляются aberrации, касающиеся одной из хроматид (рис. 23.22). При этом часто концы разорванных хроматид, потерявших теломерные участки, могут объединяться, образуя дицентрическую хромосому и ацентрический фрагмент. Во время митоза такая дицентрическая хромосома растягивается между митотическими полюсами, образуя **хромосомный мост**, который впоследствии разрывается, а фрагмент без центросомы остается в виде микроядра (см. рис. 23.21).

К категории хромосомных aberrаций относится целая группа нарушений целостности хромосомы. **Делеция** — потеря участка хромосомы. Терминальная делеция, возникающая в результате разрыва плеча хромосомы, не содержащего



**Рис. 23.23.** Наиболее частые формы изменения митотических хромосом:

1. Делеции: а — терминальная; б — интерстициальная; в — образование кольцевой хромосомы при потере обоих теломер;
2. Инверсии (перестановки фрагментов внутри хромосом): а — парацентрическая; б — перичентрическая.
3. Изохромосомы: разрыв в центромерном участке.
4. Транслокации: а — обмен теломерными участками (реципрокный обмен); б — обмен в центромерных участках — робертсоновская транслокация. Мелкий фрагмент обычно теряется



**Рис. 23.24.** Варианты деления трехполюсного митоза: 1 — анафаза; 2 — начало цитотомии; 3 — образование трех анеуплоидных клеток; 4 — образование двух анеуплоидных клеток

центромеры, не участвует в расхождении хромосом во время митоза, а теряется или превращается в микроядро. При *интерстициальных* делециях теряется часть тела хромосомы между двумя разрывами. При потере двух теломерных (терминальных) участков образуются *кольцевые хромосомы*. *Инверсии* — результат двойного

разрыва хромосомы и переориентировки выделенного фрагмента в составе той же хромосомы. *Изохромосомы* возникают, когда одно из плечей удваивается. В результате хромосома может состоять из двух одинаковых коротких или двух длинных плечей, связанных центромерой. При *транслокациях* участок одной хромосомы переносится на другую. При транслокации между двумя акроцентрическими хромосомами при разрыве одной из них в районе центромеры возникают т.н. *робертсоновские транслокации* и образуется одна аберрантная метацентрическая хромосома (рис. 23.23).

Другая категория митотических аномалий связана с изменениями *центросомных структур*, приводящими к появлению многополюсных митотических фигур вместо нормальных биполярных митозов (рис. 23.24). Трицентрические, тетрацентрические, полицентрические митозы могут появляться и спонтанно. Но также как и хромосомные aberrации, *многополюсные митозы* спровоцированы действием многих физических и химических факторов (облучение, действие цитостатиков, меркаптоэтанола, некоторых антибиотиков).

Такие аномальные митотические клетки могут делиться, что приводит к появлению анеуплоидных клеток, часть из которых нежизнеспособна, а часть, содержащая измененный набор хромосом, может превратиться в опухолевые клетки (см. рис. 23.24).

Причиной появления спонтанных или индуцированных многополюсных митозов является преждевременная активация дочерних центриолей в диплосомах (рис. 23.25). Так, если при нормальном митозе в полюсах находится по две центриоли (диплосома), причем активна из них только одна («материнская»), то в случаях многополюсных митозов все центриоли активизируются, стимулируя образование микротрубочек и закладку множественных веретен. При этом не нарушается способность этих избыточных веретен участвовать в расхождении хромосом, что и приводит к образованию анеуплоидных клеток. Сходная картина видна и при образовании многополюсных митозов у полиплоидных клеток (рис. 23.26).

Другая категория патологических митозов связана с *задержкой расхождения* хромосом. К этой категории относятся т.н. К-митозы

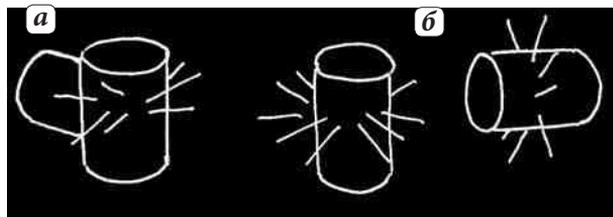


Рис. 23.25. Преждевременная активация дочерней центриоли:

а — нормальная диплосома; б — активация обеих центриолей

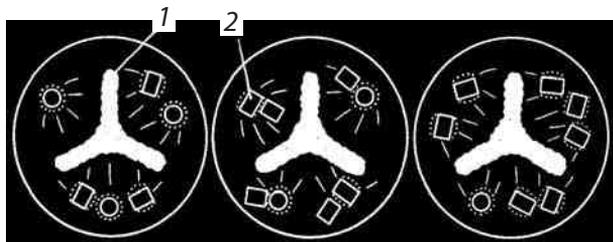


Рис. 23.26. Множественные активированные центриоли в полиплоидных клетках:

1 — хромосомные метафазные пластинки; 2 — диплосомы и отдельные центриоли

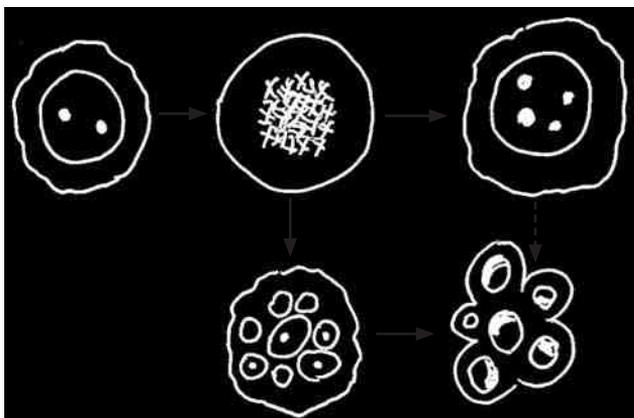


Рис. 23.27. К-митоз и судьба клеток:

1 — исходная клетка; 2 — К-митоз; 3 — образование тетраплоидной клетки; 4 — образование микроядер; 5 — переход в апоптоз

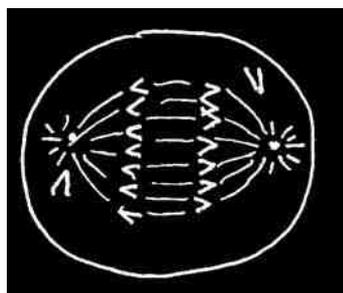


Рис. 23.28. Отставание отдельных хромосом в анафазе

(рис. 23.27). При этом после профазы центросомы не активизируются, веретена не возникают, а хромосомы без всякого порядка располагаются в зоне бывшего ядра. Ядерная оболочка и ядрышко исчезают, а в хромосомах обособляются сестринские хроматиды, связанные друг с другом только в центромерных участках, как в обычной метафазе. Такую же картину можно наблюдать в клетках после воздействия цитостатика колхицина (отсюда название этой формы патологии — К-митоз), который ингибирует полимеризацию тубулина и препятствует росту микротрубочек веретена. После некоторого времени К-митозные хромосомы начинают деконденсироваться или покрываться общей ядерной оболочкой и образуют полиплоидные интерфазные ядра, либо несколько микроядер.

Следующая форма патологии митоза — задержка в метафазе — связана, скорее всего, с инактивацией APC-комплекса активации анафазы (см. ниже). Иногда встречаются картины отделения хромосом от основной группы в анафазе (рис. 23.28). Такого типа нарушения связаны с патологией кинетохоров, неспособных взаимодействовать с пучками микротрубочек митотического веретена.

Наконец, к патологии митоза относятся *нарушения цитотомии*, что связано с аномалиями актиновых филаментов, образующих в норме кольцо в экваториальной зоне клетки, перешнуровывающее ее в телофазе. Известны ингибиторы, которые предотвращают цитотомию за счет связывания и инактивации актиновых мономеров. Это грибной алкалоид цитохалазин и токсин из морских губок лагруксиллин, которые препятствуют полимеризации актина (см. рис. 23.28). Причины естественного предотвращения деления двуядерных гепатоцитов и кардиомиоцитов неизвестны.

Многие нарушения процесса митотического деления клеток приводят к их гибели, к т.н. «митотической катастрофе», к одному из вариантов процесса апоптоза — программируемой клеточной гибели (см. главу 26).

## 5. Деление бактериальных клеток

Помещение этого раздела в материалы, касающиеся деления эукариотических клеток, связано с тем, что необходимо знать особенности деления наших главных биологических врагов — бактерий, чтобы понять, что существует много общего в процессах размножения бактерий с процессами деления клеток высших организмов. Это важно знать для успешной борьбы с бактериальными инфекциями.

Обычно деление бактериальных клеток описывается как «бинарное»: после удвоения нуклеоиды, связанные с плазматической мембраной, расходятся за счет растяжения мембраны между ними, а затем образуется *перетяжка*, или *септа*, делящая клетку надвое. Этот тип деления приводит к очень точному распределению генетического материала, практически без ошибок (менее 0,03% дефектных клеток). Напомним, что ядерный аппарат бактерий, нуклеоид, представляет собой циклическую гигантскую (1,6 мм) молекулу ДНК, образующую многочисленные петлевые домены в состоянии сверхспирализации, порядок укладки петлевых доменов не известен.

Среднее время между делениями бактериальных клеток составляет 20–30 мин. В этот период должен произойти целый ряд событий: репликация ДНК нуклеоида, сегрегация, отделение сестринских нуклеоидов, их дальнейшее расхождение, цитотомия за счет образования септы, делящей исходную клетку надвое.

Весь ряд этих процессов находится под интенсивным вниманием исследователей последних лет, в результате были получены важные и неожиданные наблюдения. Так оказалось, что в начале синтеза ДНК, который начинается с точки репликации (*origin*), обе растущие молекулы ДНК изначально остаются связанными с плазматической мембраной (рис. 23.29). Одновременно с синтезом ДНК происходит процесс снятия сверхспирализации как старых, так и реплицирующихся петлевых доменов за счет целого ряда ферментов (топоизомеразы, гиразы, лигазы и др.), что приводит к физическому обособлению двух дочерних (или сестринских) хромосом-нуклеоидов, которые еще находятся в тесном контакте друг с другом. После такой сегрегации нуклеоидов происходит их расхождение от центра клетки, от места их бывшего расположения. Причем это расхождение очень

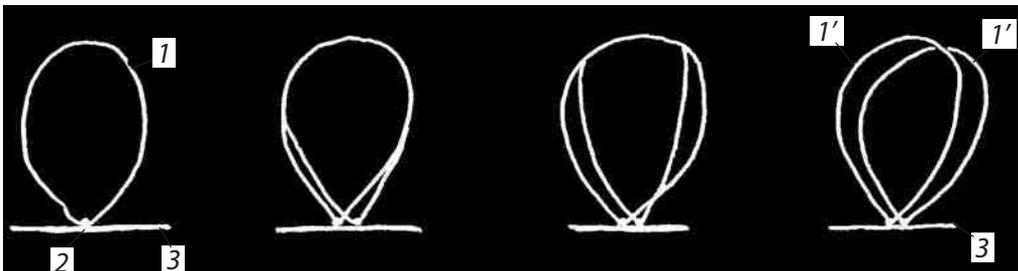


Рис. 23.29. Удвоение бактериальной хромосомы, нуклеоида (1), точка начала репликации (2), остается связанной с плазматической мембраной (3)

точное: на четверть длины клетки в двух противоположных направлениях. В результате этого в клетке располагаются два новых нуклеоида. Каков механизм этого расхождения? Делались предположения (Деламатер, 1953), что деление бактериальных клеток аналогично митозу эукариот, однако данных в пользу этого предположения долгое время не появлялось.

Новые сведения о механизмах деления бактериальных клеток были получены при изучении мутантов, в которых происходили нарушения клеточного деления.

Было обнаружено, что в процессе расхождения нуклеоидов принимают участие несколько групп специальных белков. Один из них, белок Muk B, представляет собой гигантский гомодимер (мол. масса около 180 кДа, длина 60 нм), состоящий из центрального спирального участка, и концевых глобулярных участков, напоминающий по структуре белки эукариот (цепь миозина II, кинезина). На N-конце Muk B связывается с ГТФ и АТФ, а на С-конце — с молекулой ДНК. Эти свойства Muk B дают основания считать его моторным белком, участвующим в расхождении нуклеоидов. Мутации этого белка приводят к нарушениям расхождения нуклеоидов: в мутантной популяции появляется большое количество безъядерных клеток.

Кроме белка Muk B в расхождении нуклеоидов, по-видимому, участвуют пучки фибрилл, содержащих белок Caf A, который может связываться с тяжелыми цепями миозина, подобно актину (рис. 23.30).

Образование перетяжки, или септы, также в общих чертах напоминает цитотомию животных клеток. В данном случае в образовании септ принимают участие белки семейства Fts (фибрилярные термочувствительные). Это группа из нескольких белков, среди которых наиболее изучен белок FtsZ. Этот белок сходен у большинства бактерий, архибактерий, обнаружен в микоплазмах и хлоропластах. Это глобулярный белок, сходный по своей аминокислотной последовательности с тубулином. При взаимодействии с ГТФ *in vitro* он способен образовывать длинные нитчатые протофиламенты. В интерфазе FtsZ диффузно локализуется в цитоплазме, его количество очень велико (5–20 тыс. мономеров на клетку). Во время деления клетки весь этот белок локализуется в зоне септы, образуя сократимое кольцо, очень напоминающее акто-миозиновое кольцо при делении клеток

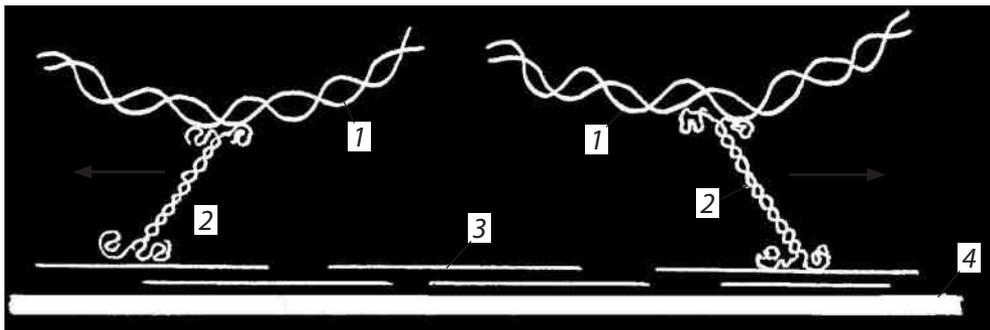
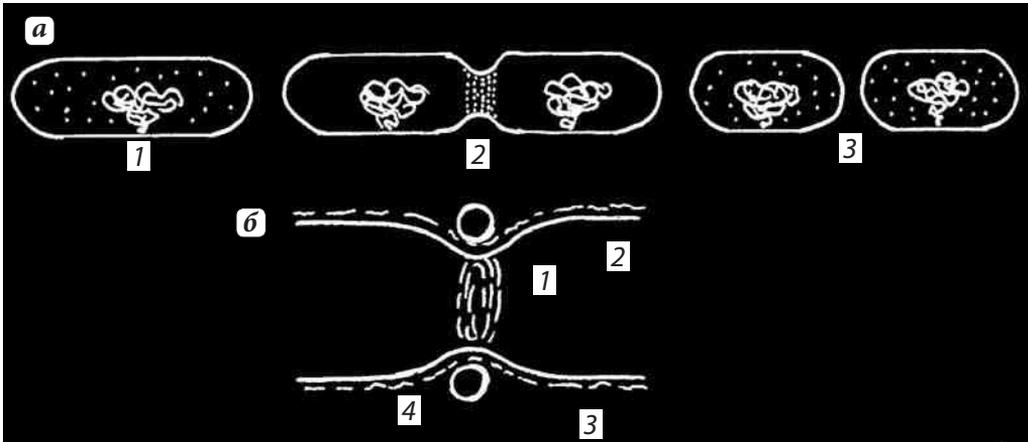


Рис. 23.30. Расхождение бактериальных хромосом:

1 — ДНК нуклеоида; 2 — моторный белок Muk B; 3 — фибриллярный белок Caf A; 4 — плазматическая мембрана



**Рис. 23.31.** Участие белка Fts-Z в образовании клеточной перетяжки при делении бактерии:

**а** — в интерфазе Fts-Z диффузно распределен в цитоплазме (1), при делении он концентрируется в области перетяжки (2); **б** — в зоне перетяжки белок Fts-Z образует сократимое кольцо: 1 — кольцо; 2 — плазматическая мембрана; 3 — клеточная стенка; 4 — PBP-3

животного происхождения (рис. 23.31). Мутации по этому белку приводят к прекращению деления клеток: возникают длинные клетки, содержащие множество нуклеоидов. Эти наблюдения показывают прямую зависимость деления бактериальных клеток от наличия Fts-белков.

Параллельно образованию септы происходит наращивание муреинового слоя бактериальной клеточной стенки за счет работы чувствительного к пенициллину полиферментативного комплекса PBP-3, синтезирующего пептидогликаны.

Таким образом, при делении бактериальных клеток участвуют процессы, во многом сходные с делением эукариот: расхождение хромосом (нуклеоидов) за счет взаимодействия моторных и фибриллярных белков, образование перетяжки за счет фибриллярных белков, образующих сократимое кольцо. У бактерий, в отличие от эукариот, в этих процессах принимают участие совсем иные белки, но принципы организации отдельных этапов клеточного деления очень схожи.

# Глава 24

## Мейоз

Как известно, все представители царства эукариот — от одноклеточных простейших до многоклеточных организмов (включая, конечно, и человека) — начинают свое развитие со стадии объединения женских и мужских половых клеток, отличающихся от других соматических клеток (*soma* — тело) уменьшенным в два раза набором хромосом. И только после слияния таких гаплоидных половых клеток образуется диплоидная клетка — **зигота**, деление которой приводит и к возникновению основной массы соматических клеток, обеспечивающих жизнедеятельность всего организма, и к развитию новых половых клеток для будущего цикла размножения.

Весь сложный путь развития особо дифференцированных половых клеток получил название мейоза.

**Мейоз** (от греч. *meiosis* — уменьшение) — особый способ деления клеток, деление созревания, в результате которого происходит редукция (уменьшение) числа хромосом и переход клеток из диплоидного состояния в гаплоидное. Мейоз — это особый тип дифференцировки, специализации клеток, который приводит к образованию половых клеток. Этот процесс занимает два клеточных цикла при отсутствии синтеза ДНК во втором мейотическом делении. Необходимо отметить, что мейоз представляет собой универсальное явление, характерное для всех эукариотических организмов. При мейозе происходит не только редукция числа хромосом до гаплоидного их числа, но и чрезвычайно важный генетический процесс — обмен участками между гомологичными хромосомами, процесс, получивший название **кроссинговера**.

Существует несколько разновидностей мейоза. **Гаметный тип мейоза**, характерный для млекопитающих, происходит во время созревания гамет — предшественников зрелых половых клеток.

В случае гаметного мейоза характерно при развитии организма выделение клонов **герминативных** клеток, которые впоследствии будут дифференцироваться в половые клетки. И только клетки этих клонов будут при созревании подвергаться мейозу и превращаться в половые клетки. Следовательно, все клетки развивающихся многоклеточных животных организмов можно разделить на две группы: **соматические** — из которых будут образовываться клетки всех тканей и органов, и **герминативные**, которые дадут начало половым клеткам.

Такое выделение герминативных клеток (гоноцитов) обычно происходит на ранних стадиях эмбрионального развития (рис. 24.1). Так, детерминация гоноцитов у рачка циклопа происходит уже на первом делении зиготы: одна из двух клеток дает начало герминальным клеткам. У аскариды герминативные клетки или клетки «зародышевого пути» (А. Вейсман) выделяются на стадии 16 бластомеров,

у дрозофилы — на стадии бластоцисты, у человека — первичные половые клетки (гонобласты) появляются на 3-й неделе эмбрионального развития в стенке желточного мешка в каудальном отделе эмбриона.

