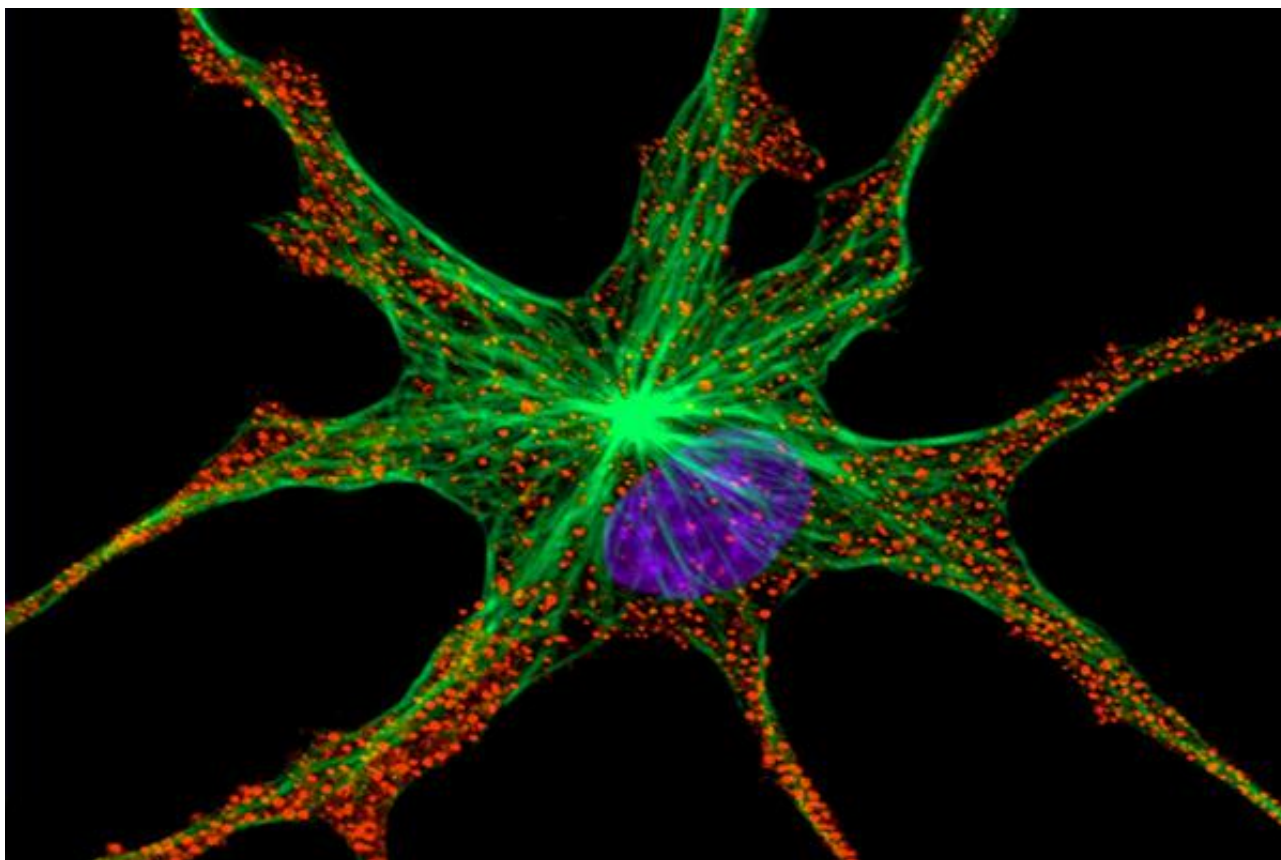


Московская гимназия на Юго-Западе №1543

Материалы по курсу

ЦИТОЛОГИЯ

ученика 10 "Б" класса _____



Москва 2006 г.

Содержание

Занятие 1. Клеточная теория. Методы цитологии.

Строение растительной и животной клеток. Структурно- функциональные образования клетки. Световая микроскопия. Витальное (прижизненное) изучение клеток. Изучение фиксированных клеток. Электронная микроскопия. Фракционирование (разделение) клеток.

стр.5

Занятие 2. Центральная догма молекулярной биологии.

Роль белков в жизни клетки. ДНК→ иРНК→ Белок. Гены. Принцип комплементарности ДНК. Транскрипция и трансляция. Функция тРНК и рибосом. Аминоацил-тРНК-синтазы.

стр.10

Занятие 3. Строение клеточного ядра.

Роль ядра в жизнедеятельности клетки. Ядерные компоненты прокариотов. Ядро эукариотов. Клеточный цикл. Полиплоидия. Пространственное расположение хромосом в интерфазном ядре.

стр.13

Занятие 4. Структура хроматина.

ДНК хроматина. Эухроматин и гетерохроматин. Репликация ДНК эукариотов. Белки хроматина — гистоны. Уровни компактизации хроматина. Ядерный белковый матрикс. Ультраструктура митотических хромосом.

стр.22

Занятие 5. Контрольная №1. Ядрышко. Синтез рРНК и мРНК

Чем определяется число ядрышек в клетке. Строение и функционирование генов рРНК. Структура ядрышка и типы ядрышек. Ядрышко во время митоза. Механизмы транскрипции генов. Структурные изменения РНК в ядре. Синтез РНК в пуфах политенных хромосом.

стр.28

Занятие 6. Ядерная оболочка.

Компоненты ядерной оболочки. Роль ядерной оболочки в ядерно-цитоплазматическом обмене. Импорт кариофильных белков. Экспорт из ядра в цитоплазму. Динамика ядерной оболочки в митозе.

стр.31

Занятие 7. Общие свойства биологических мембран. Плазматическая мембрана.

Барьерно-транспортная роль плазмалеммы. Трансмембранный перенос. Эндоцитоз и экзоцитоз. Рецепторная роль плазмалеммы. Межклеточные соединения (контакты). Специализированные структуры плазматической мембраны. Клеточная стенка (оболочка) растений. Клеточные оболочки бактерий

стр.34

Занятие 8. Гранулярный эндоплазматический ретикулум. Гладкий ретикулум и другие мембранные вакуоли.