Как и все клетки развивающегося организма, **клетки зародышевого пути** диплоидны. Они могут увеличиваться в числе путем обычного митоза, повторяя все стадии обычного клеточного цикла, где происходит чередование уровней количества ДНК и хромосом на клетку:

$$2n (2c) \rightarrow S\text{-период} \rightarrow 4n (4c) \rightarrow 2 \text{ клетки } 2n (2c) \text{ и т.д.}$$

Однако на определенных стадиях развития при половом созревании особей этот обычный ход смены событий меняется. Герминативные клетки превращаются в **гониальные** (оогонии — женские и сперматогонии — мужские клетки — предшественники), и они вступают в процесс мейоза. При этом как для женских, так и для мужских клеток наступает первый цикл мейоза. На этой и следующих стадиях половые клетки получили название **сперматоцитов** и **ооцитов** (I и II порядков).

В первом клеточном цикле мейоза происходит целый ряд событий, который его значительно отличает от обычного клеточного цикла. После вступления в I цикл созревания и сперматоциты I и ооциты I порядков синтезируют ДНК, ее количество удваивается, так же как удваивается за счет репликации количество хромосом. Следовательно, после S-периода эти клетки нужно считать (также как и соматические клетки после синтеза ДНК) тетраплоидными. После короткого G<sub>2</sub>-периода наступает профза I мейотического деления, которая резко отличается от обычной митотической профазы.

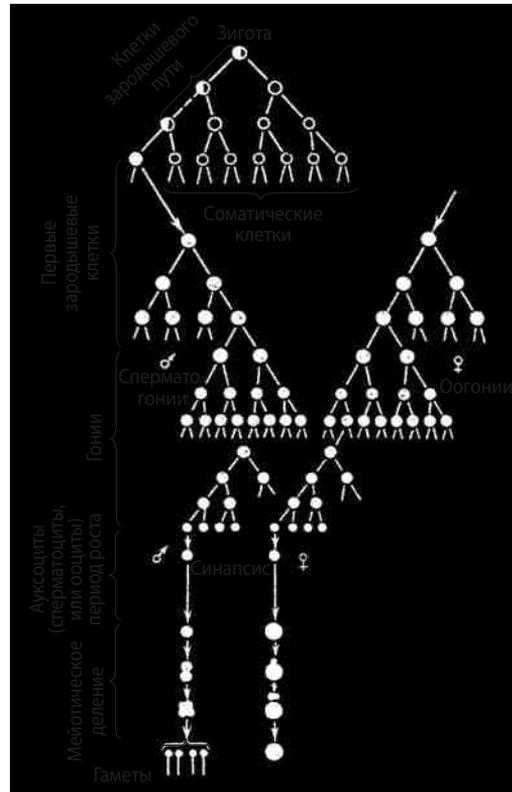


Рис. 24.1. Общая схема зародышевого пути (по Wilson, 1925)

## 1. Особенности профазы I мейотического деления

Во-первых, эта стадия занимает большой отрезок времени (от суток до годов!). Во-вторых, она состоит из нескольких структурно-функциональных фаз (лептотена, зиготена, пахитена, диплотена, диакинез) (рис. 24.2). Далее, в этот период

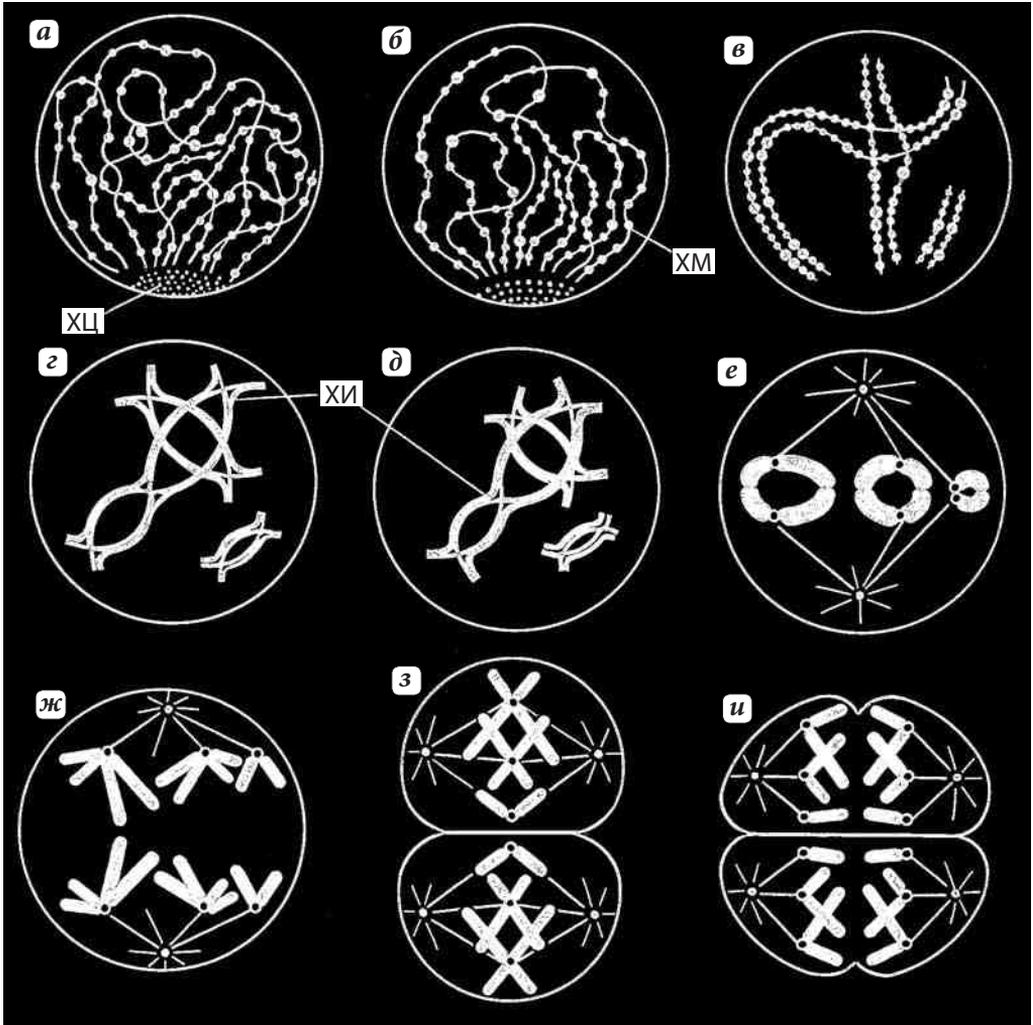


Рис. 24.2. Схематическое изображение стадий мейоза при  $2n=6$  числе хромосом:

**а** — лептотена, **б** — зиготена, **в** — пахитена с тремя бивалентами, **г** — диплотена, **д** — диакинез, **е** — метафаза I, **ж** — анафаза I, **з** — метафаза II, **и** — анафаза II, ХЦ — локализация теломерных участков хромосом в «букете», ХМ — хромомеры, ХИ — хиазма (по О. Hess, 1973)

происходит объединение, **конъюгация**, гомологичных (родительских) удвоенных в результате репликации хроматид в S-периоде предшествующей интерфазы. При этом образуются т.н. **тетрады**, т.е. хромосомные комплексы, состоящие из четырех хроматид (удвоенные материнские и удвоенные отцовские), которые соединены вместе с помощью специальной структуры — **синаптинемного комплекса**. В это же время происходит обмен участками между хроматидами гомологичных хромосом (но не между сестринскими хроматидами одного гомолога) — **кроссинговер**. Кроме того, в процессе конъюгации и обмена происходит синтез примерно 1,5% хромосомной ДНК.

В профазе I мейотического деления наблюдается рост объема ооцитов, в которых накапливаются запасные вещества, обеспечивающие ранние стадии развития будущего зародыша.

Эта профаза отличается длительностью прохождения перечисленных выше событий. Обычная соматическая профаза длится 0,5–1,5 ч. Мейотическая профаза сперматоцита I порядка у самцов мыши длится 12 сут, у человека — 24 дня (плюс еще около двух месяцев до полного созревания сперматозоида). Среди женских половых клеток профаза I порядка тритона обыкновенного длится около 1 года, у мыши от 4 месяцев до 3 лет, у человека профаза I ооцитов начинается на третьем месяце внутриутробного развития и может продолжаться до 50-летнего возраста женщины. При этом у человека происходит постепенная гибель заложенных ооцитов: у 3-месячного эмбриона их около  $7 \cdot 10^6$  клеток, к рождению ребенка их остается около  $2 \cdot 10^6$ , к половому созреванию —  $3 \cdot 10^5$ , всего же созревает (овулируют) примерно  $5 \cdot 10^2$  ооцитов.

Другая особенность профазы I мейоза в том, что в отличие от обычного митоза хромосомы сохраняют ряд функциональных нагрузок, а именно: они способны к синтезу РНК, частичному синтезу ДНК, претерпевают ряд структурных перестроек. Другими словами, профазные хромосомы I мейотического деления не находятся в состоянии функционального покоя, а участвуют в целом ряде событий.

## 2. Стадии профазы I мейотического деления

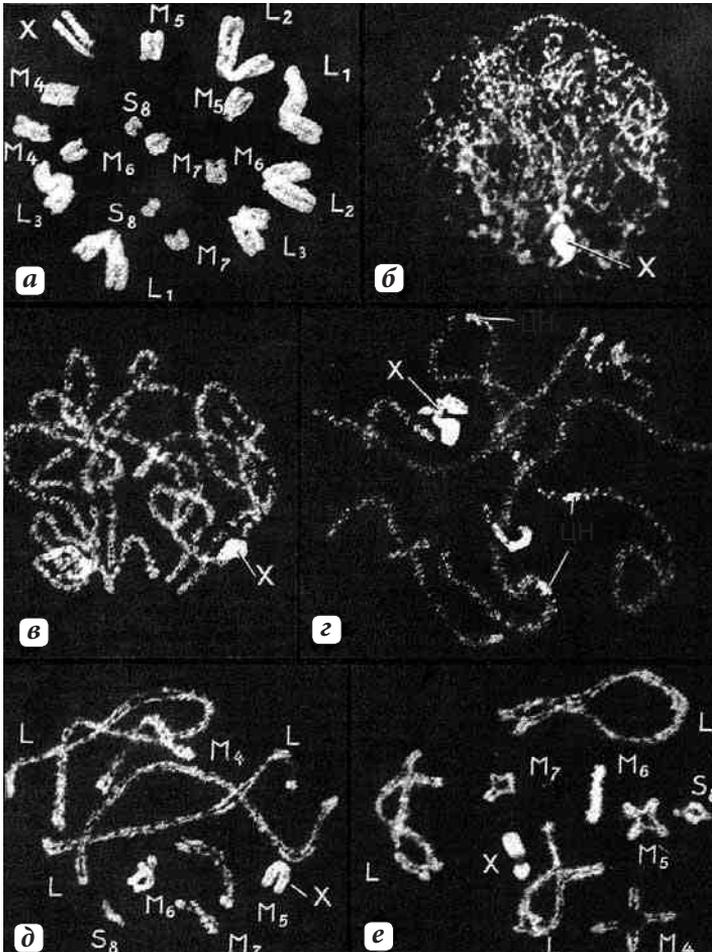
Вся профаза I мейотического деления состоит из нескольких стадий: **лептотена** — стадия тонких нитей (хромосом), **зиготена** — стадия сливающихся (объединяющихся, конъюгирующих) нитей, **пахитена** — стадия толстых нитей, **диплотена** — стадия двойных нитей, **диакинез** — стадия расходящихся нитей (рис. 24.2, 24.3).

Из всех стадий профазы I самой длительной является стадия пахитены, в ряде случаев она занимает до 50% времени.

Так, у человека при спермиогенезе стадии лептотены с зиготеной занимают 6,5 сут, пахатина — 15, диплотена и диакинез — 0,8; По сравнению с обычным митозом продолжительность деления клеток в процессе мейоза несравнимо длительнее. Это особенно наглядно видно при созревании женских половых клеток у животных, у которых яйцеклетки могут останавливаться в развитии на несколько месяцев и даже лет в стадии диплотены профазы I мейотического деления.

**Лептотена**, или стадия тонких нитей, морфологически напоминает раннюю профазу митоза, но отличается тем, что при мейозе ядра обычно крупнее и хромосомы очень тонкие, так что проследить их по всей длине очень трудно (см. рис. 24.3).

Длина каждой мейотической хромосомы на ранних стадиях мейоза может быть в 10–100 раз больше длины соответствующих митотических хромосом. Следовательно, мейотические хромосомы имеют меньшую степень компактизации, они примерно в 30 раз менее компактны, чем хромосомы в метафазе мейоза.



**Рис. 24.3.** Фотографии отдельных стадий мейоза:

**а** — хромосомы сперматогония; **б** — лептотена; **в**, **г** — зиготена; **д** — пахитена; **е** — диплотена

ЦН — центромера, X — хромосома (по О. Hess, 1973)

В лептотене хромосомы удвоены, но сестринские хроматиды в них далеко не всегда удается различить (так же, как в хромосомах в ранней профазе митоза). Таким образом, в лептотене содержится диплоидное количество ( $2n$ ) сдвоенных сестринских хроматид, но общее количество последних, как и при обычном митозе, равно  $4n$  вследствие редупликации в S-периоде.

Расположение хромосом в лептотене часто повторяет телофазную поляризацию ядра. При этом у некоторых животных хромосомы образуют так называемую фигуру «букета» — дугообразно изогнутые сближенные хромосомы, связанные своими теломерами с ядерной оболочкой.

Характерно для лептотены появление на тонких хромосомах сгустков хроматина — хромомеров, которые как бы нанизаны в виде бусинок и располагаются по всей длине хромосомы. Число, размер и расположение таких хромомерных участков характерны для каждой хромосомы.

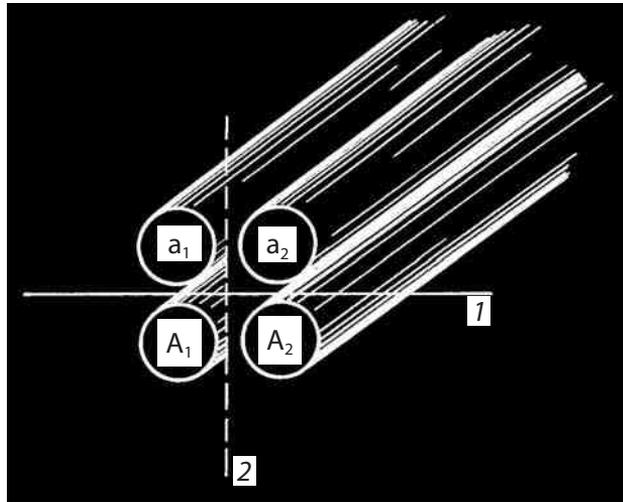
В лептотене начинает выявляться следующий, чрезвычайно важный и характерный для мейоза процесс **конъюгации** гомологичных хромосом, их сближение, которое начинается в теломерных участках, связанных с ядерной оболочкой.

В этих местах образуется сложная специальная структура — тяж белковой природы, **синаптонемный комплекс**, который позже, в зиготене, свяжет гомологичные удвоенные хроматиды по всей их длине.

**Зиготена** — стадия прохождения конъюгации гомологичных хромосом (синапсис) (см. рис. 24.3). При этом гомологичные хромосомы (уже двойные после S-периода) сближаются и образуют новый хромосомный ансамбль, никогда до этого не встречающийся при клеточном делении, — **бивалент**

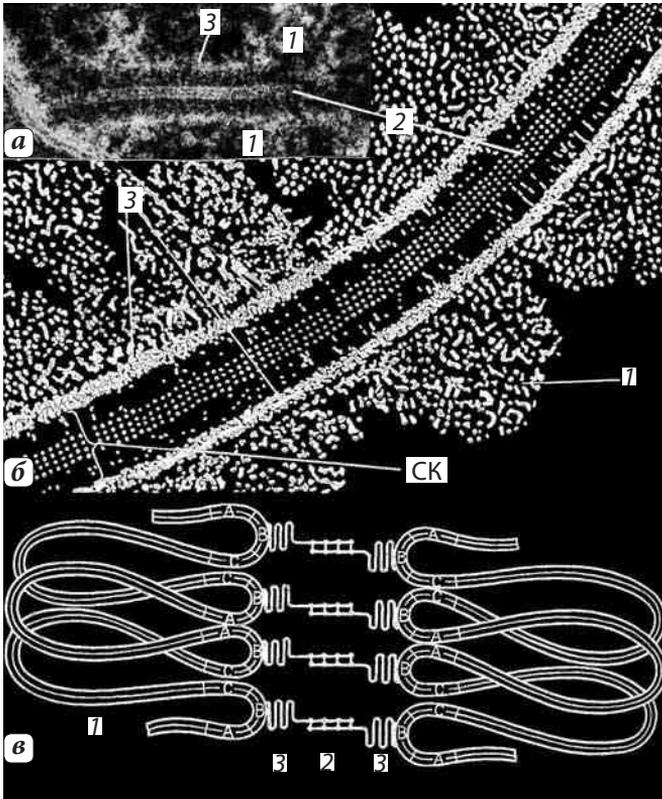
(рис. 24.4). Биваленты — это парные соединения удвоенных гомологичных хромосом, т.е. каждый бивалент состоит из четырех хроматид. Таким образом, число бивалентов на ядро будет равно гаплоидному числу хромосом. Такой порядок объединения виден и на следующей, пахитенной стадии, а на стадии зиготены он только начинается, и видимо именно эта стадия как-то определяет течение данного процесса, во многом еще непонятного. Действительно, как в пространстве ядра хромосомы находят не просто соседа, а только одного специфического гомолога, как они располагаются один около другого — эти вопросы еще до конца не выяснены.

Было найдено, что в отличие от митоза, в профазе мейоза, а именно на зиготенной стадии синтезируется небольшое (0,3% от всей ДНК клетки) количество специфической ДНК, получившей название зДНК (зиготенная ДНК). У лилейных зДНК обогащена Г-Ц парами, состоит из уникальных последовательностей нуклеотидов. Эта ДНК распределена небольшими участками по всей длине хромосом лилии. При обычном митотическом цикле она синтезируется одновременно с основной массой ДНК, но при мейозе — только в зиготенной стадии, т.е. происходит недорепликация именно зДНК. Было обнаружено, что если на стадии зиготены подавить с помощью ингибиторов этот небольшой дополнительный синтез ДНК, то конъюгация хромосом прекратится. На основании полученных данных было сделано предположение, что специфические по своему строению участки зДНК на гомологичных хромосомах еще на G2-стадии интерфазы ооцита «узнают» друг друга и на некоторое время образуют стабильные связи, необходимые для закрепления хромосом одну вдоль другой. Позднее эта связь осуществляется уже с помощью иной структуры, а именно с помощью **синаптонемного комплекса** (рис. 24.5). Объединение гомологов чаще всего начинается в теломерах и центромерах. В этих местах,



**Рис. 24.4.** Строение бивалента:  $a_1$ - $a_2$  и  $A_1$ - $A_2$  — сестринские хроматиды (по Кикнадзе и Высоцкой, 1975).

1 — плоскости расхождения хроматид в I делении; 2 — то же во II делении



**Рис. 24.5.** Синаптонемный комплекс (СК):

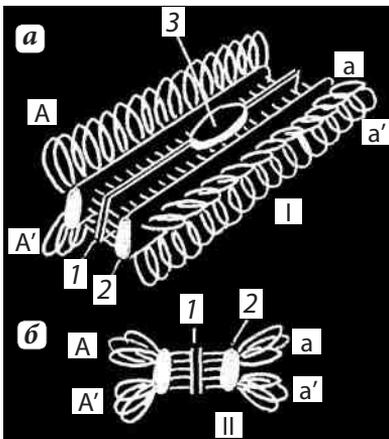
**а** — фрагмент СК в электронном микроскопе; **б** — схема; **в** — модель:

1 — хроматин сестринских хромосом, 2 — осевой элемент, 3 — боковые элементы (SCP)

а позднее и в других по всей длине соединяющихся хромосом происходит сближение осевых тяжей на расстояние около 100 нм, между ними образуются связки, и так происходит формирование полной структуры синаптонемного комплекса. По мере сближения и связывания гомологов этот комплекс растет подобно тому, как действует застежка «молния»: две ленты объединяются в одну. В конце зиготены все гомологи не только нашли друг друга,

но и тесно объединились с помощью синаптонемной структуры (рис. 24.6).

Синаптонемный комплекс (СК) встречается практически у всех представителей эукариот, которые обладают половым процессом. Он обнаружен у простейших, водорослей, низших и высших грибов, у высших растений и у



**Рис. 24.6.** Схема участка пахитенной хромосомы и СК:

**а** — общий вид; A, A' — сестринские хромосомы одного гомолога; a, a' — сестринские хромосомы второго гомолога; 1 — осевой элемент; 2 — боковой элемент; 3 — рекомбинационный узелок

**б** — вид в поперечном разрезе

животных. По своей морфологии он имеет вид трехслойной ленты, состоящей из двух боковых компонентов — тяжей (толщиной 30–60 нм), центрального осевого элемента (толщиной 10–40 нм); боковые компоненты отстоят друг от друга на 60–120 нм, общая ширина комплекса 160–240 нм. Материал хромосом располагается снаружи от боковых элементов. Каждый боковой элемент связан с петлями двух сестринских хроматид одного гомолога. Большая часть ДНК этих хроматид находится вне СК, и лишь менее 5% геномной ДНК входит в его состав, прочно ассоциируясь с белками СК. В состав этой ДНК входят уникальные и умеренно повторяющиеся последовательности нуклеотидов. Белковый состав СК сложен, он состоит более чем из 10 мажорных белков с молекулярными массами от 26 кДа до 190 кДа. Это т.н. SCP-белки.

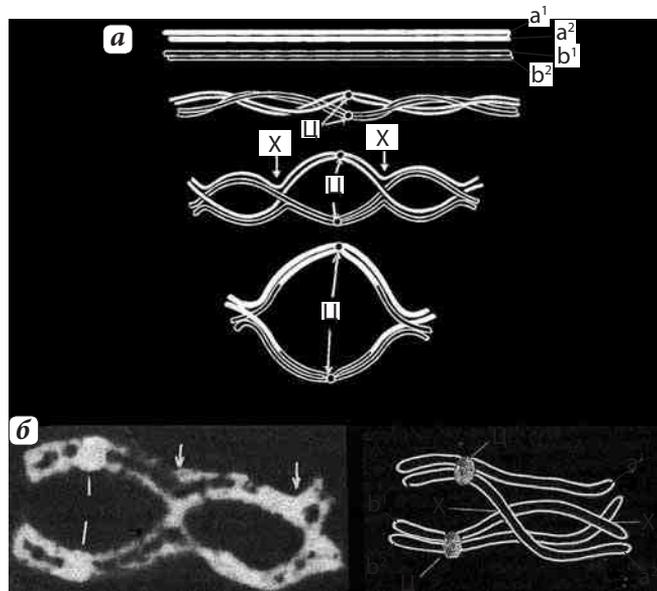
Полное сближение бивалентов и их скрепление с помощью СК происходит на следующей стадии, на стадии пахитены.

**Пахитена** — стадия толстых нитей (см. рис. 24.2). Называется так потому, что благодаря полной конъюгации гомологов профазные хромосомы как бы увеличились в толщине. Число таких толстых пахитенных хромосом гаплоидно ( $1n$ ), но они состоят из двух объединившихся гомологов, каждый из которых состоит из двух сестринских хроматид. Следовательно, и здесь количество ДНК равно  $4c$ , а число хроматид —  $4n$ .

На этой стадии происходит второе, чрезвычайно важное событие, характерное для мейоза — **кроссинговер**, взаимный обмен идентичными участками по длине гомологических хромосом.

Генетическим следствием кроссинговера является рекомбинация сцепленных генов. Здесь возникают отличные от исходных хромосомы, содержащие отдельные участки, пришедшие от их гомологов. Морфологически этот процесс в пахитене уловить нельзя. Но в дальнейшем, в диплотене, когда начинают расходиться биваленты, они остаются связанными в нескольких точках, **хиазмах**, которые считают соответствующими местам обмена (рис. 24.7).

Было обнаружено, что в пахитене также происходит синтез небольшого количества ДНК (1% от



**Рис. 24.7.** **а** — кроссинговер — обмен участками гомологических хромосом — морфологически выявляется начиная с диплотенной стадии, когда начинается расхождение бивалентов, при этом в местах обмена выявляются хиазмы:  $x$  — хиазмы,  $ц$  — центромеры,  $a^1$   $a^2$ ,  $b^1$   $b^2$  — хроматиды; **б** — вид диплотенной хромосомы, состоящей из 4-х хроматид;  $X$  — хиазма

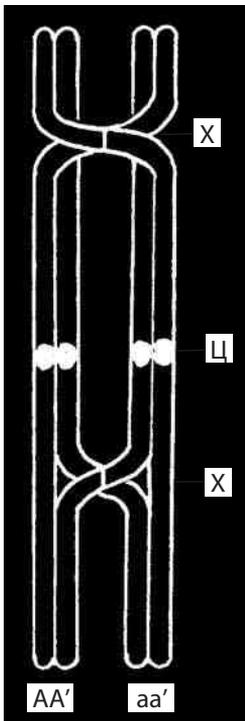
гена), отличающейся тем, что она содержит повторяющиеся последовательно-сти нуклеотидов. Но этот синтез репаративен, в результате его не образуются дополнительные или недостающие количества ДНК, а происходит восстановление утраченных участков ДНК при обмене между конъюгированными хроматидами. Весь процесс объединения и обмена между ДНК несестринских хроматид гомологов можно представить следующим образом. По длине хромосомы разбросаны участки повторяющихся последовательностей ДНК, которые при разрывах с помощью специальных ферментов легко могут образовать гибридные молекулы. Сшивание и восстановление целостности молекул с помощью специальных репаративных ферментов приводит к включению предшественников в ДНК на стадии пахитены. По всей вероятности, в этом процессе принимает участие т.н. **рекомбинационный узелок** — большой белковый ансамбль величиной около 90 нм. Он располагается в синаптонемном комплексе между гомологичными хромосомами, его расположение совпадает с местами хиазм, где происходит кроссинговер. В конечном результате в мейозе после второго деления произойдет не только образование гамет с гаплоидным числом хромосом, но в каждой гамете могут быть хромосомы иных свойств, чем в исходных клетках.

В пахитенной стадии начинается активация транскрипционной активности хромосом. Именно в это время в женских половых клетках происходит амплификация рибосомных генов, что приводит к появлению дополнительных ядрышек. На этой же стадии начинают активироваться некоторые хромомеры и изменяется структура хромосом; они приобретают вид «ламповых щеток» («ершиков» для чистки посуды). Особенно отчетливо эти изменения видны на стадии диплотены.

**Диплотена** — стадия двойных нитей (см. рис. 24.3). На этой стадии мейоза происходит отталкивание гомологов друг от друга, которое часто начинается в зоне центромер. Но при этом пары сестринских хроматид каждой гомологичной хромосомы остаются соединенными между собой в центромерных районах и по всей длине. В это время сестринские хроматиды отчетливо выявляются в световом микроскопе. По мере отталкивания хромосом в бивалентах хорошо видны **хиазмы** — места перекреста и сцепления хромосом. Только в этих участках сохраняется структура синаптонемального комплекса; в разошедшихся районах он исчезает. Расположение хиазм может быть различным у разных видов на разных хромосомах. Более длинные хромосомы имеют больше хиазм, чем короткие, но и самые короткие могут иметь одну хиазму на бивалент.

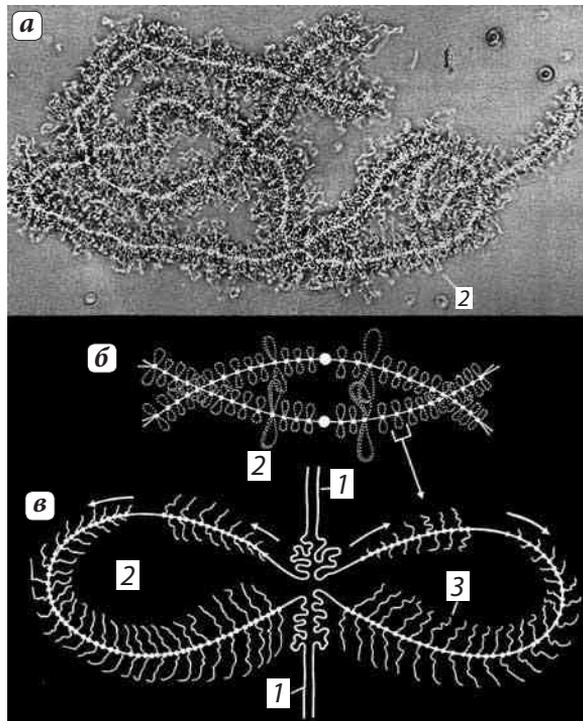
В диплотенной стадии происходит некоторое укорачивание и конденсация хромосом, в результате чего отчетливо выявляется их 4-нитчатая структура. В зоне хиазм при этом видно, что в перекрест вовлекаются только две хроматиды из четырех — по одной от каждого гомолога (рис. 24.8).

На этой стадии хромосомы приобретают вид «ламповых щеток» (рис. 24.9). На выделенных хромосомах этой стадии видно, что каждый гомолог в биваленте окружен как бы войлоком, состоящим из петлистых нитчатых структур. При этом было обнаружено, что петли парносимметричны, и каждая пара отходит от хромомера, расположенного на хромосомной оси. Эта ось не что иное, как



**Рис. 24.8.** Спаренные гомологичные хромосомы перед I мейотическим делением: в результате образования двух хиазм и кроссинговера образовались четыре разные хроматиды:

AA' и aa' — сестринские хроматиды разных гомологов; ц — центромера; х — хиазмы



**Рис. 24.9.** Хромосомы типа «ламповых щеток».

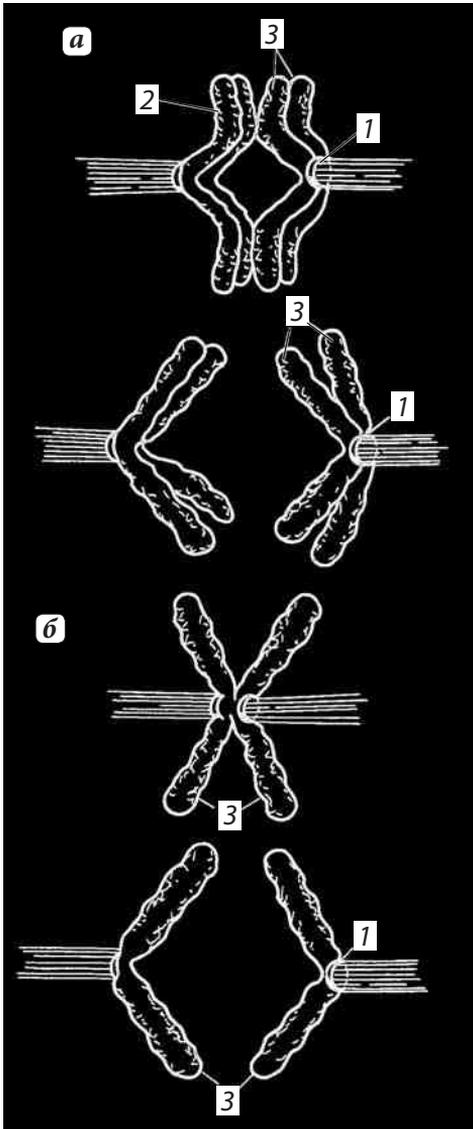
**а** — световая микроскопия выделенной диплотенной хромосомы ооцита амфибии; **б, в** — схематические изображения:

1 — хроматиды; 2 — латеральные петли; 3 — рибонуклеопро-теиды

две спаренные сестринские хроматиды, а хромомеры — это двойные участки конденсированного хроматина, петли же представляют собой деконденсированные участки активного, функционирующего хроматина. Характерно то, что они содержат большие количества РНК, которая здесь же и синтезируется. Эта РНК относится по своим характеристикам к информационной.

Наличие активных хромосом в диплотене резко отличает мейоз от митоза, где, начиная с профазы, полностью прекращается синтез РНК. Активация транскрипции в пахитене и особенно в диплотене часто совпадает с ростом формирующихся половых клеток, что особенно характерно для ооцитов. Как раз в это время клетка интенсивно синтезирует и запасает белки, необходимые для обеспечения ранних стадий развития зародыша. Для этого происходит синтез огромного количества рибосом на амплифицированных ядрышках и информационной РНК на боковых петлях хромосом.

**Диакинез** характеризуется уменьшением числа хиазм, укорочением бивалентов, потерей ядрышек. Биваленты приобретают более компактную форму, места соединения гомологичных хромосом оказываются расположенными на их концах



**Рис. 24.10.** Расхождение хромосом в I делении мейоза (а) и во II делении мейоза (б):

1 — кинетохор и его микротрубочки; 2 — хиазма;  
3 — сестринские хроматиды

терминально. Хромосомы теряют связи с ядерной оболочкой. Эта стадия является переходной к собственно делению клетки. В метафазе I деления мейоза биваленты выстраиваются (как и полагается для метафазы) в экваториальной плоскости веретена.

В анафазе I деления совершается еще одно важнейшее событие — расхождение хромосом. Но, в отличие от митоза, расходятся не сестринские хроматиды, а гомологичные хромосомы, состоящие из двух сестринских хроматид (рис. 24.10). Если оценивать события этой фазы, то видно, что при анафазе по разным клеткам расходятся аллельные гены, располагающиеся в разных гомологах. Распределение же гомологов по клеткам совершенно случайное, так что происходит смешение, рекомбинация хромосом из разных пар. Если оценивать образовавшиеся хромосомные наборы, то оба они содержат по  $2c$  количества ДНК и по  $2n$  числа хроматид, ибо каждая хромосома в паре гомологов состоит из двух хроматид. В этом отношении редукции числа хромосом (хроматид) еще не произошло, но в два раза произошло уменьшение генетической разнородности, так как теперь в каждом хромосомном наборе нет аллельных генов.

### 3. Второе мейотическое деление

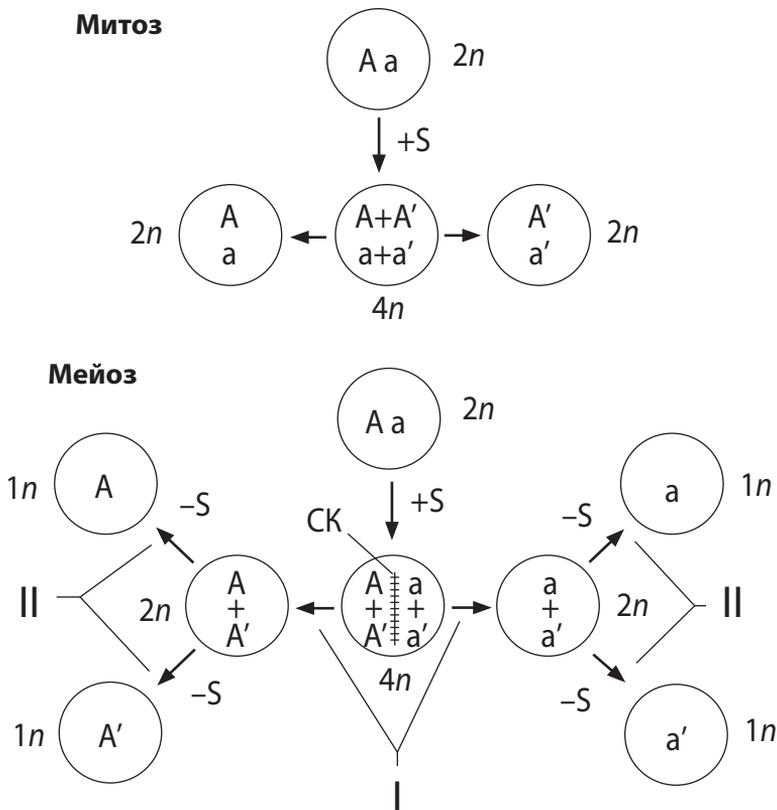
Вслед за телофазой I деления следует короткая интерфаза, в которой **не происходит синтеза ДНК**, и клетки присту-

пают к следующему делению, которое по морфологии и последовательности не отличается от митотического деления: парные сестринские хроматиды, связанные в центромерных участках, проходят профазу и метафазу; в анафазе они разъединяются и расходятся по одной в дочерние клетки. Таким образом, при II мейотическом делении клетка с  $2c$  количеством ДНК и  $2n$  числом хроматид, делясь,

дает начало двум клеткам с гаплоидным содержанием ДНК и хромосом. В отношении числа структурных единиц, хроматид, II деление мейоза является редукционным. Однако термин «редукционный» употребляется также и в общегенетическом смысле и относится к расщеплению аллелей, и в этом смысле редукционным является I деление мейоза, когда в клетки попадает по одной из аллелей (рис. 24.10б).

В результате всего процесса мейоза после двух делений из одной клетки образуются четыре гаплоидных, каждая из которых отличается по своей генетической конституции (рис. 24.11).

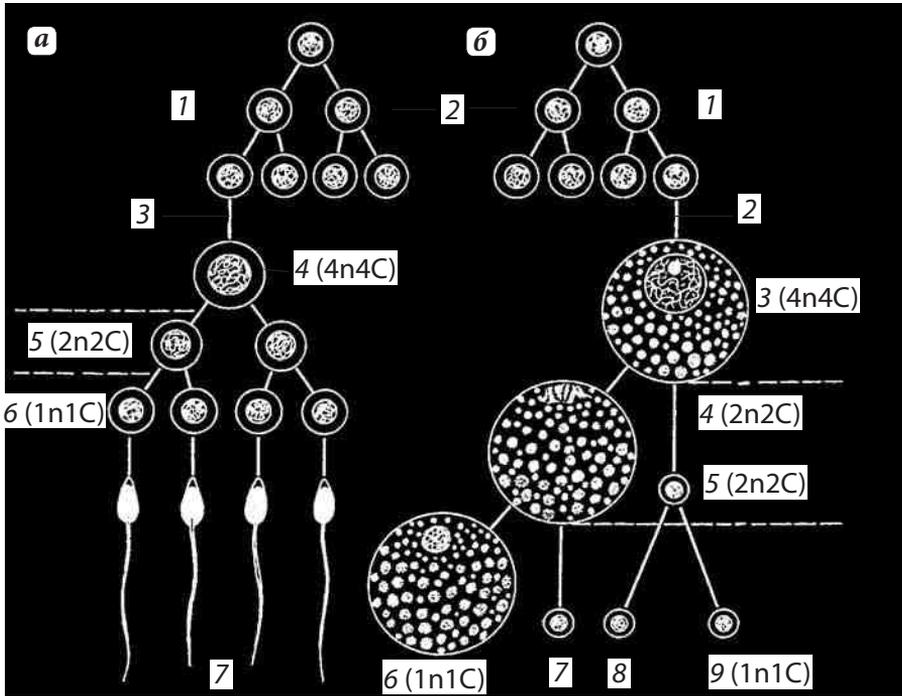
Как во время митоза, так и при расхождении хромосом в I и II делении мейоза происходит случайное распределение хромосом по дочерним клеткам. Это и создает генетическое разнообразие в возникающих гаплоидных половых клетках. Так, например, в диплоидных клетках с числом хромосом равным двум после мейоза образуется 4 различные клетки. Т.е. число вариантов будет равно  $2^n$ . У человека



**Рис. 24.11.** Судьба гомологичных хромосом (A и a) в митозе и мейозе:

S-синтез ДНК, СК — синаптонемный комплекс; I — первое мейотическое деление, II — второе мейотическое деление;

n — плоидность



**Рис. 24.12.** Сравнение гаметогенеза у самцов (а) и самок (б).

**а:** 1 — сперматогонии, 2 — митозы, 3 — рост, 4 — первичные сперматоциты ( $4n4c$ ), 5 — вторичные сперматоциты ( $2n2c$ ), 6 — сперматиды ( $1n1c$ ), 7 — сперматозоиды;

**б:** 1 — оогонии, 2 — рост, 3 — ооцит ( $4n4c$ ), 4 — ооцит после I деления ( $2n2c$ ), 5 — первое полярное (направительное) тельце ( $2n2c$ ), 6 — зрелый ооцит ( $1n1c$ ), 7–9 — вторые (направительные) тельца ( $1n1c$ )

же после мейоза может возникнуть несколько миллионов различающихся клеток, даже если будет исключен кроссинговер, который увеличит это разнообразие еще во много раз.