Эндоплазматическая сеть. Строение гранулярного ретикулума. Синтез растворимых белков. Синтез клеточных мембран. Секретция белков и образование мембран у бактерий. Гладкий (агранулярный) эндоплазматический ретикулум. Вакуоли растительных клеток. Сферосомы. Пероксисомы (микротельца).

стр.43

Занятие 9. Контрольная №2. Аппарат Гольджи. Лизосомы.

Строение аппарата Гольджи. Секреторная функция аппарата Гольджи. Модификация белков в аппарате Гольджи. Сортировка белков в аппарате Гольджи. Общие характеристики лизосом. Морфологическая гетерогенность лизосом. Болезни человека, связанные с лизосомами.

стр.46

Занятие 10. Митохондрии и пластиды.

Строение митохондрий. Функции митохондрий. Увеличение числа митохондрий. Хлоропласт. Строение и функции хлоропластов. Жизненный цикл и функциональные перестройки пластид. Геном митохондрий и пластид.

стр.52

Занятие 11. Микрофиламенты. Микротрубочки. Промежуточные филаменты. Клеточный центр. Двигательный аппарат бактерий.

Актиновые микрофиламенты. Мышечные клетки. Актиновые компоненты неммышечных клеток
Общая характеристика микротрубочек. Строение и движение ресничек. Микротрубочки цитоплазмы.
Центриоль. Центросомный цикл.

стр.55

Занятие 12. Контрольная №3. Митотическое деление клеток.

Общая организация митоза. Кинетохор. Динамика митоза. Митоз растительной клетки. Различные типы митоза эукариотов.

стр.62

Занятие 13. Мейоз.

Общая организация мейоза. Динамика мейоза.

стр.66

Занятие 14. Передача сигналов внутри клетки и между клетками.

Типы межклеточной передачи сигналов. Типы внутриклеточной передачи сигналов. Сигнальные каскады. G-белки и роль фосфорилирования белков. Регуляция клеточного цикла. Регуляция клеточного роста. Онкогенез и опухолеобразование.

стр.69

Занятие 15. Контрольная №4.

В каждую контрольную работу могут входить вопросы по *всему* пройденному материалу настоящего курса. Во время контрольной работы запрещено использование конспектов, распечаток либо учебников.

Оценки за курс выставляются по итогам 4 контрольных работ.

Список дополнительной литературы для курса «Цитология»:

Б.Албертс и др. «Молекулярная биология клетки» (любое издание).

В.Ченцов «Общая цитология».1996 г.

В.А.Фуралев «Цитология»1998 г.

С.Гилберт «Биология развития» 1994 г.

Занятие 1. Клеточная теория. Методы цитологии.

Цитология (от греч. «kytos» — ячейка, клетка) — наука о клетке. Клеточная теория—это обобщенные представления о строении клеток как единиц живого, об их размножении и роли в формировании многоклеточных организмов.

ГУК (Нooke) Роберт (18 июля 1635, Фрешуотер, о. Уайт — 3 марта 1703, Лондон) - английский естествоиспытатель, разносторонний ученый и экспериментатор, архитектор. Высказал гипотезу тяготения. Сторонник волновой теории света. Улучшил и изобрел многие приборы, установил (совместно с Х. Гюйгенсом) постоянные точки термометра. Усовершенствовал микроскоп и установил клеточное строение тканей, ввел термин “клетка”. В 1665первым наблюдал с помощью увеличительных линз подразделение тканей пробки на «ячейки», или «клетки».



Рис 1. Роберт Гук

1671- Марчелло Мальпиги (1628-1694) и Неемия Грю (1641-1712) показали, что разнообразные части растений состоят из тесно расположенных «пузырьков», или «мешочков».

ЛЕВЕНГУК (Leeuwenhoek) Антони ван (1632-1723)- нидерландский натуралист, один из основоположников научной микроскопии. Изготовив линзы с 150-300-кратным увеличением, впервые наблюдал и зарисовал (публикации с 1673) ряд простейших, сперматозоиды, бактерии, эритроциты и их движение в капиллярах.



Рис 2. Антони ван Левентук

В 1781 Ф. Фонтана описал клетки животных.

Но эти и другие многочисленные исследования не привели к пониманию универсальности клеточного строения, к четким представлениям о том, что же являет собой клетка. Прогресс в изучении микроанатомии клетки связан с развитием микроскопирования в 19 в. К этому времени изменились представления о строении клеток: главным в организации клетки стали считаться не клеточная стенка, а собственно ее содержимое, протоплазма (Пуркинье, 1830). В протоплазме был открыт постоянный компонент — ядро (Браун, 1833). Все эти многочисленные наблюдения позволили Т. Шванну в 1838г. 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. Дальнейшее развитие эти представления получили в работах Р. Вирхова (1858).

ШВАНН (Schwann) Теодор (1810 - 82)

немецкий биолог, основоположник клеточной теории. На основании собственных исследований, а также работ М. Шлейдена и других ученых в классическом труде “Микроскопические исследования о соответствии в структуре и росте животных и растений” (1839) впервые сформулировал основные положения об образовании клеток и клеточном строении всех организмов.



Рис 3. Теодор Шванн

Основные постулаты современной клеточной теории следующие:

- 1) клетка — элементарная единица живого;
- 2) клетки разных организмов гомологичны по своему строению;
- 3) размножение клеток происходит путем деления исходной клетки;
- 4) многоклеточные организмы — это сложные ансамбли клеток, объединенные в целостные, интегрированные системы тканей и органов, соподчиненные и связанные между собой межклеточными, гуморальными и нервными формами регуляции.

Клетка — элементарная единица живого

Рудольф Вирхов (Рудольф Людвиг Карл ВИРХОВ, 1821-1902) 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).