Завершение мейоза для мужских и женских гонцитов различное. При мейозе сперматогониев возникают 4 одинаковых по размеру сперматоцита, которые затем дифференцируются в сперматозоиды.

При мейозе оогоний картина иная. Первое деление созревания (I мейотическое деление) приводит к тому, что от большого ооцита отделяется мелкая клетка — направительное тельце. При II делении происходит также неравное деление: от ооцита отделяется второе направительное тельце, а первое также делится. Поэтому возникают четыре клетки: крупная зрелая яйцеклетка и три мелких направительных тельца, которые быстро дегенерируют (рис. 24.12).

# Глава 25

## Регуляция клеточного цикла

Клеточный цикл представляет собой однонаправленный процесс, где клетка последовательно проходит разные его периоды, без их пропуска или возврата к предыдущим стадиям. Вступив в клеточный цикл, клетка его заканчивает синтезом ДНК и делением клетки (рис. 25.1).

Однако, как уже говорилось, клетки могут выходить из цикла, переходить в стадию покоя, или в  $G_0$ -стадию. В многоклеточных организмах многие клетки теряют способность к пролиферации, к размножению, теряют способность переходить из стадии покоя в новую стадию пролиферации, в  $G_1$ -стадию, которая начинает путь клетки к ее делению. К таким клеткам относятся нейроны, кардиомиоциты, клетки хрусталика и многие другие. Существуют также органы с редко делящимися клетками; так, например, клетки печени могут входить в клеточный цикл через несколько месяцев покоя. Быстро размножающиеся клетки взрослых организмов, такие как кроветворные, или базальные клетки эпидермиса и тонкой кишки могут входить в клеточный цикл каждые 12–36 ч. Самые короткие клеточные циклы, около 30 мин, наблюдаются при быстром дроблении яиц низших организмов (иглокожие, земноводные). В экспериментальных условиях короткий (20 ч) клеточный цикл имеют многие линии клеточных культур.

Что определяет вступление клеток в пролиферацию и что определяет закономерную последовательность смены периодов клеточного цикла — эти вопросы долгое время оставались без ответа.

Считалось, что для начала вступления в клеточный цикл необходим рост живой массы клетки, образование веществ для деления, в частности ДНК и белка, создания определенного уровня энергетических запасов и т.д.

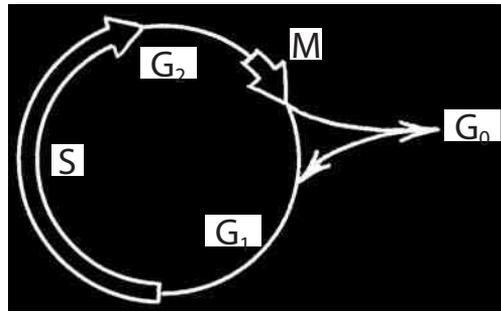
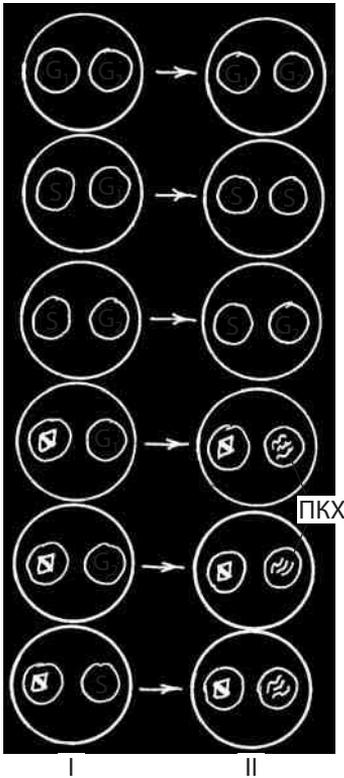


Рис. 25.1. Схема клеточного цикла

### 1. Фактор стимуляции митоза

Расшифровка регуляции процессов клеточного деления началась в 70-е годы прошлого века, когда были найдены методы слияния разных клеток, методы получения гетерокарионов (о них см. главу 2). Оказалось, что можно получить слияние



**Рис. 25.2.** Влияние в гетерокарионах цитоплазмы клеток-реципиентов (слева) из разных стадий клеточного цикла на судьбу донорских ядер (справа), взятых из разных стадий клеточного цикла других клеток.

I. Исходная композиция гетерокарионов: слева ( $G_1$ , S) — ядра реципиентов; М — митоз; справа — донорские ядра на стадиях  $G_1$ ,  $G_2$ , S.

II. Изменения в структуре донорских ядер тех же гетерокарионов. ПКХ — преждевременно конденсированные хромосомы

не только интерфазных клеток с интерфазными, но и интерфазных с митотическими клетками. При этом обнаружилось удивительное явление: в такой гибридной клетке, где были митотические хромосомы одной из исходных клеток, в ядрах от интерфазных клеток начиналась конденсация хромосом, разрушалась ядерная оболочка и образовывались т.н. преждевременно конденсированные хромосомы (ПКХ или РСС — preliminary condensed chromosomes). Причем структура ПКХ зави-

села от стадии интерфазного ядра: в ядре от  $G_1$  клетки появлялись одонитчатые длинные ПКХ, в ядре от  $G_2$  клетки ПКХ были двойными (т.к. после S-периода хромосомы удвоились). Эти наблюдения наводили на мысль, что при слиянии таких клеток на интерфазные ядра действуют какие-то факторы, содержащиеся в митотических клетках.

Для проверки этого предположения были поставлены опыты со слиянием клеток на разных стадиях клеточного цикла (рис. 25.2, табл. 16).

Эти эксперименты были дополнены тем, что часть цитоплазмы митотической клетки инъецировали в цитоплазму  $G_1$ -интерфазной клетки. Это приводило к появлению в ядре интерфазной клетки ПКХ (рис. 25.3). Из этих наблюдений был сделан вывод о том, что в цитоплазме митотической клетки есть **фактор** (или факторы), **стимулирующий митоз** (ФСМ или MPF — *mitosis promoting factor*).

**Таблица. 16.** Результаты слияния клеток на разных стадиях ( $G_1$ , S,  $G_2$ , М) клеточного цикла

Исходные клетки	Гетерокарион
$G_2 + G_1$	Нет влияния
$S + G_1$	Синтез ДНК
$S + G_2$	Нет влияния
$M + G_1$	М (ПКХ)
$M + S$	М (ПКХ)
$M + G_2$	М (ПКХ)

Этот фактор вызывает не только конденсацию хромосом, но и приводит к распаду ядерной оболочки, т.е. переводит интерфазную клетку, даже без синтеза ДНК, в митотическое состояние (конечно, дальнейшего развития конденсированных хромосом развитие митоза не идет).

Параллельно с этими наблюдениями были проведены эксперименты на созревающих и дробящихся яйцеклетках лягушек *X. laevis* (рис. 25.4). Ооцит *X. laevis* после репликации ДНК и короткой  $G_2$ -стадии переходит в мейотическую профазу I, во время которой в течение 8 месяцев происходит рост и созревание ооцита, он достигает до размера зрелой икринки. При спаривании овариальные клетки самки выделяют гормон прогестерон, который стимулирует переход из профазы в I мейотическое деление (митоз I), затем после короткой интерфазы наступает II мейотическое деление, которое на некоторое время останавливается на стадии метафазы (стадия яйца). При оплодотворении спермием метафаза завершается, происходит второе деление мейоза, после чего гаплоидное ядро яйцеклетки сливается с ядром спермия, и образуется диплоидная зигота. После этих событий следуют через каждые 30 мин многочисленные деления клеток развивающейся бластулы (рис. 25.4а).

Если взять с помощью микроманипулятора небольшую часть цитоплазмы из ооцита на стадии метафазы II мейотического деления и инъецировать ее в цитоплазму не стимулированного прогестероном ооцита, то произойдет повторение описанного выше процесса: ооцит вступит в I деление мейоза, а затем и во

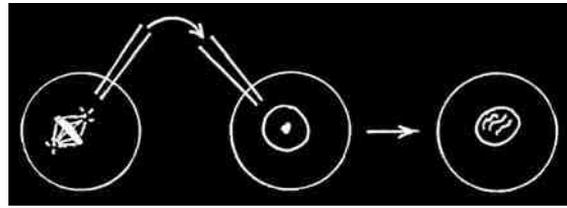


Рис. 25.3. Инъекция части цитоплазмы из митотических клеток вызывает в интерфазной клетке появление ПКХ

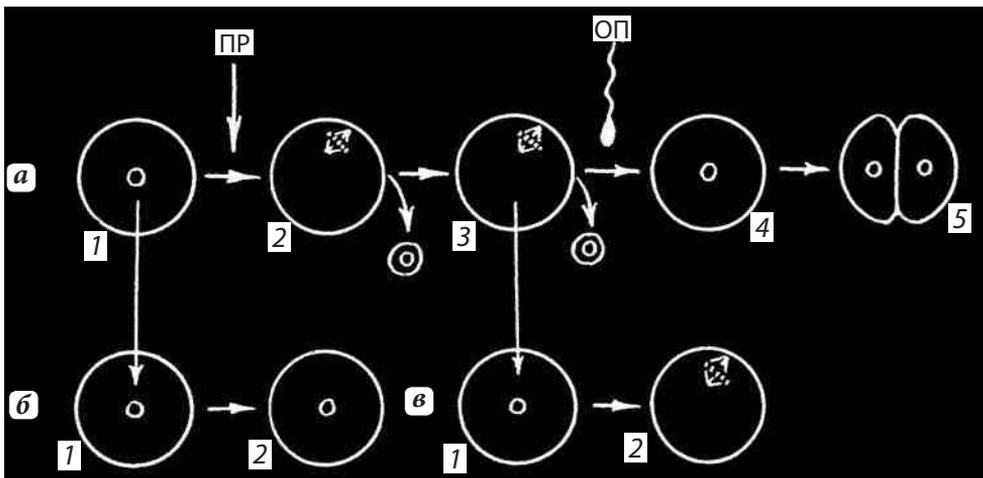


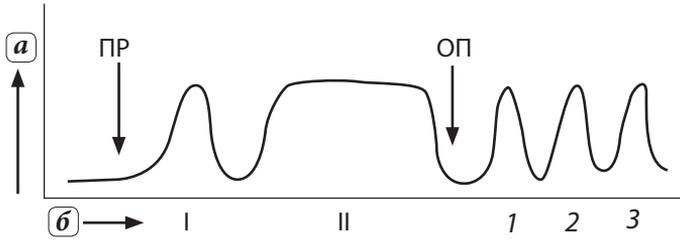
Рис. 25.4. Обнаружение фактора стимуляции созревания (MPF) ооцита *Xenopus*:

**а** — нормальное развитие: 1 — ооцит на стадии профазы I деления; 2 — ооцит на стадии I метафазы; 3 — ооцит на стадии II метафазы; 4 — зигота; 5 — I деление дробления.

Пр — стимуляция прогестероном; оп — оплодотворение;

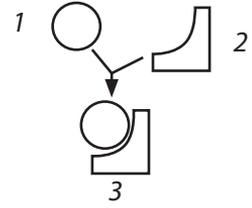
**б** — инъекция цитоплазмы из неделящейся яйцеклетки в такую же не вызывает созревания — перехода в метафазу;

**в** — инъекция цитоплазмы из метафазной клетки в неделящуюся индуцирует ее переход в метафазу (созревание ооцита)



**Рис. 25.5.** Колебание уровня МРФ в процессе мейотических и митотических делений при созревании и дроблении яйцеклетки *Xenopus*:

**а** — уровень МРФ; **б** — время развития; пр — стимуляция прогестероном; оп — оплодотворение; I — метафаза I мейоза; II — длительная метафаза II мейоза; 1, 2, 3 — деления дробления зиготы



**Рис. 25.6.** Структура фактора стимулирующего митоз (MPF):

1 — циклин, 2 — зависящая от циклина неактивная протеинкиназа, 3 — активный МРФ

II деление, т.е. произойдет его созревание (рис. 25.4б). Таким образом, было найдено, что в ооците на стадии метафазы II деления в цитоплазме существует **фактор** (или факторы), **стимулирующий созревание** яйцеклетки (ФСС или МРФ — *maturation promoting factor*).

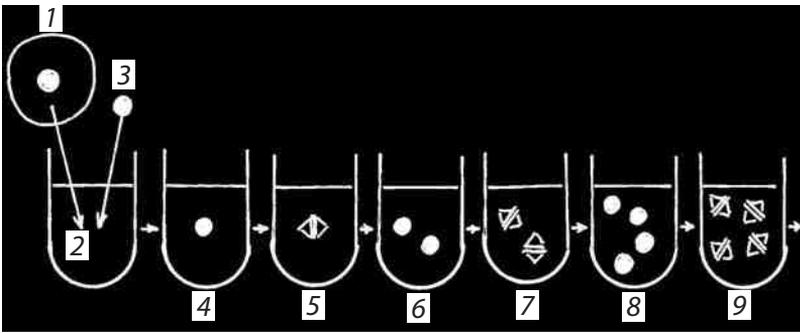
Оказалось, что этот фактор (будем называть его МРФ) присутствует в клетках только во время митотического состояния. Он обнаруживается также и во время дробления яйцеклетки (рис. 25.5). Таким образом, уровень МРФ в интерфазных клетках низкий, а в митотических высокий.

Далее было найдено, что при инъекции цитоплазмы из митотических клеток культуры ткани в нестимулированный ооцит *X. laevis*, происходит созревание ооцита. Следовательно, фактор, стимулирующий митоз и фактор, стимулирующий созревание ооцитов — одно и то же.

Этот фактор, МРФ, был выделен и охарактеризован. Это гетеродимерный комплекс, состоящий из белка циклина (см. ниже) и зависимой от циклина протеинкиназы (Cyclin dependent kinase — Cdk), фермента, относящегося к фосфорилазам, который модифицирует белки, перенося фосфатную группу от АТФ на аминокислоты серин и треонин. Следовательно, МРФ состоит из двух субъединиц: каталитической (Cdk) и регуляторной (циклин) (рис. 25.6).

## 2. Циклины

Циклин был обнаружен при изучении включения меченых аминокислот в синхронно дробящиеся яйца морского ежа. Было обнаружено, что в одном из белковых пиков на электрофореграммах метка периодически то появляется, то исчезает: она появлялась после клеточного деления, постепенно возрастала к митозу, а затем ее уровень падал после анафазы, и потом снова начинал возрастать в следующей интерфазе. Этот белок был назван **циклином**. Он постоянно синтезируется в течение эмбрионального клеточного цикла и резко разрушается при вступлении в анафазу. Подобный митотический циклин В был обнаружен у всех эукариот, в том числе и у *X. laevis*.



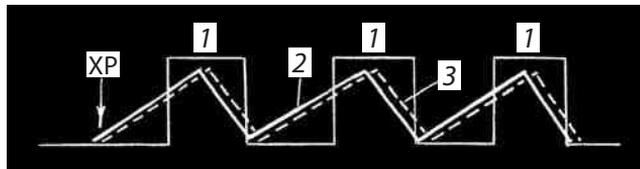
**Рис. 25.7.** Циклирование в бесклеточной системе:

1 — активированная яйцеклетка; 2 — выделенная цитоплазма из активированных клеток; 3 — добавление выделенного ядра; 4 — интерфазное ядро в цитоплазме бесклеточной системы; 5 — появление митотической фигуры; 6 — образование 2-х интерфазных ядер; 7 — образование 2-х митозов; 8 — 4 интерфазных ядра, 9 — 4 митотических фигуры и т.д.

В раннем эмбриогенезе, т.е. при дроблении яиц *X. laevis*, первые 12 делений идут друг за другом при минимальной величине  $G_1$  и  $G_2$  периодов, и возрастание уровня MPF происходит во время каждого деления. Интересно, что дробление яиц и циклические изменения активности MPF происходят также без участия ядер. Это значит, что для появления активности MPF не нужна транскрипция информационных РНК. В этот период все клеточные белковые синтезы идут на долгоживущих матричных РНК, синтезированных еще во время роста ооцитов в мейотической профазе.

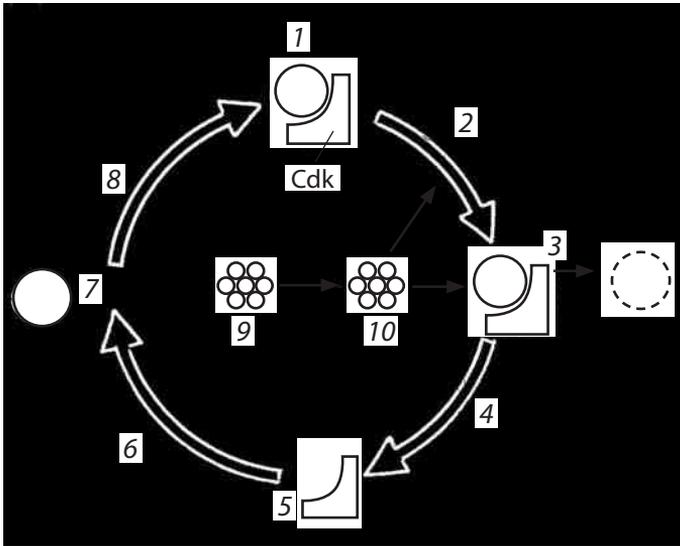
Расшифровка природы активности MPF была получена на модельных экспериментах с использованием цитоплазматических экстрактов активированных яиц *X. laevis*. В этих экстрактах были все компоненты для поддержания клеточного цикла: ферменты и предшественники для синтеза ДНК, гистоны и другие белки и липиды для образования ядерной оболочки, так же как и и-РНК, необходимая для синтеза белков, и в том числе циклина В.

Если к такому экстракту из активированных ядер добавить хроматин из спермиев *X. laevis*, то вокруг хроматина образуется ядерная оболочка, затем происходит синтез ДНК, следует конденсация хромосом, разрушается ядерная оболочка, образуется митотическая фигура, и потом наступает интерфаза, и цикл повторяется через каждые 20 мин (рис. 25.7). По мере прохождения каждого цикла происходило сначала нарастание циклина В в интерфазе параллельно возрастанию активности MPF. В митозе после анафазы количество циклина В и активность MPF падали, т.е. происходило циклическое изменение двух параметров (рис. 25.8). По мере возрастания уровня



**Рис. 25.8.** Динамика MPF и циклина в цитоплазматических экстрактах ксенопуса:

циклические возрастания уровней MPF (2) и циклина В (3) после активации хроматина спермием (xp), при этом в экстракте образуются митотические фигуры (1)



**Рис. 25.9.** Регуляция митотического циклина в постоянно делящихся (циклирующих) клетках эмбрионов:

С — циклин В; Cdk — циклин-зависимая протеинкиназа; MPF — фактор, стимулирующий митоз; 1 — метафаза; 2 — полиубикитинизация циклина В; 3 — его деградация; 4 — поздняя анафаза; 5 — телофаза; 6 — интерфаза; 7 — новый синтез циклина В; 8 — профаза; 9 — неактивный белковый комплекс, стимулирующий анафаза; 10 — его активация

MPF при повышении активности Cdk происходила конденсация хромосом за счет фосфорилирования конденсинов и гистона H1, распад ядерной оболочки при фосфорилировании ламин, образование веретена деления, т.е. все атрибуты митотического аппарата.

Подавление синтеза белка циклогексимидом или разрушение всей и-РНК с помощью РНК-азы полностью снимало циклику MPF и циклина В. Если после действия РНК-азы и при последующем ее удалении ввести в экстракты и-РНК только для циклина В, то периодические изменения уровней MPF и циклина В восстанавливаются (рис. 25.8). Эти данные говорят о том, что в системе MPF только циклин В синтезируется в интерфазе и деградирует в анафазе. В то время как второй компонент, а именно протеинкиназа Cdk существует долгое время и активируется при появлении циклина В.