Среди живых организмов встречаются два типа организации клеток. К наиболее простому типу строения можно отнести клетки бактерий (**прокариот**), к более высокоорганизованному — клетки всех остальных живых существ, начиная от низших растений и кончая человеком (**эукариот**). Клетки бактерий принято называть прокариотическими (доядерными), так как у них генетический материал не отделен от цитоплазмы мембранами. Клетки всех остальных представителей живого — эукариотическими (собственно ядерными), потому что у них обязательной структурой является клеточное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой.



Рис 4. Рудольф Вирхов

Гомологичность клеток

Термин «гомологичность» в биологии означает общность происхождения. Руки человека, крыло птицы, передняя нога лошади гомологичны 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. Хорошо известно разнообразие форм клеток бактериальных и высших организмов. Такое одновременное сходство строения и разнообразие форм определяются тем, что клеточные функции можно грубо подразделить на обязательные и необязательные, 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 синезеленых 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 эволюционной приспособленности отдельных бактериальных одноклеточных организмов к условиям среды обитания.

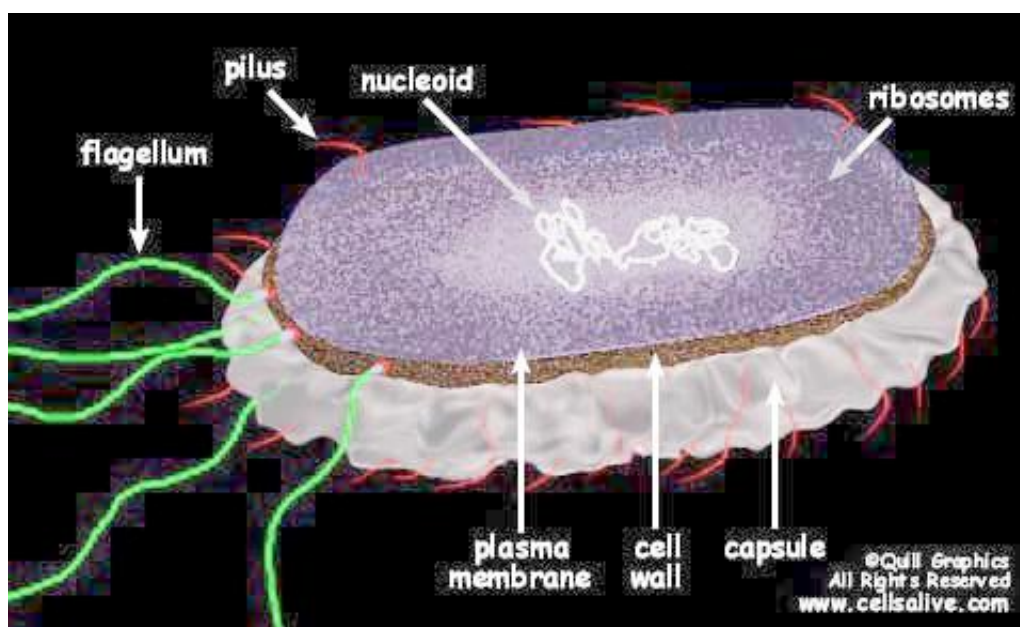


Рис 2. Схема строения бактериальной клетки

Та же картина наблюдается и у эукариотических клеток. Строение ядра всех эукариотических клеток от низших грибов до позвоночных принципиально сходно. Сходны также строение и функции других внутриклеточных структур. Такое сходство клеток определяется гомологичностью обще клеточных функций, связанных с поддержанием самой живой системы (синтез нуклеиновых кислот и белков, биоэнергетика клетки и т. д.

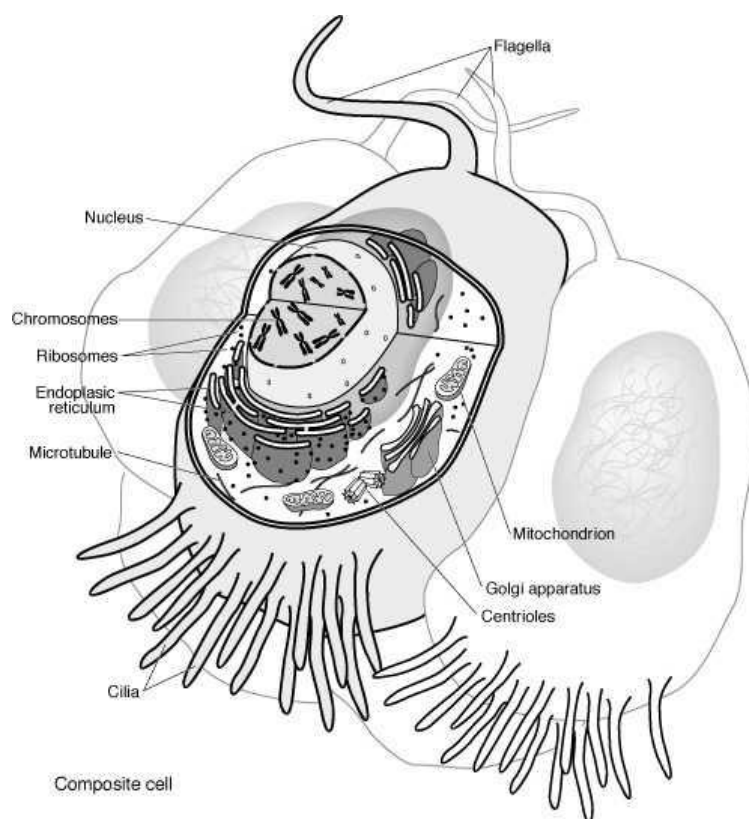


Рис 3. Схема строения клетки эукариот.

Клетка от клетки

Размножение прокариотических и эукариотических клеток происходит только путем деления исходной клетки («*omnis cellula e cellula*»- «всякая клетка от клетки»), которому предшествует воспроизведение ее генетического материала (репликация ДНК).

У эукариотических клеток единственным 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 как у растительных, так и у животных клеток.

Структурно-функциональные системы клетки

При рассмотрении компонентов эукариотической клетки можно выделить следующие структурно-функциональные системы:

- 1) систему сохранения, воспроизведения и реализации генетической информации — **ядро**;
- 2) систему промежуточного обмена — **гиалоплазма**;
- 3) рецепторно-барьерно-транспортную систему — **плазматическую мембрану**, или плазмалемму;
- 4) систему синтеза, сегрегации и внутриклеточного транспорта биополимеров (кроме нуклеиновых кислот) — **вакуолярную систему** (эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, лизосомы и другие одномембранные компартменты);
- 5) каркасно-двигательную систему **цитоскелета**;
- 6) систему энергообеспечения — **митохондрии**;
- 7) систему фотосинтеза (автотрофные растительные организмы) — **пластиды**.

Еще раз надо подчеркнуть, что такое разделение условно, поскольку все эти системы или подсистемы находятся, во взаимной структурно- функциональной связи и не существуют автономно, независимо одна от другой.

МЕТОДЫ 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.).

Световая микроскопия

Световой микроскоп представляет собой оптическую систему, состоящую из конденсора, объектива и окуляра, которые используются для рассмотрения объекта. Разрешение микроскопа зависит от **длины волны** — чем она меньше, тем меньшего размера деталь мы можем увидеть, и от нумерической **апертуры объектива** — 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 величина **0,2—0,3 мкм** является конечным пределом разрешения светового микроскопа.

Витальное (прижизненное) изучение клеток

Световой микроскоп позволяет видеть живые клетки. Для кратковременного наблюдения клетки помещают просто в жидкую среду на предметное стекло. Клетки крови или другие свободные клетки многоклеточных могут изучаться в капле плазмы или в специальных синтетических средах.

Для изучения клеток органов и тканей животных используют метод клеточных культур. Лучше всего 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.

В культуре можно выращивать и растительные клетки. Для этого кусочки ткани обрабатываются ферментами, растворяющими клеточные оболочки. Отделившиеся клеточные тела, протопласты, помещают в культуральную среду, где они делятся и образуют зоны размножившихся клеток.

При изучении живых клеток их пытаются окрашивать с помощью так называемых **витальных красителей**. Это красители, применяемые при очень большом разведении (1:200000), 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.

При изучении живых клеток широко используют **флуоресцирующие красители** и метод флуоресцентной микроскопии. Суть его заключается в том, что целый ряд веществ обладает способностью светиться (флуоресцировать) при поглощении ими световой энергии, причем длина волны света от флуоресцирующего красителя всегда больше поглощенной длины волны. Это позволяет с помощью светофильтров убрать исходное освещение и видеть свечение только окрашенных объектов.

Изучение фиксированных клеток

Несмотря на важность и достаточную простоту витальных наблюдений, большая часть сведений о структуре и свойствах клеток получена на стабилизированном, фиксированном материале. Если клетку повредить, она претерпевает ряд изменений, а после гибели в ней активируются автолитические ферменты, что приводит к грубым изменениям клеточной структуры. Следовательно, задачи фиксации — 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).

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 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 достигнуто разрешение в 1 А (**0,1 нм**) (вспомним, что величина О—Н связи в молекуле воды равна 0,99 А).

Максимальное разрешение электронного микроскопа реализуется сейчас только при исследовании металлов или кристаллических решеток. На биологических объектах такого разрешения получить пока не удается из-за низкой контрастности объекта.

Ультрамикротомия

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). Другое ограничение заключается в том, что даже если мы будем рассматривать неизменяющиеся объекты большой толщины (около 0,5—1 мкм), что в принципе возможно (например, в мегавольтном электронном микроскопе), то на конечном изображении будут наслаиваться проекции структур, располагающихся на разных уровнях по толщине объекта. 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).

Фракционирование клеток

В цитологии широко применяют различные методы биохимии, как аналитические, так и препаративные. В последнем случае можно получить в виде отдельных фракций разнообразные клеточные компоненты и изучать их химию, 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. В ближайшее время, вероятно, будут получены чистые фракции центриолей и ядерных пор.

Получение клеточных фракций начинается с общего разрушения клетки, с ее гомогенизации (рис. 4). Гомогенизация клеток заключается в разрушении клеточных границ различными, главным образом механическими, способами. Для этого используются ультразвуковая дезинтеграция клеток, растирание их в смеси с мельчайшими стеклянными шариками, пропускание их в потоке жидкости через узкие отверстия и др. При этом важно соблюдать такие условия, чтобы сами внутриклеточные компоненты не разрушались.