Деградация циклина В в анафазе вызывается сложной цепочкой белковых взаимодействий, которая приводит к его расщеплению с помощью сложных белковых протеолитических комплексов — *протеосом*. Кроме того, в начальных этапах деградации циклина участвует сложный белковый комплекс APC (комплекс, стимулирующий анафаза), который не только подготавливает циклин к деградации, но одновременно приводит к деградации когезинов, удерживающих хроматиды друг с другом вплоть до анафазы.

Общая схема регуляции митотического циклина В и MPF в циклирующих клетках может быть представлена на рис. 25.9.

### 3. Регуляция клеточного цикла у млекопитающих

На предыдущей схеме рассмотрены только конечные звенья цепи событий, заканчивающихся делением клетки. Однако, как уже говорилось, деление клетки

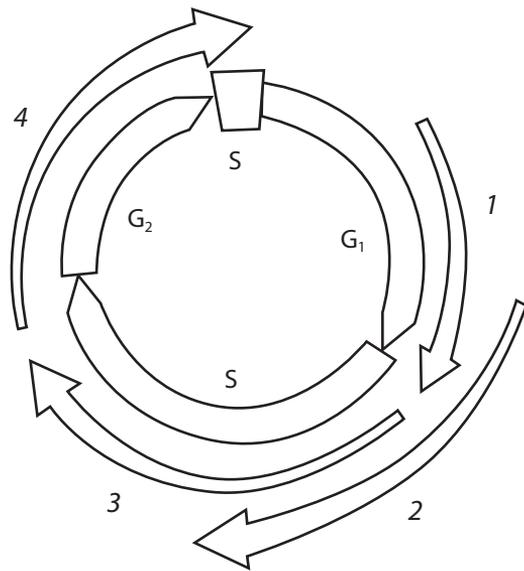
обязательно связано с репликацией ДНК. Следовательно, должны существовать механизмы, регулирующие запуск синтеза ДНК, а этому должны предшествовать события G1-периода, подготавливающие начало S-периода. Оказалось, что комплексы Cdk — митотический циклин В — это только конечный этап регуляции клеточного цикла. На самом же деле от начала вхождения в клеточный цикл до его завершения в клетке работает каскад комплексов Cdk-циклин. Так, у дрожжей один и тот же Cdk отвечает за прохождение цикла, но на разных его стадиях он взаимодействует с разными циклинами, характерными для каждой стадии клеточного цикла.

У млекопитающих в реализации всего цикла участвуют 9 различных циклинов и 7 разных Cdk (рис. 25.10). Но что является пусковым механизмом для вхождения клеток в цикл из состояния покоя, из G<sub>0</sub>-стадии? Мы видели, что для активации клеточного цикла ооцита *X. laevis* необходимо первоначальное воздействие гормона прогестерона, который в данном случае является фактором роста (ФР или GF) или пролиферации.

Было найдено, что существует множество факторов роста, побуждающих клетки к размножению. Они могут быть собственными продуктами данных клеток (аутокринная стимуляция) или других соседних (паракринная стимуляция), или даже клеток других органов (гормональная стимуляция). Например, фактор роста из тромбоцитов (PDGF) стимулирует пролиферацию клеток соединительной ткани, эпидермальный ФР (EGF) стимулирует размножение многих типов клеток, работает как сигнальный белок при эмбриональном развитии; ФР нервов (NGF) вызывает рост отдельных типов нейронов; эритропоэтин вызывает пролиферацию предшественников эритроцитов и т.д.

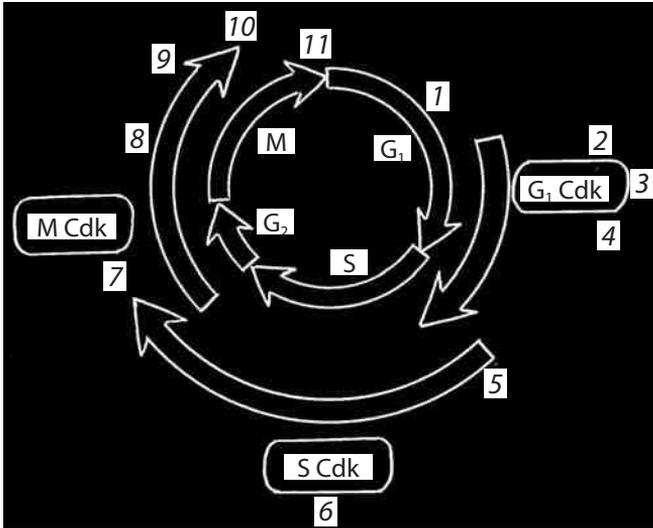
Хорошим примером зависимости пролиферации клеток от факторов роста могут служить клеточные культуры. Было найдено, что для размножения многих клеточных культур, кроме питательных сред, необходимо добавление сывороток крови или эмбриональных экстрактов. Оказалось, что именно в этих добавках содержатся ФР. Без них клетки переходят в G<sub>0</sub>-стадию, а затем погибают. Для роста нервных клеток в культуре требуется добавление в среду фактора роста нервов (NGF).

Эти разные ФР связываются на поверхности клеток со своими рецепторами и передают сигнал через вторичные мессенджеры



**Рис. 25.10.** В клеточном цикле млекопитающих участвуют различные циклины и циклин-зависимые киназы:

1 — циклин D + Cdk 4, Cdk 6; 2 — циклин E + Cdk 2; 3 — циклин A + Cdk 2; 4 — циклин B/A + Cdk 1



**Рис. 25.11.** Общая схема регуляции цикла эукариотической клетки:

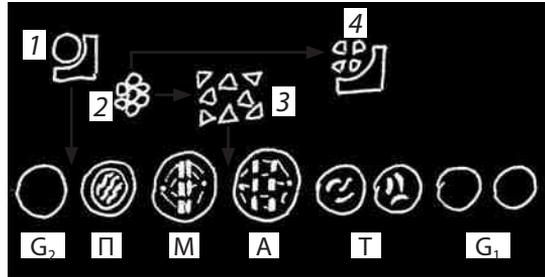
1 — сборка ДНК-репликативных комплексов; 2 — G<sub>1</sub> Cdk комплекс инактивирует APC (комплекс стимулирующий анафазу); 3 — G<sub>1</sub> Cdk комплекс активирует транскрипцию Cdk комплекса S-фазы; 4 — G<sub>1</sub> Cdk комплекс фосфорилирует ингибитор Cdk комплекса S-фазы; 5 — деградация этого ингибитора; 6 — Cdk комплекс S-фазы активирует репликативные комплексы; 7 — митотический Cdk комплекс активирует конденсацию хромосом, разрыв ядерной оболочки, сборку веретена деления; 8 — активирование APC; 9 — APC разрушает анафазный ингибитор, расхождение хромосом в анафазе; 10 — APC вызывает деградацию митотического циклина с помощью протеасом; 11 — телофаза и цитокinesis

просто как G<sub>1</sub>-CDK, циклин S<sub>фазы</sub>-CDK как S-CDK и т.п.). В G<sub>1</sub>-стадии комплекс Cdk-циклин (G<sub>1</sub>-CDK) фосфорилирует факторы транскрипции, необходимые для активации экспрессии генов, ответственных за образование синтетического комплекса S-CDK, который после образования инактивируется специальным ингибитором. В конце G<sub>1</sub>-периода комплекс G<sub>1</sub>-CDK фосфорилирует этот ингибитор, который отделяется от комплекса S-CDK, тем самым его активируя. При этом в первоначальном комплексе G<sub>1</sub>-CDK циклин деградирует. Активированный S-CDK комплекс индуцирует S-фазу, фосфорилируя белки регуляторного участка ДНК, связанных с точками начала репликации. После этого циклин в этом комплексе также деградирует. После активации S-периода происходит репликация ДНК. Во время S-периода и в начале G<sub>2</sub>-периода происходит синтез нового, митотического комплекса, M-CDK (циклин B+CDK), определяющего вхождение клетки в митоз. Однако до окончания синтеза ДНК он находится в неактивном состоянии и активируется путем дефосфорилирования. После активации этого комплекса, он участвует в фосфорилировании белков хроматина, что приводит к конденсации хромосом, белков ламины, которые деполимеризуются, и при этом разрушается ядерная оболочка, фосфорилирует ряд белков, ассоциированных с микротрубочками при образовании веретена деления.

(например, цАМФ) на систему внутриклеточного каскада протеинкиназ (фосфорилаз), связанных с запуском клеточного цикла. Сначала активируются *гены раннего ответа*, белки которых индуцируют транскрипцию генов *отложенного ответа*, некоторые из них сами являются факторами транскрипции, а также индуцируют синтез некоторых циклинов и Cdk, которые отсутствовали в G<sub>0</sub>-периоде.

Так, вначале синтезируются белки Cdk и циклины, характерные для G<sub>1</sub>-стадии, затем для S-фазы и потом для митоза (рис. 25.11) (Для краткости будем называть комплексы циклинов с CDK: циклин G<sub>1</sub>-CDK

После ассоциации микротрубочек с хромосомами происходит активация APC (комплекс стимуляции анафазы), деградация когезинов, вслед за чем наступает анафаза, и активация протеолиза митотических циклинов (рис. 25.12). После расхождения хромосом и цитотомии в раннем  $G_1$ -периоде следующего цикла новые комплексы  $G_1$ -CDK фосфорилируют APC, инактивируя их, что способствует впоследствии накоплению митотических циклинов.



**Рис. 25.12.** Комплекс стимуляции анафазы (APC) участвует в деградации циклина В и ингибитора анафазного расхождения хромосом:

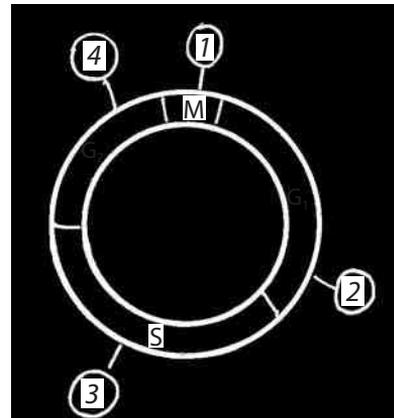
1 — MPF (циклин В + Cdk 2); 2 — активированный APC; 3 — распад анафазного ингибитора; 4 — распад циклина В.  $G_2$ , П, М, А, Т,  $G_1$ -фазы митоза

## 4. Контрольные точки клеточного цикла

Наличие контрольных точек в клеточном цикле необходимо для определения завершения его каждой фазы. Остановка клеточного цикла происходит при повреждении ДНК в  $G_1$ -периоде, при неполной репликации ДНК в S-фазе, при повреждении ДНК в  $G_2$ -периоде, и при нарушении связи веретена деления с хромосомами (рис. 25.13).

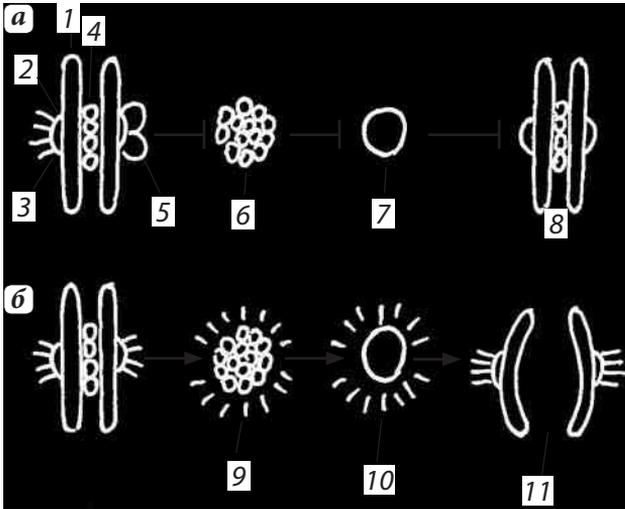
Одним из контрольных пунктов в клеточном цикле является собственно митоз, который не переходит в анафазу при неправильной сборке веретена и при отсутствии полных связей микротрубочек с кинетохорами. В этом случае не происходит активации APC-комплекса, не происходит деградации когезинов, соединяющих сестринские хроматиды, и деградации митотических циклинов, что необходимо для перехода в анафазу. До момента связывания кинетохора с микротрубочками веретена белки Bad и Mad препятствуют активации APC-комплекса. Как только микротрубочки достигают кинетохора, комплекс Bad/Mad разрушается и происходит активация APC (рис. 25.14).

Повреждения ДНК препятствуют вхождению клеток в S-период или в митоз. За остановку в клеточном цикле синтеза ДНК отвечают две родственные протеинкиназы ATM и ATR, которые узнают повреждения или недореплицированные участки ДНК. При этом они не только останавливают клеточный цикл, но могут программировать клеточную гибель.



**Рис. 25.13.** Контрольные точки клеточного цикла:

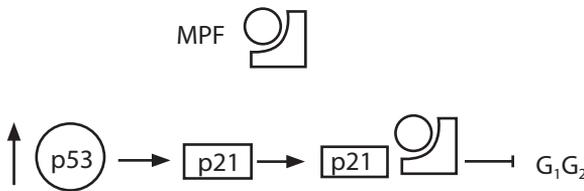
1 — дефекты в образовании веретена (задержка митоза в анафазе); 2 — повреждение ДНК (задержка в  $G_1$ -периоде); 3 — повреждение или недореплицирование ДНК (задержка в S-периоде); 4 — то же (задержка в  $G_2$ )



**Рис. 25.14.** Контроль за расхождением хромосом в анафазе:

**а** — при отсутствии связи МТ с кинетохором белки Bad и Mad препятствуют активации комплекса APC и расхождению хромосом; **б** — в норме активированный комплекс APC в свою очередь активирует сепаразу, разрушающую когезины, что вызывает расхождение хромосом;

1 — хроматиды; 2 — кинетохоры; 3 — микротрубочки; 4 — когезины; 5 — Bad/Mad-комплекс; 6 — неактивированные APC; 7 — неактивированные сепаразы; 8 — нерасхождение хроматид; 9 — активированный APC; 10 — активированные сепаразы; 11 — деградация когезинов и расхождение хроматид



**Рис. 25.15.** Остановка цикла в результате нарушения синтеза ДНК или ее повреждения, что ведет к возрастанию синтеза белка p53, который в свою очередь индуцирует синтез белка p21 — ингибитора клеточного цикла

АТМ активируется двойными разрывами, АТР — одиночными. При этом они обе фосфорилируются и активируют другие киназы контрольных точек, некоторые вызывают остановку клеточного цикла.

Если эти повреждения не катастрофические и могут быть восстановлены за счет репаративного синтеза ДНК, то блок клеточного цикла снимается, и цикл доходит до своего завершения. Если же повреждения ДНК значительные, то каким-то образом происходит стабилизация и накопление белка p53, концентрация которого в норме очень низкая из-за его нестабильности. Белок p53 является одним из факторов транскрипции, который стимулирует синтез белка p21, являющегося ингибитором комплекса CDK-циклинов. Это приводит к тому, что клеточный цикл останавливается на стадии  $G_1$  или  $G_2$ . При блоке в  $G_1$ -периоде клетка с повреждением ДНК не вступает в S-фазу, так как это могло бы привести к появлению мутантных клеток, среди которых могут быть и опухолевые

клетки. Блокада в  $G_2$ -периоде также предотвращает процесс митоза клеток с повреждениями ДНК. Такие клетки, с заблокированным клеточным циклом, в дальнейшем погибают путем апоптоза, запрограммированной клеточной гибели (рис. 25.15).

При мутациях, приводящих к потере генов белка p53 или при их изменениях, блокады клеточного цикла не происходит, клетки вступают в митоз, что приводит к появлению мутантных клеток, большая часть из которых нежизнеспособна или же часть из них дает начало злокачественным клеткам.

# Глава 26

## Пути гибели клеток

### 1. Реакция клеток на повреждение

Еще Р. Вирхов считал, «что все наши патологии необходимо свести на изменения в элементарных частях тканей, в клетках».

Многие нарушения нормального строения или функции клеток принято считать патологическими (от греч. *logos* — изучение и *pathos* — страдание).

При знакомстве с основными постулатами клеточной теории, одним из которых было «клетка представляет собой систему сопряженных функциональных единиц», становилось понятным, что недостаточность при повреждении любой из этих единиц должно сказываться на работе других структурно-функциональных компонентов (органеллы, мультимолекулярные комплексы, цепи межмолекулярных взаимодействий и т.д.) и на свойствах клетки в целом. Поэтому при изменении клеточных компонентов, спонтанных или вызванных внешними воздействиями, клетки отвечают целой гаммой реакций, часть из которых направлена на восстановление нарушений жизнедеятельности клетки (обратимые повреждения) или же ведет к развитию цепных структурно-функциональных нарушений, часто имеющих необратимый характер, ведущий к гибели клеток.

Причины патологических изменений клеток очень разнообразны: от внутриклеточных метаболических отклонений (часто генетически детерминированных) до грубых физических воздействий.

При метаболических отклонениях, которые могут вызываться и внешними факторами (химикаты, токсины различного происхождения), может происходить накопление в клетках нормальных эндогенных веществ (например, жира в клетках печени, отложение белковых гранул в клетках почечных канальцев) из-за изменений скорости метаболизма этих веществ. Такого типа изменения могут быть временными и обычно устраняются (рис. 26.1).

Патологического типа накопления в клетках нормальных эндогенных веществ может быть обусловлено дефектами метаболизма, имеющими генетическую основу. Например, т.н. болезни накопления, связанные с лизосомными изменениями,

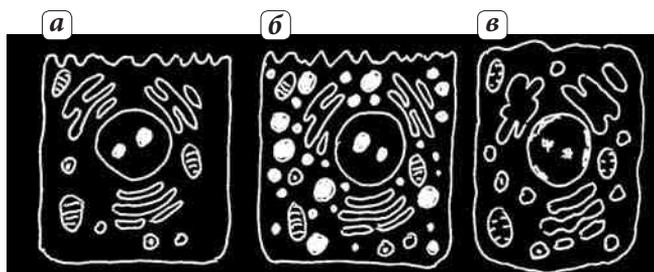


Рис. 26.1. Примеры обратимых ультраструктурных изменений клеток:

**а** — нормальная клетка; **б** — накопление жира в клетках печени; **в** — набухание клеток

приводят к необратимым формам патологических отложений липидов, углеводов и белков.

В клетках могут откладываться и накапливаться эндогенные вещества, которые не подвергаются ферментной деградации или выведению из клетки, как, например, частицы угля (антракоз) или кремния (силикоз).

К внешним факторам, вызывающим патологические изменения клеток, нужно отнести целый ряд физических (механическая травма, экстремальные температуры, радиация, электрический шок и др.), химических (биологические токсины, ядовитые соединения, инсектициды, гербициды, соли тяжелых металлов, алкоголь, наркотики и др.) и биологических воздействий (вирусы, бактерии). При этом в первую очередь нарушается поддержание целостности клеточных мембран, от которых зависит ионный и осмотический гомеостаз клетки, нарушается аэробное дыхание и образование АТФ, страдает белковый синтез и целостность генетического аппарата клетки. В целом же можно говорить, что ведущими звеньями в развитии клеточной структурной патологии являются поражения мембран и в первую очередь плазматической мембраны и мембран митохондрий.