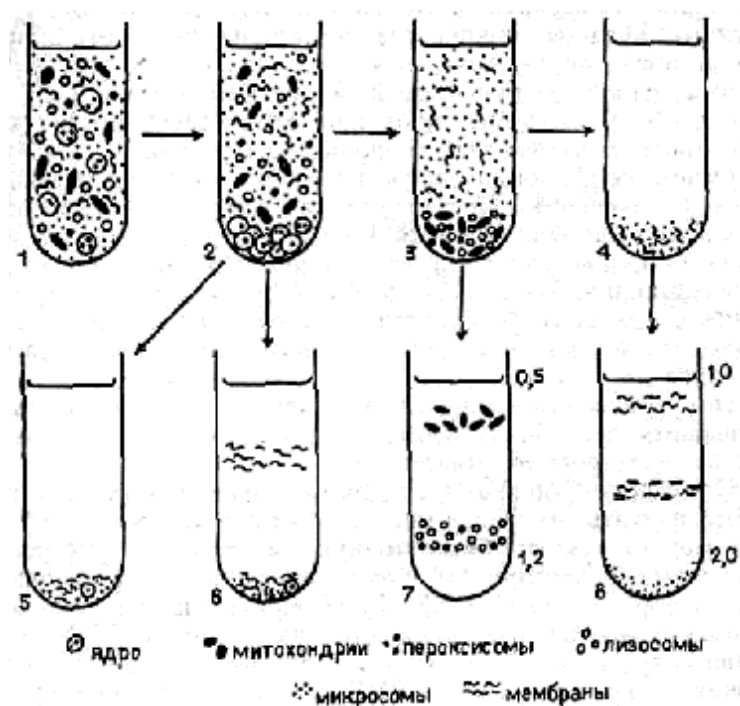


Рис. 4. Схема фракционирования клетки. 1 — гомогенат; 2 — осаждение ядер; 3 — осаждение макросомальной фракции; 4 — осаждение микросомальной фракции; 5 — после разрушения ядер и осаждения их крупных фрагментов и мембран в надосадочной жидкости находится растворимый в воде хроматин; 6 — при центрифугировании разрушенных ядер в градиенте сахарозы можно осадить ядрышки и ядерные фрагменты, а в надосадочной жидкости собрать фракцию ядерных оболочек; 7 — разделение митохондрий от лизосом; 8 — разделение макросом: мембран аппарата Гольджи и фрагментов плазматической мембраны в сахарозном градиенте. Цифры указывают молярность раствора сахарозы

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 — микросомы, фрагменты вакуолярной системы клетки. При повторном дробном центрифугировании этих смешанных подфракций можно получить чистые фракции. Так, при разделении макросомной подфракции получают отдельно митохондрий, лизосомы, пероксисомы. При разделении микросом можно получить фракцию мембран аппарата Гольджи, фрагментов плазматической мембраны, вакуолей, гранулярного ретикулума. В случаях более тонкого разделения фракций используют центрифугирование в градиенте плотности сахарозы, что позволяет хорошо разделить компоненты, даже незначительно отличающиеся друг от друга по удельной массе.

Полученные фракции, прежде чем их анализировать биохимическими способами, необходимо проверить 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 применяются бесклеточные системы для воссоздания клеточных надмолекулярных структур.

Занятие 2. Центральная догма молекулярной биологии.

Клетка как таковая выполняет множество разнообразных функций. Часть из них — общие, свойственные всем клеткам, часть — специальные, характерные для особых клеточных типов. Главными рабочими элементами 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 и кончая макромолекулами, определяются работой специальных белков или липопротеиновых комплексов, входящих в состав плазматической и иных клеточных мембран. Практически все процессы синтеза, распада, перестройки белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов происходят в результате активности специфических для каждой отдельной реакции белков-ферментов. Синтезы отдельных биологических мономеров, нуклеотидов, аминокислот, жирных кислот, сахаров и других также осуществляются огромным числом специфических ферментов-белков. Сокращение, приводящее к подвижности клеток или к перемещению веществ и структур внутри них, 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». По ним информация о будущей молекуле белка передается в места его синтеза (в рибосомы) посредником — информационной РНК (иРНК), нуклеотидный состав которой отражает 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).

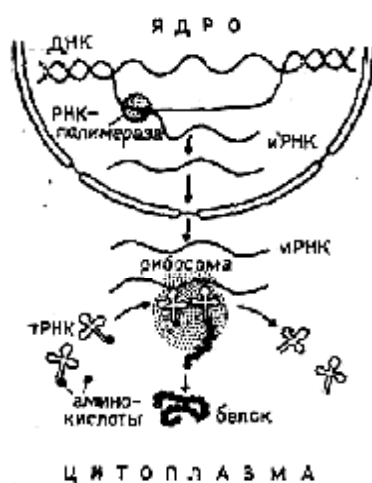


Рис. 1. Общая схема реализации генетической информации.

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.

В настоящее время на основании современных представлений о биосинтезе белков можно дать следующую общую принципиальную схему этого сложного и многоступенчатого процесса (рис. 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 — мономерами — этих цепей являются четыре сорта дезоксирибо-нуклеотидов, чередование или последовательность которых вдоль цепи уникальна 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 определять синтез большого числа функционально и химически различных белков клетки. За синтез одного типа белков ответственен 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 понятию 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, 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 эукариотических организмов будет клеточное ядро. У прокариотических организмов, не имеющих оформленного клеточного ядра, ДНК также обособлена от остальной части протоплазмы в виде одного или нескольких компактных нуклеоидных образований. В полном соответствии с этим ядро эукариотов или нуклеоид прокариотов издавна рассматривается как вместилище генов, как уникальный клеточный органоид, контролирующий реализацию наследственных признаков организмов и их передачу в поколениях.

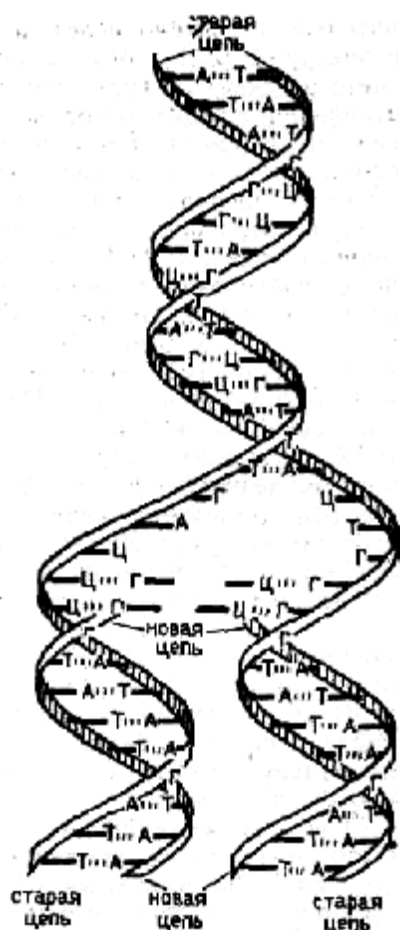


Рис. 2. Принцип комплементарности ДНК

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 самовоспроизводящейся молекулой. Для осуществления процесса синтеза — воспроизведения ДНК по описанной выше схеме — необходима деятельность специального ферментативного комплекса, носящего название ДНК-полимеразы.

Вместе с тем ДНК и отдельные ее функциональные участки, несущие информацию о структуре белков, непосредственного участия в создании 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 одной цепи ДНК как на матрице синтезируется химически родственный полимер — рибонуклеиновая кислота (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. 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 хранения в

Главный принцип, лежащий в основе макромолекулярной структуры ДНК, — это так называемый принцип комплементарности (рис. 2). Как уже упоминалось, молекула ДНК состоит из двух взаимозакрученных цепей. Они 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 нуклеотидов являются пара А—Т (аденин—тимин) и пара Г—Ц (гуанин—цитозин).

Видно, что указанный структурный принцип, лежащий в основе двутяжного строения молекулы ДНК, легко позволяет 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 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 однотяжных участков начинает собираться из присутствующих в среде свободных нуклеотидов вторая цепь в точном соответствии с принципом комплементарности.

Процесс расхождения двух цепочек исходной молекулы ДНК продолжается, и соответственно обе цепи дополняются комплементарными цепями. В результате, как видно на схеме, вместо одной возникают 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.

места ее реализации. Соответственно эти РНК обозначают как информационные или матричные РНК, сокращенно мРНК (или иРНК).

Рассмотренная часть схемы описывает поток информации, идущий от ДНК в виде молекул РНК внутриклеточным частицам, синтезирующим белки (рибосомам).

Мономерами белковой молекулы являются аминокислоты, которых имеется 20 различных сортов. Вовлечение аминокислот в процесс синтеза белка происходит через присоединение свободных аминокислот к особым молекулам РНК небольшого размера (трансферным РНК). Эти РНК несут адапторную функцию. Аминокислоты присоединяются к одному из концов трансферных РНК. Для каждого сорта аминокислоты в клетке существуют свои специфические, присоединяющие только этот сорт аминокислоты молекулы тРНК. В таком навешенном на тРНК виде аминокислоты и поступают в белоксинтезирующие частицы (рибосомы).

Рибосомы представляют собой комплексы нескольких молекул рибосомной РНК и белков. Диаметр одной рибосомной частицы около 200 нм. Процесс синтеза полипептидной цепи в рибосоме принято обозначать термином «трансляция».

В процессе трансляции участвуют все три известных класса РНК: информационная РНК, являющаяся объектом трансляции, рибосомная РНК, играющая роль организатора белоксинтезирующей рибонуклеопротеидной частицы — рибо-сомы, и адапторные РНК, осуществляющие функцию переводчика.

Синтез белка начинается при образовании соединений аминокислот с молекулами адапторных РНК, или тРНК. При этом сначала происходит энергетическая «активация» аминокислоты за счет ее ферментативной реакции с молекулой АТФ, а затем «активированная» аминокислота соединяется с концом относительно недлинной цепочки тРНК, приращение химической энергии активированной аминокислоты запасается при этом в виде энергии химической связи между аминокислотой и тРНК.

Одновременно с этим решается и вторая задача. Дело в том, что реакцию между аминокислотой и молекулой тРНК ведет фермент, обозначаемый как аминоацил-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-синтетаз), 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 на рибосоме даны на рис. 3.

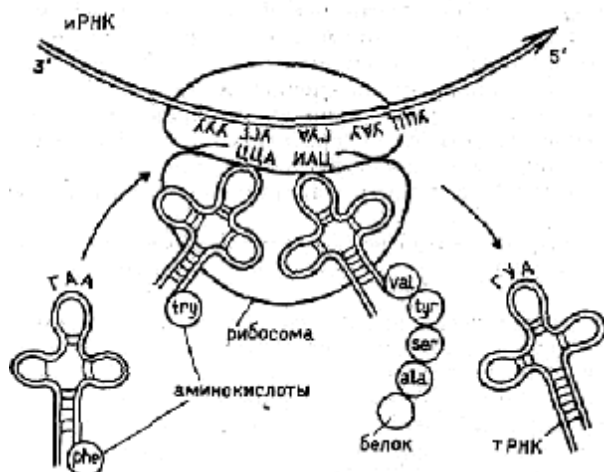


Рис. 3. Схема функционирования рибосомы.

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 находится лишь относительно короткий отрезок цепей 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.

В этом и состоит объяснение механизма того, почему данному триплету цепи мРНК соответствует строго определенная аминокислота. Видно, что необходимым промежуточным звеном, или адаптером, при «узнавании» каждой аминокислотой своего триплета на мРНК является адапторная РНК (тРНК).

На представленной схеме 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. 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 амино-ацил-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 «лево»

тРНК. Вслед за этим происходит переброска «левой» тРНК вместе со связанным с ней триплетом нуклеотидов мРНК «вправо», тогда прежняя «донорная» молекула тРНК окажется вытесненной и уйдет из рибосомы, 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 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.

Занятие 3. Строение клеточного ядра.

Роль ядерных структур в жизнедеятельности клетки

Ядро осуществляет две группы общих функций: одна из них — хранение генетической информации, другая — ее реализация, обеспечение синтеза белка.

В первую группу входят процессы, обуславливающие поддержание наследственной информации в виде неизменной структуры ДНК. Эти процессы связаны с наличием **репарационных ферментов**, ликвидирующих спонтанные повреждения молекулы ДНК (разрывы одной из цепей ДНК, двух цепей ДНК, изменение структуры нуклеотидов), что сохраняет строение молекул ДНК практически неизменным в ряду поколений клеток и организмов.

В ядре происходит воспроизведение, или **редупликация**, молекул ДНК, что дает возможность двум клеткам получить одинаковые и в качественном и в количественном смысле объемы генетической информации. В ядрах генетический материал подвергается изменениям и рекомбинации, что наблюдается во время мейоза (кроссинговер). Наконец, ядра непосредственно участвуют в процессах распределения молекул ДНК при делении клеток.

Другая группа процессов — создание собственно аппарата белкового синтеза. Это не только синтез (**транскрипция**) на молекулах ДНК различных информационных РНК, но также транскрипция всех видов трансферных (транспортных) и рибосомных РНК (тРНК и рРНК). В ядре эукариотов происходит также образование субъединиц рибосом путем соединения синтезированных в ядрышке рибосомных РНК с рибосомными белками, которые синтезируются в цитоплазме и переносятся в ядро.