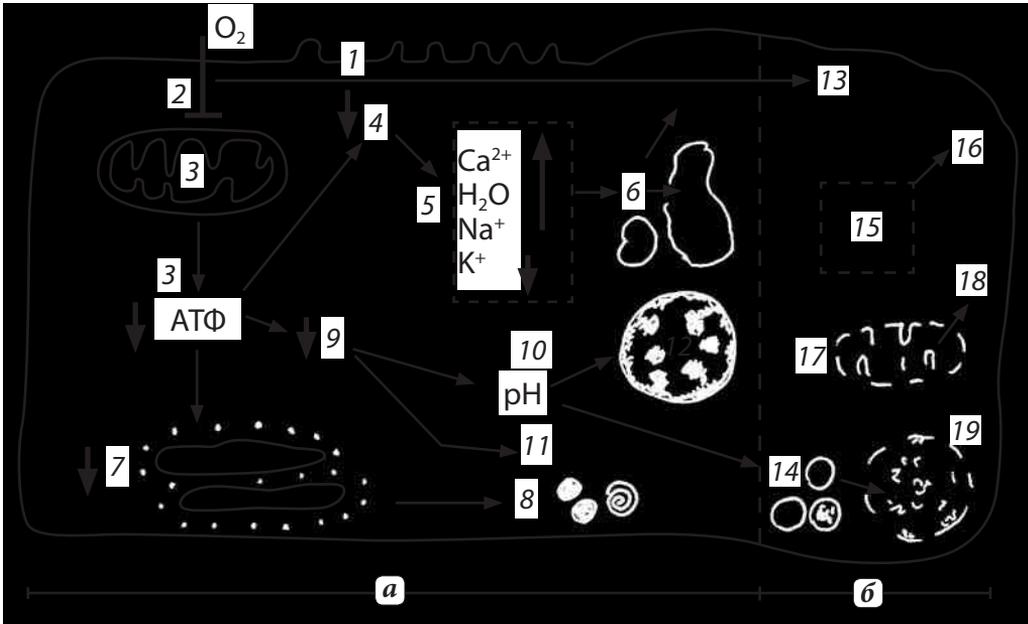
В настоящее время установлено, что изменения митохондрий, такие как освобождение некоторых митохондриальных белков, рассеяние трансмембранной разности потенциалов, образование активных форм кислорода (АФК), нарушение электрон-транспортной цепи и падение синтеза АТФ участвуют и, возможно, определяют различные аспекты патологии и гибели клеток.

Цитологические (морфо-функциональные) признаки клеточной патологии обнаруживаются не сразу после действия повреждающих агентов. Морфологические изменения выявляются только после того, как нарушения систем клетки проходят критический уровень, причем развитие морфологических признаков необратимого повреждения занимает больше времени, чем появление обратимых изменений.

Как уже говорилось, если действия повреждающих факторов будут неглубоки или кратковременны, то клетки, несмотря на целый ряд структурных патологических изменений, могут нормализоваться за счет внутриклеточных репарационных процессов.

Процесс развития патологического (болезненного) состояния клеток не происходит одномоментно (если, конечно, не брать случаи катастрофической смерти клетки при действии высокой температуры или резкого обезвоживания). При действии неблагоприятных условий клетка отвечает серией последовательных структурно-функциональных изменений, степень тяжести которых и определяет судьбу клетки — выжить или погибнуть.

На схеме (рис. 26.2) показан пример последовательных внутриклеточных событий при ишемическом поражении кровеносного сосуда. Прекращение доступа кислорода клеткам при ишемии приводит к целому каскаду изменений клеточного метаболизма (падение синтеза АТФ митохондриями, набухание цитоплазмы, выход ионов  $K$  и, наоборот, вторжение ионов  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  из внешней среды, набухание мембранных компонентов вакуолярной системы, закисление цитоплазмы, падение синтеза, конденсация хроматина и т.д.).



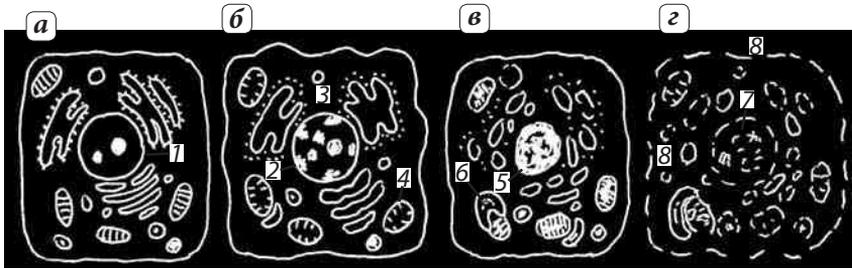
**Рис. 26.2.** Обратимые (а) и необратимые (б) внутриклеточные процессы при ишемическом недостатке кислорода:

1 — плазматическая мембрана; 2 — ишемический недостаток  $\text{O}_2$ ; 3 — набухание митохондрий; 4 — падение работы  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  насоса; 5 — Приток  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}^+$ ; 6 — набухание клетки и вакуолярной системы; 7 — ЭПР-отслоение рибосом и падение синтеза белка; 8 — отложение липидов; 9 — возрастание гликолиза; 10 — падение клеточного pH; 11 — распад гликогена; 12 — конденсация хроматина; 13 — повреждение мембран; 14 — освобождение и активация лизосомных гидролаз; 15 — деградация элементов цитоскелета и мембран; 16 — освобождение некоторых ферментов; 17 — разрыв мембран митохондрий; 18 — Выход  $\text{Ca}^{2+}$  из митохондрий; 19 — падение базофилии, кариолизис (Изм. Cotran R.S., Kumas V., Collins T., 1998)

↑ — рост активности; ↓ — падение активности

При обратимом повреждении клетки выглядят набухшими, их объем несколько увеличен, происходит или втягивание цитоплазматических выростов (например, псевдоподий фибробластов и лейкоцитов) или, наоборот, появление на поверхности клеток выпуклостей. Происходит набухание всех компонентов вакуолярной системы, но без разрыва их мембраны; падает базофилия цитоплазмы. Рибосомы теряют связь с ЭПР, ядерная оболочка расширяется, митохондрии набухают, появляются аутофагосомы. В начальных стадиях повреждения хроматин несколько конденсируется, ядрышки теряют интенсивность окраски. Значительно изменяется цитоскелет: микротрубочки и микрофиламенты разбираются. Наиболее стабильными являются промежуточные филаменты (рис. 26.3).

Однако эти изменения могут быть обратимыми, если не произойдут дальнейшие глубокие нарушения целостности плазматической мембраны, прекращающие работу  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -насоса, если не произойдут необратимые повреждения мембран митохондрий и лизосом, гидролазы которых могут излиться в цитоплазму. Важное условие обратимости клеточных повреждений — целостность ауторепродукционной активности ядерных компонентов.



**Рис. 26.3.** Схематическое изображение ультраструктуры нормальной клетки (а), при обратимом (б) и необратимом (в) повреждении, лизис клетки (г):

1 — интактное ядро; 2 — конденсация хроматина; 3 — диссоциация рибосом; 4 — набухшие митохондрии; 5 — пикноз ядра; 6 — активация аутофагии; 7 — лизис ядра; 8 — разрыв клеточных мембран

Было найдено, что на разнообразные факторы при обратимом повреждении клетки отвечают ограниченным числом неспецифических изменений. В световом микроскопе при наблюдении за живыми клетками было видно, что вне зависимости от природы фактора клетки отвечают увеличением светорассеяния в темном поле, что говорит об увеличении частиц цитоплазмы (например, вакуолей) и их числа (за счет фрагментации более крупных).

Характерной обще клеточной реакцией на повреждение является изменение способности клетки связывать различные красители. Так, нормальные клетки могут поглощать из внеклеточной среды растворенные в ней красители (например, нейтральный красный или метиленовый синий при очень низких концентрациях). Такое прижизненное, витальное окрашивание приводит сначала к проникновению красителя в клетку, а затем (или одновременно) к собиранию красителя в виде гранул. Такое гранулообразование происходит в цитоплазме, ядро при этом остается бесцветным. При повреждении клеток многими физическими (нагревание, давление) или химическими факторами (изменение рН среды, добавление спирта или какого-либо иного денатурирующего агента) прекращается гранулообразование, цитоплазма и ядро диффузно окрашиваются проникшим в клетку красителем. Если действие фактора обратимо, т.е. если при снятии его клетка возвращается к норме, то восстанавливается ее способность к гранулообразованию.

Этого рода наблюдения привели к выводу, что эти морфо-функциональные показатели повреждения возникают стереотипно, вне зависимости от природы клеток или от типа повреждающего воздействия. Такой монотонный неспецифический характер ответных реакций клетки на различные повреждающие факторы может свидетельствовать о наличии каких-то общих процессов, вызывающих развитие сходных ответов клеток. При этом в клетках всегда значительно падает окислительное фосфорилирование: прекращается синтез АТФ и растет потребление кислорода. Для поврежденных клеток характерно возрастание гликолитических процессов, падение количества АТФ, активация протеолиза.

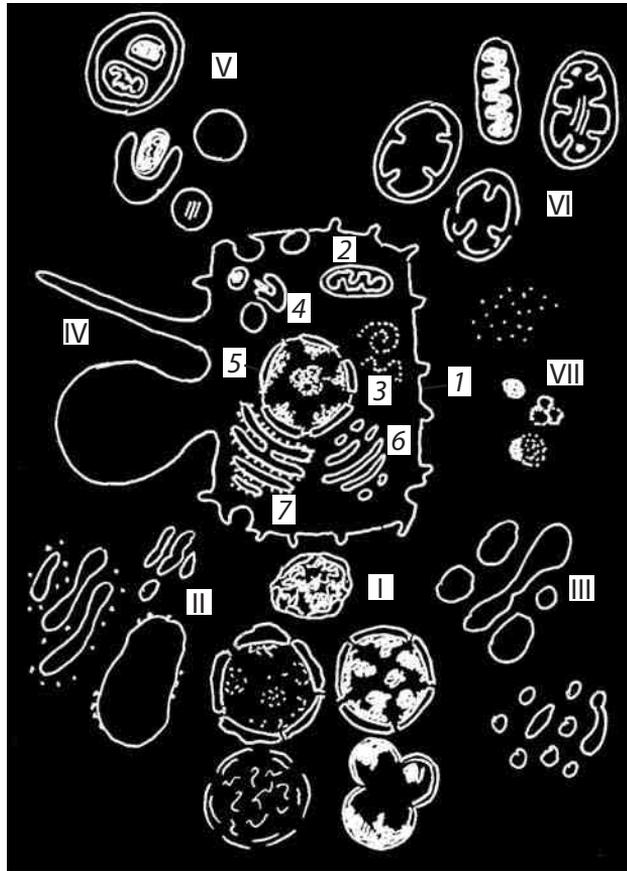
В морфологическом отношении реакции клеточных компонентов также не отличаются разнообразием (рис. 26.4). Так, наиболее частым изменением структуры

ядра является конденсация хроматина, что может отражать падение ядерных синтетических процессов.

Интересно то, что совокупность этих отдельных субмикроскопических изменений клеточных компонентов может быть очень близкой, независимо от природы клеток и от альтерирующего, повреждающего фактора. Например, набухание митохондрий и вакуолей цитоплазмы происходит в клетках печени при различных отравлениях организма; сходные изменения происходят в сердечной мышце при инфаркте или при остром недостатке кислорода.

Такая однотипность, монотонность суммарного ответа клеток на повреждения дала базу для предположения о том, что в основе реакций живой протоплазмы лежит какой-то единый молекулярный механизм. Совокупность неспецифических обратимых изменений цитоплазмы, возникающих под воздействием различных агентов, была обозначена термином «паранекроз».

Развитие патологического процесса в клетках может остановиться после снятия неблагоприятного воздействия. Если изменения в клетке не зашли слишком далеко, может произойти репарация клеточных повреждений, возврат клетки к нормальному функциональному уровню. Так, в целом ряде случаев повреждения клеток, связанные с набуханием митохондрий и с фрагментацией ретикулума, оказываются обратимыми. Часто процессы восстановления внутриклеточных структур называют клеточной регенерацией. К сожалению, подробно восстановление отдельных клеточных компонентов еще не прослежено. Показано, что в клетках переживших стрессорные воздействия, активизируется аутофагосомная система, происходит как бы «чистка» цитоплазмы от поврежденных клеточных



**Рис. 26.4.** Схема основных патологических изменений клеточных органелл:

1 — плазматическая мембрана; 2 — митохондрии; 3 — полисомы; 4 — лизосомы; 5 — ядра; 6 — Аппарат Гольджи; 7 — гранулярный ЭПР; I. Патологические формы ядер (кариопикноз, набухание, кариорексис, кариолизис, апоптоз); II. Изменения ЭПР; III. Изменения АГ; IV. Выросты плазматической мембраны; V. Формы лизосом и аутофагосом; VI. Патологические формы митохондрий; VII. Измененные ядрышки

компонентов. Происходит восстановление вакуолярной системы за счет активности гранулярного ЭПР. Наблюдается фрагментация или размножение митохондрий. Конденсированный до этого хроматин ядра разрыхляется, ядрышки начинают увеличиваться в размерах.

Репарация клеток может быть полной, когда восстанавливаются все свойства данных клеток, или неполной. В последнем случае после снятия действия повреждающего фактора, клетки нормализуют целый ряд функций, но через некоторое время, уже без всякого воздействия, погибают. Особенно часто это наблюдается при необратимых повреждениях клеточного ядра. Например, после облучения ультрафиолетовым светом некоторые инфузории восстанавливают свои двигательные функции, у них нормально работают реснички, сократительная вакуоль, они могут поглощать пищу, но через некоторое время они погибают из-за поражения ядерных структур.

При необратимом повреждении клетки гибнут. Дать определение момента клеточной смерти очень трудно (так же как и при смерти целого организма), так как умирание — это не одномоментное явление, а процесс. При необратимом повреждении разворачивается целый ряд последовательных событий, приводящих к разрушению клеток. В самом начале изменения клеток могут иметь характер обратимых, паранекротических, отличие лишь в том, что после снятия воздействия они не исчезают, а прогрессируют. Хорошим признаком такого состояния клеток является их способность диффузно окрашиваться. Явный признак гибели клетки — это активизация внутриклеточных гидролитических ферментов. Они активизируются в гиалоплазме и начинают расщепление белков, липидов и др.; при этом разрушаются внутриклеточные мембраны, в том числе и мембраны лизосом. Все это приводит к автолизу, самоперевариванию клеток, но это уже посмертные изменения.

Существует несколько путей, приводящих к клеточной гибели. До 1972 г. считалось, что клеточная гибель (КГ) осуществляется по одному пути — по пути некроза (от греч. *necrosis* — мертвый), являющегося пассивным ответом на повреждающие стимулы. Дальнейшие исследования привели к более детальной классификации типов КГ, основанной на морфологических, биохимических и генетических характеристиках изменений ядер, цитоскелета, органелл и плазматической мембраны. Появилось представление о нескольких типах **программированной гибели клеток** (ПГК), таких как **апоптоз**, или ПГК I типа, как вариант апоптоза «митотическая катастрофа», **аутофагия**, или ПГК II типа, некрозоподобная программируемая гибель клетки III типа.

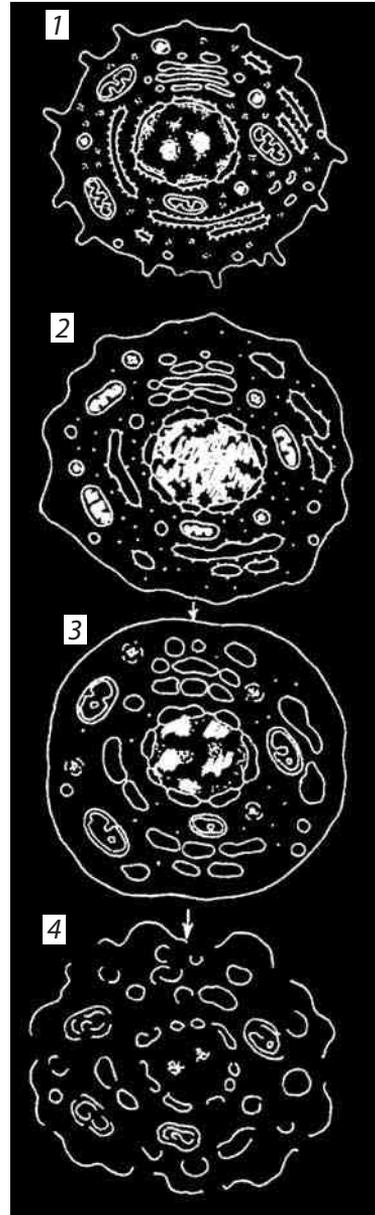
## 2. Некроз

Если повреждение клеток становится необратимым, то происходит дальнейшее развитие распада внутриклеточных компонентов, которое в конце концов приводит к лизису — распаду, растворению клеток, к некрозу. Многие исследователи считают, что некротическое состояние клеток — это посмертные изменения,

прогрессирующие стадии распада клеточных компонентов. Некроз — наиболее общая форма клеточной гибели, возникающей в результате различных экзогенных воздействий и стрессов, таких как ишемия, химические и физические поражения.

Этот вид клеточной смерти обычно связывается с нарушением внутриклеточного гомеостаза в результате нарушения проницаемости клеточных мембран, приводящим к изменению концентрации ионов в клетке, с необратимыми изменениями митохондрий, что сразу приводит к прекращению всех жизненных функций, включая синтез макромолекул. Некроз вызывают повреждения плазматической мембраны, подавление активности мембранных насосов под действием многих ядов, а также необратимые изменения энергетики при недостатке кислорода (при ишемии — закупорке кровеносного сосуда) или отравлении митохондриальными ферментами (например, действие цианидов). При этом при повышении проницаемости плазматической мембраны клетка набухает за счет ее обводнения, в цитоплазме происходит увеличение концентрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$ , закисление цитоплазмы, набухание вакуолярных компонентов и разрыв их мембран, прекращение синтеза белков в цитозоле, освобождение лизосомных гидролаз и лизис клетки. Одновременно с этими изменениями в цитоплазме изменяются и клеточные ядра: вначале они компактизируются (пикноз ядер), но по мере набухания ядра и разрыва его оболочки пограничный слой хроматина распадается на мелкие массы (кариорексис) а затем наступает кариолизис — растворение ядра (рис. 26.5).

Характерным для некроза является то, что этим изменениям подвергаются не отдельные клетки, а группы клеток (инфаркт, ожог, лучевые поражения, токсические поражения, механическая травма). При разрушении клеток в результате таких «катастрофических» поражений обнажаются внутриклеточные антигены, вызывающие развитие воспалительной реакции, сопровождающейся инвазией клеток, уничтожающих остатки некротизировавших клеток и участвующих в образовании рубцовой ткани.



**Рис. 26.5.** Последовательные стадии изменения структуры клетки при некрозе:

1 — нормальная клетка; 2 — набухание клетки, конденсация хроматина — пикноз ядра; 3 — дальнейшее набухание вакуолярной системы, кариорексис ядра — распад хроматина на глыбки; 4 — разрыв мембранных компонентов — лизис клетки, кариолизис

### 3. Программированная клеточная гибель: апоптоз, аутофагия и др.

Под программированием подразумевается закономерная активация определенных генов, кодирующих белки, которые отвечают за процесс гибели клеток, за ее уничтожение. Известно несколько программ клеточной гибели, отличающихся не только молекулярными процессами, ведущими к гибели клеток, но и морфологическими признаками самоуничтожения клеток.

#### Апоптоз

Апоптоз (от греч. *apoptosis* — «отпадение», описывающее листопад или отпадение лепестков цветков) — гибель клеток путем их фрагментации и дальнейшей деградации (рис. 26.6). В отличие от некроза апоптозу подвергаются не большие группы клеток, а отдельные, разрозненные клетки и погибают они не сразу. Главное же отличие в том, что при апоптозе реализуется генетическая внутриклеточная программа элиминации одиночных клеток.

В процессе развития организмов и их функционировании во взрослом состоянии постоянно происходит гибель части клеток, но без их физического или химического повреждения, происходит как бы их «беспричинная» смерть. Гибель клеток происходит практически на всех стадиях онтогенеза. Многочисленны примеры отмирания клеток без повреждения при эмбриогенезе. Так отмирают клетки вольфова и мюллерова каналов при развитии мочеполовой системы у позвоночных, погибает часть нейробластов и гонадоцитов, погибают клетки при метаморфозах насекомых и амфибий (резорбция хвоста у головастика и жабер у тритона) и т.д.

Во взрослом организме также постоянно происходит «спонтанная» гибель клеток. Миллионами погибают клетки крови эритроциты и лейкоциты, клетки эпидермиса кожи, клетки тонкого кишечника — энтероциты. Погибают фолликулярные клетки яичника после овуляции, погибают клетки молочной железы после лактации. Таких примеров много. Особенно много примеров гибели клеток без непосредственного их повреждения при различных патологических процессах. Например, кастрация (удаление семенников) вызывает гибель клеток простатической железы, удаление гипофиза приводит к гибели клеток надпочечников. Другой пример — гибель шванновских клеток при дегенерации аксона. Шванновские клетки в поврежденном периферическом нерве взрослого животного, так же как

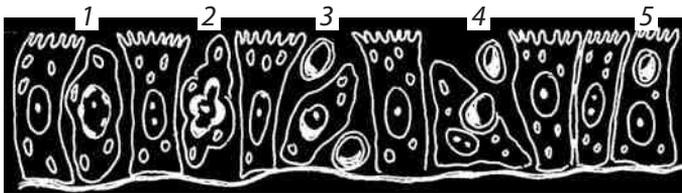


Рис. 26.6. Схема развития апоптоза (1–5) в клетках однослойного эпителия:

1 — сморщивание клетки; 2 — пузырение ядер и цитоплазмы; 3 — распад клетки на апоптотические тельца (АП); 4 — фагоцитоз АП резидентными макрофагами; 5 — Поглощение АП соседними эпителиальными клетками

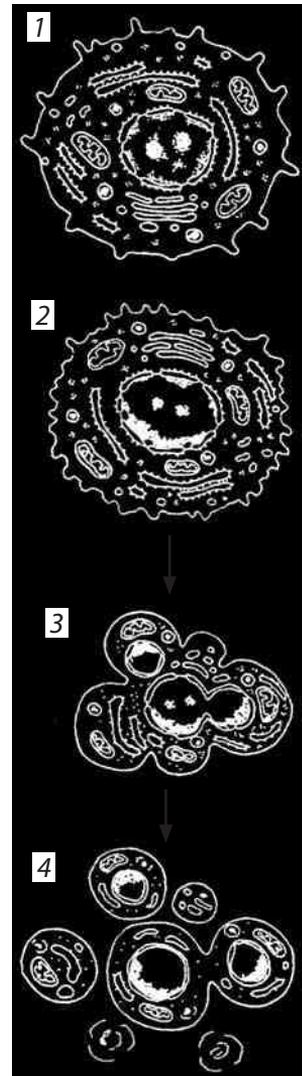
и клетки-сателлиты и чувствительные нейроны в соответствующих спинномозговых узлах, погибают.

Эти наблюдения наводят на мысль, что клеточная смерть в этих случаях регулируется межклеточными взаимодействиями различным образом. Множество клеток многоклеточного организма нуждается в сигналах на то, чтобы оставаться живыми. В отсутствии таких сигналов или трофических факторов в клетках развивается программа «самоубийства» или программируемой смерти. Например, клетки культуры нейронов погибают при отсутствии фактора роста нейронов (NGF), клетки простаты гибнут в отсутствии андрогенов семенника, клетки молочной железы погибают при падении уровня гормона прогестерона и т.д.

С другой стороны, клетки могут получать сигналы, которые в клетках-мишенях запускают процессы, приводящие к гибели по типу апоптоза. Так, гидрокортизон вызывает гибель лимфоцитов, а глутамат — нервных клеток в культуре ткани, фактор некроза опухоли (TNF) вызывает гибель самых различных клеток. Тироксин (гормон щитовидной железы) вызывает апоптоз клеток хвоста головастика. Кроме этого существуют ситуации, когда апоптотическая гибель клетки вызывается внешними факторами, например, радиацией.

Понятие «апоптоз» было введено при изучении гибели части клеток печени при неполной перевязке портальной вены. Было обнаружено, что при этом наблюдается своеобразная картина клеточной смерти, которая затрагивает лишь отдельные клетки в паренхиме печени. Процесс начинается с того, что клетки теряют контакты с соседними клетками, они как бы сморщиваются (первоначальное название этой формы гибели *shrinkage necrosis* — некроз сжатием клетки), в ядрах по их периферии происходит специфическая конденсация хроматина, затем ядро фрагментируется на отдельные части. Вслед за этим сама клетка распадается на отдельные тельца, ограниченные плазматической мембраной — **апоптотические тельца**. Апоптоз — процесс, приводящий не к лизису, не к растворению клетки, а к ее фрагментации, распаду. Судьба апоптотических телец тоже необычна: они фагоцитируются макрофагами или даже нормальными соседними клетками. При этом не развивается воспалительная реакция (рис. 26.6, 26.7).

Важно отметить, что во всех случаях апоптоза, во время ли эмбрионального развития, во взрослом ли организме, в норме или при патологических процессах,



**Рис. 26.7.** Последовательные стадии апоптоза в клетках культуры ткани:

1 — нормальная клетка; 2 — специфическое сжатие клетки и конденсация хроматина; 3 — фрагментация ядра; 4 — фрагментация тела клетки на ряд апоптотических телец

морфология процесса гибели клеток очень сходна. Это может говорить об общности процессов апоптоза в разных организмах и органах.

Исследования на разных объектах показали, что апоптоз есть результат реализации генетически запрограммированной клеточной гибели. Первые доказательства наличия генетической программы клеточной смерти (ПГК) были получены при изучении развития нематоды *Caenorhabditis elegans*. Этот червь развивается всего за 3 сут и его малые размеры позволяют проследить за судьбой всех его клеток, начиная с ранних этапов дробления до половозрелого организма.

Оказалось, что при развитии *C.elegans* образуется всего 1090 клеток, из которых часть нервных клеток в количестве 131 штуки спонтанно погибает путем апоптоза, и в организме остается 959 клеток. Были обнаружены мутанты, у которых процесс элиминации 131 клетки был нарушен. Были обнаружены два гена *ced-3* и *ced-4*, продукты которых вызывают апоптоз 131 клетки. Если у мутантных *C.elegans* эти гены отсутствуют или изменены, то апоптоз не наступает и взрослый организм состоит из 1090 клеток. Был найден и другой ген — *ced-9*, который является супрессором апоптоза: при мутации *ced-9* все 1090 клеток погибают.

Аналог этого гена был найден у человека: *bcl-2*-ген также является супрессором апоптоза различных клеток. Оказалось, что оба белка, кодируемые этими генами, *Ced-9* и *Bcl-2*, имеют один трансмембранный домен и локализуются во внешней мембране митохондрий, в мембранах ядер и эндоплазматического ретикулула.

Система развития апоптоза оказалась очень сходной у нематоды и позвоночных животных, она состоит из трех звеньев: регулятор, адаптер и эффектор. У *C.elegans* регулятором является *Ced-9*, который блокирует адаптерный белок *Ced-4*, который в свою очередь не активирует эффекторный белок *Ced-3*, протеазу, которая действует на белки цитоскелета и ядра.

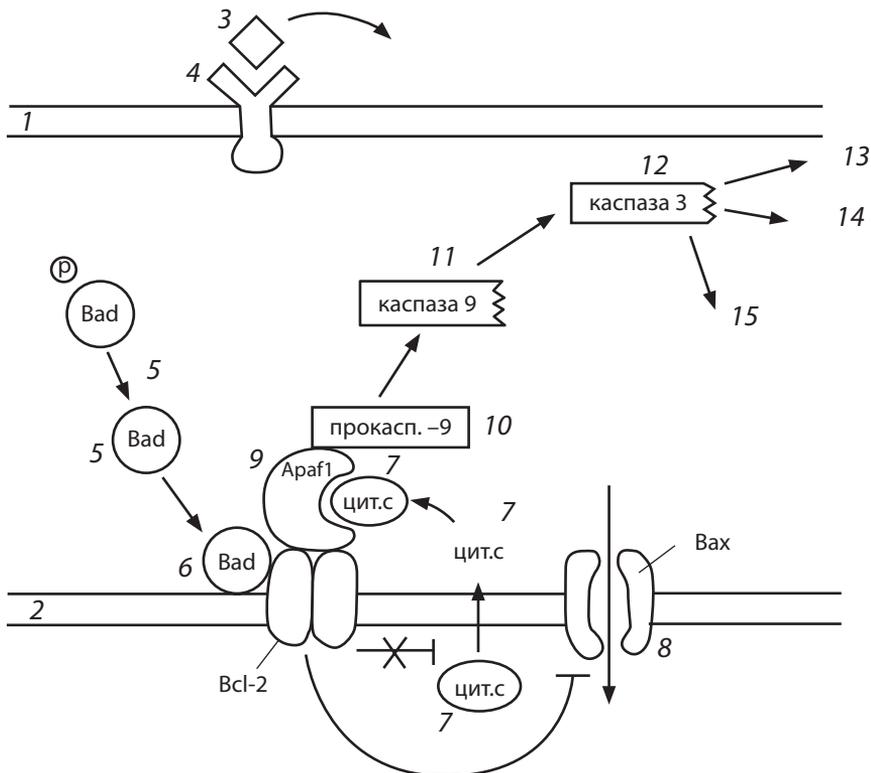
У позвоночных система ПГК более сложная. Здесь регулятором является белок *Bcl-2*, который ингибирует адаптерный белок *Araf-1*, стимулирующий каскад активации специальных протеиназ — **каспаз** (табл. 17). Каспазы — цистеиновые протеазы, которые расщепляют белки по аспарагиновой кислоте. В клетке каспазы синтезируются в форме латентных предшественников — прокаспаз. У *C.elegans* белок *Ced-3* также является каспазой. Существуют иницирующие и эффекторные каспазы. Иницирующие каспазы активируют латентные формы эффекторных каспаз. Субстратами для действия активированных каспаз служат более 60 различных белков. Это, например, киназа фокальных адгезионных структур, инактивация которой приводит к отделению апоптотических клеток от соседей; это ламины, которые при действии каспаз разбираются; это цитоскелетные белки (промежуточные филаменты, актин, гельзолин), инактивация которых приводит к изменению формы клетки и к появлению на ее поверхности пузырей, которые

Таблица 17. Развитие процесса программированной клеточной смерти (апоптоза)

	Регулятор	Адаптер	Эффектор	Результат	Результат
<i>C.elegans</i>	<i>Ced-9</i> —	<i>Ced-4</i> —>	<i>Ced-3</i> —>	ПКС	
Позвоночные	<i>Bcl-2</i> —	<i>Araf-1</i> —>	<i>Casp 9</i> —>	<i>Casp 3</i> —>	ПКС

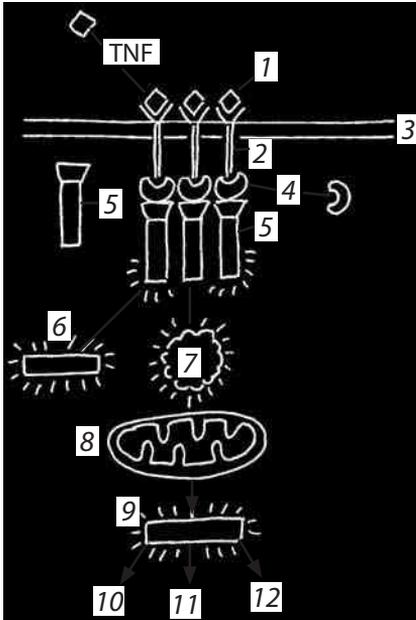
дают начало апоптотическим тельцам; это активируемая эндонуклеаза CAD, которая расщепляет ДНК на олигонуклеотидные нуклетосомные фрагменты; это ферменты репарации ДНК, подавление которых предотвращает восстановление структуры ДНК, и многие другие.

Одним из примеров разворачивания апоптотического ответа может являться реакция клетки на отсутствие сигнала от необходимого трофического фактора, например, фактора роста нервов (NGF) или андрогена (рис. 26.8). В цитоплазме клеток в присутствии трофических факторов находится в неактивной форме еще один участник реакции — фосфорилированный белок Bad. В отсутствие трофического фактора этот белок дефосфорилируется и связывается с белком Bcl-2 на внешней митохондриальной мембране и этим ингибирует его антиапоптотные свойства. После этого активируется мембранный проапоптотический белок Bax, открывая путь ионам, входящим в митохондрию. В это же время из митохондрий через



**Рис. 26.8.** Одна из моделей развития апоптоза при отсутствии трофического фактора:

1 — плазматическая мембрана; 2 — внешняя мембрана митохондрии; 3 — трофический фактор; 4 — рецептор трофического фактора; 5 — дефосфорилирование проапоптотического белка Bad; 6 — Bad ингибирует антиапоптотический белок Bcl-2; 7 — выход цитохрома С в цитозоль; 8 — активация апоптотического белка Bax, открытие ионных каналов; 9 — цитохром С активирует адаптерный белок Араф1; 10 — активация прокаспазы 9; 11 — активация каспазы 9; 12 — активация каспазы 3; 13 — конденсация и деградация хроматина; 14 — деградация ядерной ламины; 15 — деградация цитоскелета



**Рис. 26.9.** Фактор некроза опухолей (TNF) вызывает активацию каспаз и апоптоз клеток:

1 — TNF; 2 — рецептор TNF; 3 — плазматическая мембрана; 4 — адапторные белки; 5 — неактивная каспаза-8; 6 — активированная каспаза-8; 7 — активированный прокаспазный белок Bid; 8 — митохондрия; 9 — активированная каспаза-9; 10–12 — другие активированные каспазы

лимфоциты-киллеры могут индуцировать апоптоз путем связывания своего мембранного белка Fas-лиганда с Fas-белком («рецептором гибели» на поверхности мишенной клетки). Такие Fas-рецепторы связываются с внутриклеточными адапторными белками, которые в свою очередь связываются с внутриклеточными молекулами прокаспазы 8 и их активируют, что приводит к активации других каспаз и к апоптозу (рис. 26.10).

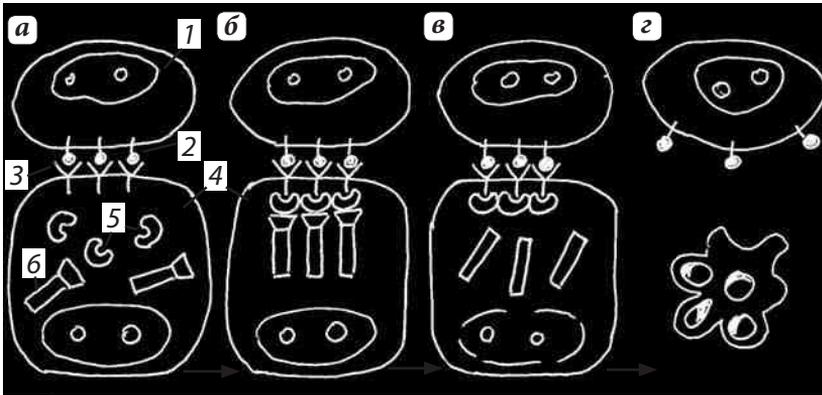
Избирательные повреждения митохондрий, при которых в цитоплазму высвобождается цитохром С, также являются частой причиной развития апоптоза. Особенно митохондрии и другие клеточные компоненты страдают при образовании токсически активных форм кислорода (АФК), под действием которых во внутренней мембране митохондрий образуются неспецифические каналы с высокой проницаемостью для ионов, в результате чего матрикс митохондрий набухает, а внешняя мембрана разрывается. При этом растворенные в межмембранном пространстве белки вместе с цитохромом С выходят в цитоплазму. Среди освободившихся белков есть факторы, активирующие апоптоз, и прокаспаса 9.

Прямое внутриклеточное нарушение целостности мембран митохондрий (при действии митохондриальных ядов) приводит к освобождению и выходу

образовавшиеся в мембране поры в цитоплазму выходит цитохром С, который связывается с адаптерным белком Араф-1, который в свою очередь активирует прокаспазу 9. Активированная каспаза 9 запускает каскад других прокаспаз, в том числе каспазу 3, которые будучи протеиназами, начинают расщеплять мишенные белки (ламины, белки цитоскелета и др.), что вызывает апоптотическую смерть клетки, ее распад на части, на апоптотические тельца.

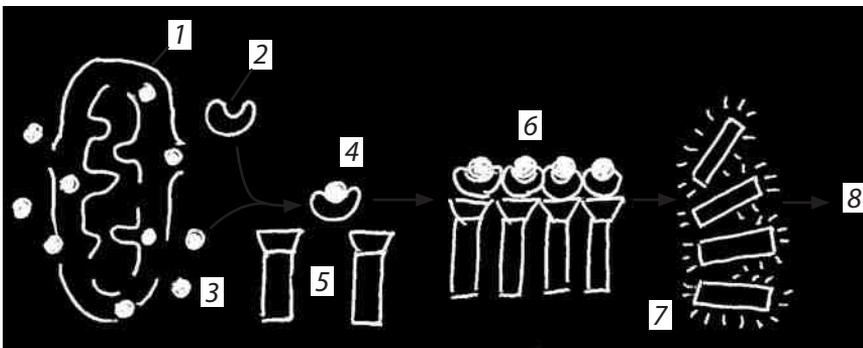
Существует несколько путей индукции апоптоза, минуя гормональные или другие трофические влияния. Так фактор некроза опухолей (TNF), вызывающий гибель не только опухолевых клеток, связывается с рецепторами на плазматической мембране клеток. Последние образуют связь через адапторные белки прямо с каспазой-8, которая активируется и в свою очередь активирует эффекторные каспазы, например прокаспазу Bid, которая активирует апоптоз по митохондриальному пути, активируя каспазу-9 (рис. 26.9).

Активация прокаспаз может запускаться извне клетки путем активации поверхностных белков-«рецепторов гибели». Так



**Рис. 26.10.** Апоптоз посредством FAS-системы:

**а** — начальная стадия активации FAS-системы: 1 — лимфоцит-киллер; 2 — FAS-лиганды; 3 — FAS-рецепторы; 4 — мшенные клетки; 5 — адапторные белки; 6 — неактивная каспаза-8; **б** — Агрегация FAS-лигандов, FAS-рецепторов и каспазы-8; **в** — отделение и активация молекул каспазы-8, каскад активации каспаз; **г** — отделение лимфоцита-киллера и апоптоз мшенной клетки



**Рис. 26.11.** Внутриклеточная активация апоптоза при повреждении митохондрий:

1 — повреждение митохондрий; 2 — адапторный белок Араф 1; 3 — цитохром С; 4 — выход цитохрома С и его связывание с Араф 1; 5 — неактивная прокаспазы-9; 6 — образование комплекса апоптосомы: Араф 1, цитохром С, прокаспазы-9; 7 — активация каспазы-9; 8 — каскад каспаз

в цитоплазму цитохрома С, который в свою очередь образует комплекс с прокаспазой 9, активирует ее, что приводит к дальнейшему каскаду активации каспаз и к апоптозу (рис. 26.11).

Как указывалось выше, апоптоз может быть вызван целым рядом внешних факторов, таких как радиация, действие некоторых токсинов, ингибиторов клеточного метаболизма.

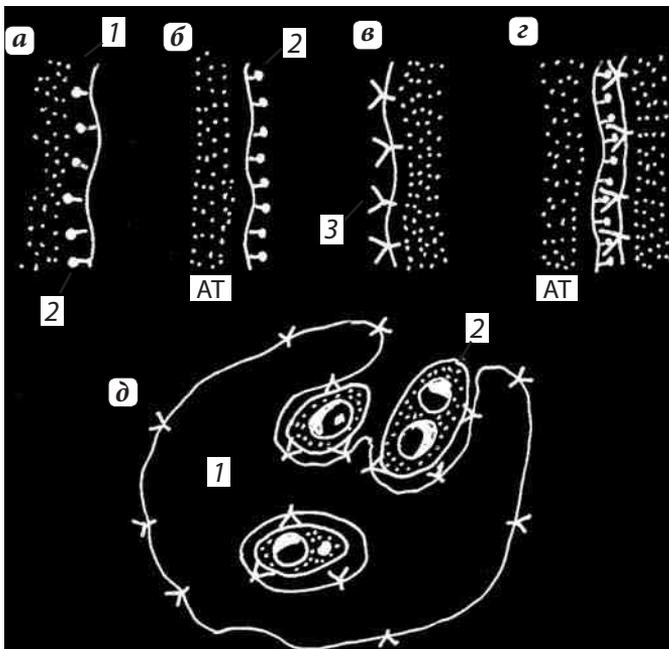
Как уже говорилось, необратимые повреждения ДНК вызывают апоптоз. Это связано с тем, что накапливающийся транскрипционный фактор, белок р53, не только активирует белок р21, который ингибирует зависящую от циклина киназу и останавливает клеточный цикл в  $G_1$  или  $G_2$  фазе (см. рис. 25.13), но и активирует синтез проапоптотических белков (NUMA, Nуха) и экспрессию гена *baх*, продукт которого запускает апоптоз.