Ядерные компоненты прокариотов

Как уже говорилось, клетки царства прокариотических, или «доядерных», организмов не имеют обособленного клеточного ядра. Однако у всех прокариотических клеток есть аналог ядра эукариотов, который носит название **нуклеоид**, или нуклеоплазма. Нуклеоид прокариотов можно отнести к ядерным структурам, поскольку он содержит геном бактериальной клетки.

Нуклеоиды бактерий можно выделить, их состав и структура изучены довольно подробно. Они на 90% состоят из ДНК, а 10% приходится на различные белки и РНК. Количество ДНК в прокариотических клетках значительно меньше (в 100-10000 раз), чем в клетках эукариотов.

Методом автордиографии меченых молекул ДНК с помощью светового микроскопа было показано, что бактериальные ДНК представляют собой кольцевые замкнутые молекулы. У *E. coli* периметр такого кольца составляет около 1,5 мм. Поскольку в двухцепочной ДНК содержится 10 пар оснований на каждые $3,4 \cdot 10^{-3}$ мкм ее длины, то ДНК, или геном *E. coli*, состоит из $4,7 \cdot 10^6$ нуклеотидных пар (н. п.). На одну клетку *E. coli* приходится одна гигантская циклическая молекула ДНК — одна бактериальная хромосома. Самая маленькая бактериальная хромосома обнаружена в клетках микоплазмы — 0,25 мм; для сравнения, длина ДНК на одну хромосому эукариотической дрожжевой клетки составляет около 4,6 мм, а у человека — 40 мм (!).

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

С помощью автордиографической методики было также обнаружено, что при репликации кольцевой хромосомы у *E. coli* образуются две репликационные вилки, которые по мере синтеза ДНК движутся вдоль молекулы до терминальной, конечной точки (рис. 1). Таким образом, здесь вся гигантская молекула ДНК представляет собой единицу репликации, или репликон. Скорость репликации у бактерий составляет около 30 мкм в минуту, что согласуется с временем удвоения клеток, равным приблизительно 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 суперспирализованных петель ДНК, отходящих от плотной центральной области (рис. 2). В одну петлю входит до 10—13 мкм ДНК, а всего таких петель около 120.

Гигантская кольцевая молекула — хромосома — с помощью РНК и белков многократно складывается, образуя многочисленные петли, ДНК которых подвергается сверхспирализации. Это приводит к значительной компактизации всего комплекса, который и представляет собой нуклеоид. Необходимо подчеркнуть, что большая часть ДНК

нуклеоида не связана со специальными белками типа гистонов эукариотов, хотя небольшое число гистоноподобных белков обнаружено.

Одна из моделей организации нуклеоида предполагает, что центральная его часть представлена неактивной и сверхспирализованной ДНК, тогда как по периферии расположены деспирализованные петли, на которых синтезируются различные РНК.

Отличительной чертой ядерных структур прокариотов является то, что у них РНК и белок могут синтезироваться одновременно: рибосомы связываются с еще не до конца синтезированными молекулами иРНК и на них осуществляют синтез белка. Таким образом, возникает тройственный синтетический комплекс: ДНК — синтезирующаяся цепь иРНК — рибосомы с синтезируемой полипептидной цепочкой (рис. 3).

Такая ситуация возможна лишь в том случае, когда образующаяся молекула иРНК не подвергается дальнейшей модификации типа процессинга, характерного для эукариотических клеток. У прокариотов, таким образом, процессы транскрипции и трансляции не разобщены территориально, в то время как у эукариотических клеток они протекают в двух разных компартментах, разделенных специальной ядерной оболочкой.

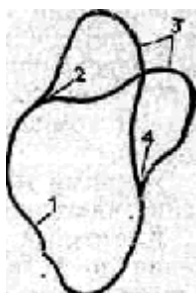


Рис. 1. Репликация хромосомы *E. coli*.

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

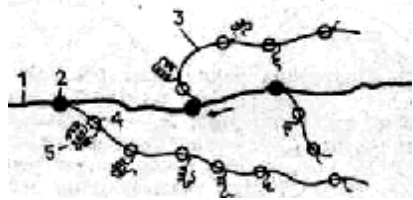


Рис. 3. Одновременная транскрипция иРНК и синтеза белка на участке бактериального нуклеоида. 1 — ДНК; 2 — РНК-полимераза; 3 — мРНК; 4 — рибосома; 5 — полипептид

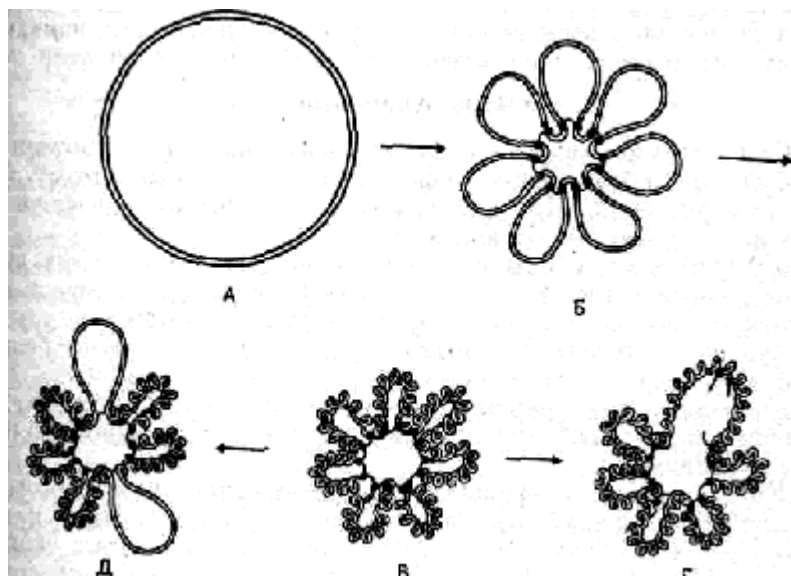


Рис. 2. Модель конденсации бактериальной хромосомы. А — кольцевая хромосома; Б — белковые сшивки образуют петлевые домены; В — сверхспирализация доменов; Г и Д — различные формы деконденсации нуклеоида

Клеточный цикл — это время существования клетки от деления до деления. Деление всех типов клеток происходит только после удвоения ДНК. У бактерий сам процесс разделения тела клетки (цитотомия) часто не связан с окончанием синтеза ДНК, так как 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, находящаяся на промежуточных стадиях ее дальнейшего удвоения (рис. 4), т. е. каждая дочерняя клетка сразу после деления уже содержит частично реплицированный геном.