Многие токсины (рицин, дифтерийный токсин и др.), а также антиметаболиты могут вызывать гибель клеток путем апоптоза. При нарушении синтеза белка в эндоплазматическом ретикулуме в развитии апоптоза участвует локализованная там прокаспаза 12, которая активирует ряд других каспаз, и в том числе каспазу 3.

Апоптотические тельца, окруженные плазматической мембраной разрушенной клетки, привлекают отдельные макрофаги, которые их поглощают и переваривают с помощью своих лизосом. Макрофаги не реагируют на соседние нормальные клетки, но узнают апоптотические. Это связано с тем, что при апоптозе нарушается асимметрия плазматической мембраны и на ее поверхности появляется фосфатидилсерин, негативно заряженный фосфолипид, который в норме располагается в цитозольной части плазматической мембраны. Таким образом, путем избирательного фагоцитоза ткани как бы очищаются от погибших апоптотических клеток (рис. 26.12).

Биологическая роль апоптоза или запрограммированной смерти клеток очень велика: это удаление отработавших свое или ненужных на данном этапе развития клеток, а также удаление измененных или патологических клеток, особенно мутантных или зараженных вирусами.

Для того чтобы клетки в многоклеточном организме существовали, нужны сигналы на их выживание — трофические факторы, сигнальные молекулы. Эти сигналы могут быть переданы на расстоянии и уловлены соответствующими рецепторными молекулами на клетках-мишенях (гормональная, эндокринная сигнализация), это может быть паракринная связь, когда сигнал передается на соседнюю клетку (например, передача нейромедиатора). При отсутствии таких трофических



**Рис. 26.12.** Фагоцитоз апоптотических тел:

**а** — участок плазматической мембраны (1) нормальной клетки; 2 — липид фосфатидилсерин (ФС) локализован в мембране со стороны цитоплазмы; **б** — участок плазматической мембраны (1) апоптотического тельца (АТ): молекулы ФС (2) расположены на внешней стороне плазматической мембраны; **в** — рецепторы на плазматической мембране фагоцита (3); **г** — рецепторы связываются с ФС на внешней поверхности апоптотического тельца (АТ); **д** — фагоцит (1) поглощает АТ (2)

Таблица 18. Сигналы, стимулирующие апоптоз

Позитивный запуск апоптоза		Апоптоз при отсутствии факторов роста	
Типы клеток	Факторы	Типы клеток	Факторы роста
Тимоциты	Т-клеточный антиген, диоксин	Предшественники клеток кроветворения	Цитокины
Лимфоциты	Глюкокортикоиды	Т-лимфоциты	Интерлейкины
Нервные клетки	Глутамат	В-лимфоциты	Интерлейкин-2
Гепатоциты	Трансформирующий фактор роста $\beta$	Эозинофилы	Антиген
Макрофаги	Бактериальные токсины	Нервные клетки	Интерлейкин-5
Разные	TNF-фактор некроза опухолей, Повреждение ДНК, Повреждение митохондрий, Колхицин, Активные формы кислорода, Ингибиторы белкового синтеза	Глия	Фактор роста нервов
		Молочная железа	Эстроген, Прогестерон
		Простата	Андроген

факторов реализуется программа апоптоза. С другой стороны, апоптоз может вызываться сигнальными молекулами, например при резорбции хвоста головастиков под действием тироксина. Кроме того, действие ряда токсинов, влияющих на отдельные звенья метаболизма клетки, также может стать причиной клеточной гибели посредством апоптоза (табл. 18).

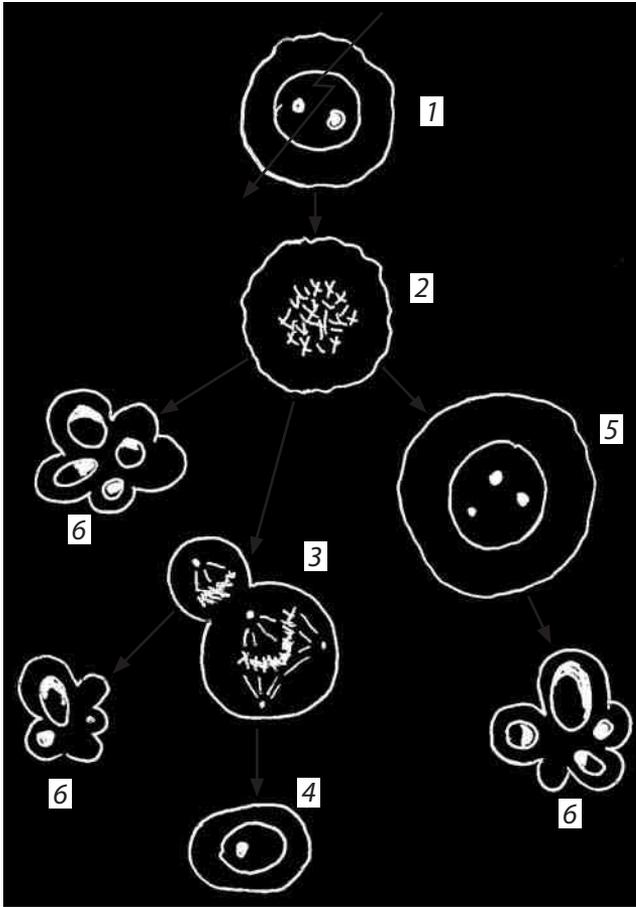
### Митотическая катастрофа как вариант апоптоза

Как уже говорилось, действие различных повреждающих клетку факторов может привести к повреждению структур, участвующих в митотическом делении: собственно хромосом, аппарата расхождения хромосом, механизма цитотомии. При этом часто клетки, вступающие в процесс деления, его не заканчивают, погибая или во время самого деления, или в следующем клеточном поколении. Такая гибель клеток носит название запрограммированной клеточной смерти типа «митотической катастрофы». Характерно, что этот тип клеточной гибели связан с предшествующей делению патологией клетки и по ряду признаков относится к апоптозу. Таким образом, апоптоз может происходить как в обычных одноядерных клетках, так и в клетках, имеющих ядерные патологии.

В морфологическом отношении к таким клеткам в состоянии «митотической катастрофы» относятся К-митотические клетки, где хромосомы не собираются в метафазную пластинку, не конгрессируют, клетки с микроядрами, клетки с полиплоидными ядрами, клетки с многополюсными фигурами митоза и др. Такого типа патологически измененные клетки погибают по апоптотическому типу.

При К-митозе происходит активация программы апоптоза (освобождение митохондриальных проапоптотических белков, в особенности цитохрома С и АIF, активация каспаз и деградация ДНК).

В ряде случаев клетка не погибает во время митоза, а может или перейти в полиплоидное состояние или при активации центросом образовать метафазы и затем



**Рис. 26.13.** Варианты «митотических катастроф»:

1 — клетка с повреждением митотического аппарата; 2 — К-митоз; 3 — многополюсный митоз; 4 — анеуплоидная клетка; 5 — полиплоидная клетка; 6 — АП-апоптоз

делиться с нарушением хромосомных наборов, при этом возникают анеуплоидные клетки. При образовании многополюсных митозов появляются клетки разной величины и с разным количеством хромосом. Именно такие клетки, возникающие из аномальных митотических клеток, в  $G_1$  периоде следующего клеточного цикла подвергаются апоптотической гибели (рис. 26.13).

Считается, что причинами митотических катастроф является сочетание нарушения контрольных процессов в пунктах проверки клеточного цикла в S-фазе (незавершенность или нарушение репликации ДНК) и  $G_2$ -фазе (индукция образования митотического веретена) и клеточного повреждения.

В результате митотической катастрофы, особенно на этапе постмитотического апоптоза в

$G_1$ -периоде нового цикла при многополюсных митозах могут сохраняться анеуплоидные клетки, избежавшие апоптоза. Они создают риск появления клеток с нарушенным контролем пролиферации, что может дать начало возникновению клонов опухолевых клеток.

### Аутофагия

**Аутофагия** означает процесс «самопоедания» путем лизосомной деградации клеточных компонентов. Аутофагия — нормальный клеточный механизм для освобождения клеток от отработавших структур и единственный путь освобождения от дефектных органелл. В процессе аутофагии образуются изолирующие мембраны, вероятно возникающие из вакуолярного компартмента эндоплазматического ретикулума (преаутофагосомные структуры), которые обволакивают

и отделяют от гиалоплазмы такие структуры, как митохондрии, ЭПР, рибосомы и др. (рис. 26.14). Торцы этих мембран сливаются, образуя двойные или многомембранные полости, известные как аутофагосомы или аутофагические вакуоли. Затем внешняя мембрана аутофагосомы сливается с первичными лизосомами, и тем самым изолированные цитоплазматические компоненты подвергаются атаке лизосомных гидролаз.

В отличие от апоптоза при аутофагии происходит ранняя деградация органелл, но элементы цитоскелета сохраняются до поздних стадий, фрагментация ДНК также происходит на поздних стадиях разрушения клеток, которые распадаются на вакуолизованные фрагменты, поглощаемые фагоцитами. Так же как и при апоптозе воспалительная реакция отсутствует (рис. 26.15).

Как было показано на дрожжевых клетках, на клетках *Dictyostelium*, *C. Elegans* и на растительных клетках аутофагия представляет собой скорее защитный механизм в условиях недостатка пищевых субстратов. Продукты гидролиза (аминокислоты, нуклеотиды, жирные кислоты и др.) из аутофагосом поступают в цитозоль и этим компенсируют недостаток мономеров при клеточном голодании. Однако понятно, что гибель клеток за счет аутофагии происходит при необратимом недостатке питательных субстратов.

Аутофагию легко вызвать в культуре клеток млекопитающих при субстратной пищевой недостаточности, хотя в этом случае клетки скорее подвергаются апоптозу, чем аутофагии. Тем не менее при некоторых заболеваниях, включая нейродегенеративные нарушения при болезни Альцгеймера и Паркинсона, часто наблюдаются в клетках признаки аутофагии как одного из механизмов клеточной гибели. Часто морфологические картины, характерные для аутофагии, встречаются и при некрозе клеток как ответ на один и тот же стимул.

Существует точка зрения, что аутофагия представляет собой скорее самоограниченную стратегию выживания, чем первичную и необратимую программу клеточной гибели.

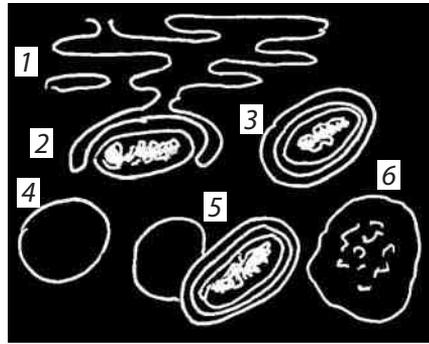


Рис. 26.14. Образование аутофагосом из мембран ЭПР:

1 — ЭПР; 2 — преаутофагосомная структура; 3 — аутофагосома; 4 — лизосома; 5 — слияние лизосом с аутофагосомой; 6 — аутолизосома

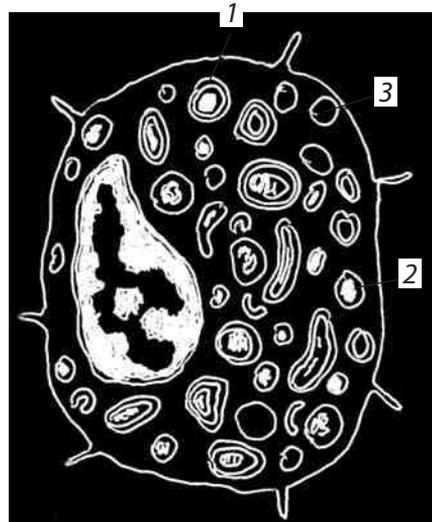


Рис. 26.15. Аутофагическая клетка на поздних стадиях гибели:

1 — аутофагосомы; 2 — лизосомы; 3 — вакуолизованные фрагменты клетки

Однако обнаружены группы генов, регулирующих аутофагию в норме. Так, у дрожжей группа генов *Atg* кодирует белки для индукции аутофагии и для образования, созревания и рециклирования аутофагосом. У млекопитающих также есть гомологичный дрожжевому белку *Atg6*, белок *Beclin1*, который вовлекается в ранние стадии формирования аутофагических вакуолей.

Существуют перекрестные взаимодействия между апоптотической сигнализацией, аутофагией и митохондриями. Так некоторые проапоптотические сигналы индуцируют аутофагию и, наоборот, антиапоптотические сигнальные пути стимулируют аутофагию.

Митохондрии могут интегрировать сигналы КС и аутофагическую активность. Так митохондрии генерируют апоптотические сигналы, которые устраняются аутофагией. Таким образом, митохондрии осуществляют связь, при которой аутофагия и апоптоз могут взаимодействовать: гены, вовлеченные в митохондриальную физиологию или регуляцию апоптоза, взаимодействуют с факторами аутофагии. Так у млекопитающих белки семейства *Bcl-2*, расположенные на внешней мембране митохондрий, могут влиять на аутофагию. В лейкоэмических клетках человека *Bcl-2* усиливает аутофагию независимо от каспаз. Вероятно, *Bcl-2* подавляет аутофагию, прямо влияя на белок *Beclin-1*, и что взаимодействие между *Bcl-2* и *Beclin-1* может скорее поддерживать аутофагию на уровне выживания клеток, чем приводить их к гибели.

### Программированный некроз (ПГК III типа)

Для ПГК типа III, или некрозоподобной ПГК, характерно отсутствие лизосомного участия, значительное набухание органелл, разрыв плазматической мембраны. Этот тип КС подразделяется на «тип IIIA», включающий полную дезинтеграцию цитоплазмы, и «тип IIIB», которому свойственно более умеренное разрушение, набухание цистерн ЭПР и фагоцитоз погибших клеток.

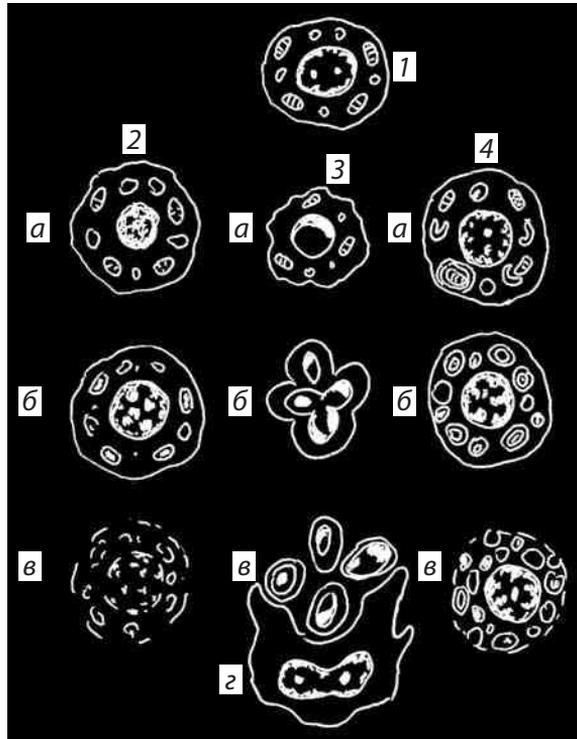
При ПГК III типа происходит раннее прекращение синтеза АТФ, снижение мембранного потенциала, образование активных форм кислорода. Так истощение АТФ в клетках под действием ингибитора АТФазы олигомицина приводит к переключению механизма гибели с апоптоза на некроз в лейкозных клетках. Клетки, обработанные олигомицином, погибали исключительно по некротическому пути под действием известных факторов апоптоза. Вслед за апоптотическим стимулом (например, экспрессия *Bax* или *TNF*) клетки погибали даже в присутствии неспецифических ингибиторов каспаз. В этих условиях клетки, которые должны были погибнуть путем апоптоза, обнаруживают все черты некротической гибели. Возможно, что инициация апоптоза может активно подавлять развитие ПГК III типа из-за того, что каспазы разрушают или инактивируют белки, необходимые для проявления «программируемого некроза». ПГК III встречается при поражениях ДНК и инициируется белком репарации (*PARP*) только в активно пролиферирующих клетках. Это связано с тем, что активация *PARP* приводит к быстрому истощению *NAD* и тем самым подавлению гликолиза, подавлению синтеза АТФ и к некротической гибели клеток.

Закljučая этот раздел, необходимо отметить, что картины клеточной патологии очень разнообразны и зависят с одной стороны от тяжести и продолжительности действия внутриклеточных или внешних факторов, нарушающих клеточный метаболизм, а с другой стороны, — от путей, которыми патологические изменения реализуются. Как мы видели, поражения клеток могут быть обратимыми и необратимыми, вызванными внешними разнообразными факторами или изменениями метаболизма самих клеток, часто обусловленными генетическими причинами. И в этих случаях клетки как бы пассивно отвечают на патологические воздействия (некроз) или, если повреждения обратимы, способны восстанавливать исходное состояние.

С другой стороны, существуют пути поражения и гибели клеток, генетически детерминированные, такие как примеры «программированной» клеточной гибели. Если в случаях некроза

клетки погибают в результате пассивно развивающихся событий деградации клеточных компонентов, то при программированной гибели происходит активная клеточная реакция, приводящая к элиминации клеток в результате реализации именно генетической программы (апоптоз, аутофагия) (рис. 26.16).

Если «цель» некроза — распад и уничтожение умирающих или уже мертвых клеток с тем, чтобы вызвать защитную реакцию организма в виде иммунного ответа, то при формах программированной клеточной гибели организм стремится освободиться от ненужных в данный момент нормальных, здоровых клеток или от клеток, которые в будущем могут принести вред всему организму (мутантные клетки, клетки, пораженные вирусами, клетки, потерявшие регуляцию своей активности, и т.д.).



**Рис. 26.16.** Основные формы клеточной гибели:

1 — нормальная клетка; 2 — некроз клетки: а — набухание и пикноз ядра; б — кариорексис; в — активация лизосом, кариолизис и лизис клетки; 3 — апоптоз: а — конденсация хроматина; б — пузырение ядра и цитоплазмы; в — распад клетки на апоптотические тельца; г — фагоцит; 4 — аутофагия: а — образование первичных аутофагосом; б — заполнение клетки аутофагосомными вакуолями, в — вакуолизация и фрагментация клетки

*Учебное издание*

**Ченцов Юрий Сергеевич**

# **ЦИТОЛОГИЯ**

## **с элементами клеточной патологии**

**Учебное пособие для университетов и медицинских вузов**

Санитарно-эпидемиологическое заключение  
№ 77.99.60.953.Д.008014.07.09 от 08.07.2009 г.

Подписано в печать 30.09.2009. Формат 70×100/16.  
Бумага офсетная. Гарнитура Minion Pro. Печать офсетная.  
Объем 23 печ. л. Тираж 4000 экз. Заказ №

ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»  
119048, Москва, ул. Усачева, д. 62, стр. 1, оф. 6  
Тел./факс: (499) 245-45-55  
E-mail: miapubl@mail.ru  
<http://www.medagency.ru>  
Интернет-магазин: [www.medkniga.ru](http://www.medkniga.ru)

Книга почтой на Украине: а/я 4539, г. Винница, 21037  
E-mail: [maxbooks@svitonline.com](mailto:maxbooks@svitonline.com)  
Телефоны: +380688347389, 8 (0432) 660510

Отпечатано в ОАО ПИК «Идел-Пресс»  
420066, г. Казань, ул. Декабристов, д. 2

ISBN 978-5-9986-0013-5



9 785998 600135