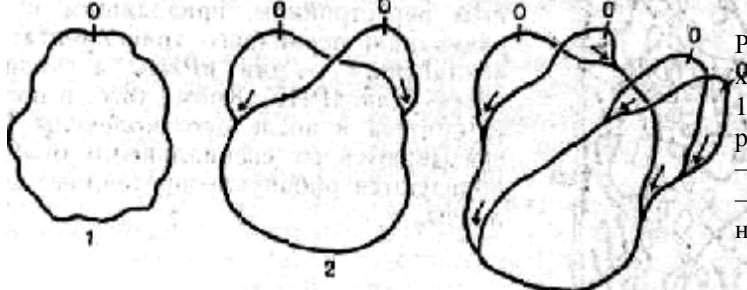


Рис. 4. Повторная репликация бактериальной хромосомы при интенсивном размножении клеток.

1 — исходная хромосома; 2 — частично реплицированная хромосома (I раунд репликации); 3 — инициация синтеза ДНК во II раунд репликации 0 — точки начала репликации (*ori*). Стрелки указывают на репликационные вилки

При делении бактериальных клеток не происходит конденсации ДНК в составе нуклеоида. По мере роста клетки в длину зона нуклеоида также удлиняется, а затем делится как бы с помощью перетяжки. Механизм обособления и разъединения двух дочерних хромосом связан с расхождением мест прикрепления хромосом к плазматической мембране.

Ядро эукариотов

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

Клеточное ядро, обычно единственное на клетку (есть примеры многоядерных клеток), состоит из ядерной оболочки, отделяющей его от цитоплазмы, хроматина, ядрышка и других продуктов синтетической активности, а

также ядерного белкового матрикса и кариоплазмы (рис. 5). Эти основные компоненты встречаются практически во всех неделящихся клетках эукариотических одно- или многоклеточных организмов.

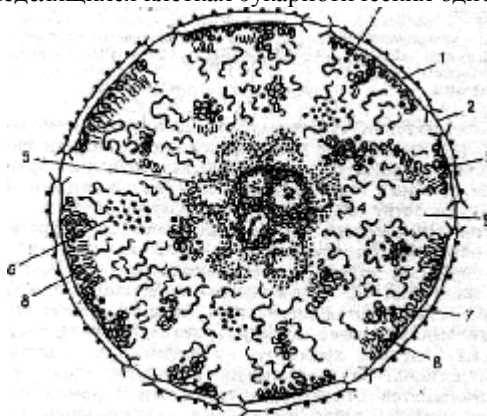


Рис. 5. Схема строения клеточного ядра. 1 — ядерная оболочка (две мембраны, внутренняя и внешняя, и перинуклеарное пространство); 2 — ядерная пора; 3 — конденсированный хроматин; 4 — диффузный хроматин; 5 — ядрышко (гранулярный и фибриллярный компоненты, в центральных светлых зонах находится рРНК.);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

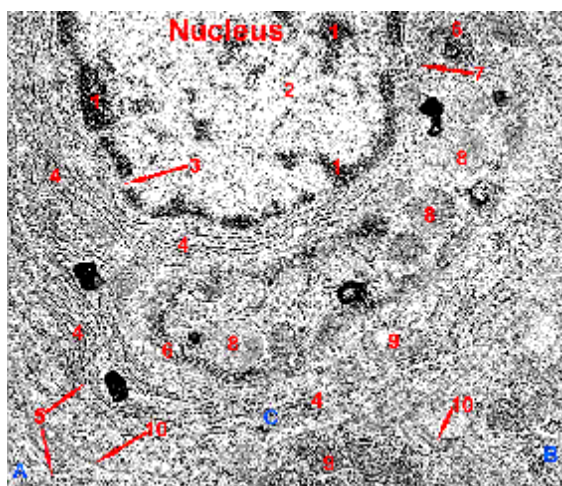


Рис. 6. Электронная фотография клетки. 1 — конденсированный хроматин (гетерохроматин), 2 — деконденсированный хроматин (эухроматин), 3 — ядерная пора

Кроме четкой морфологической выраженности и многокомпонентной организации ядра эукариотов обладают рядом функциональных особенностей, отличающих их от ядерных компонентов прокариотов. Во-первых, наличие ядерной оболочки разобщает транскрипцию, протекающую в ядре, от трансляции белка в цитоплазме. Во-вторых, хромосомный компонент ядра представляет собой сложный комплекс ДНК и целой группы специальных ядерных белков, выполняющих разные функции. В-третьих, ядра эукариотов содержат несколько структурно несвязанных, независимых, хромосом (от двух до нескольких десятков и сотен). В-четвертых, синтезированные молекулы РНК в ядре подвергаются дополнительным перестройкам, приводящим к укорачиванию первичного транскрипта: это «сплайсинг» — для иРНК и «процессинг» — для рРНК. Кроме того, в процессе синтеза и после него молекулы РНК связываются со специальными белками» образуются рибонуклеопротеидные комплексы.

При наблюдении некоторых живых клеток, особенно растительных, или же клеток после фиксации и окраски внутри ядра выявляются зоны плотного вещества, которое хорошо окрашивается разными красителями, особенно основными. Благодаря этому свойству выявленный компонент получил название «**хроматин**» (Флемминг, 1880).

Хроматин интерфазных ядер представляет собой несущие ДНК тельца (хромосомы), которые теряют в это время свою компактную форму, разрыхляются, деконденсируются. Степень деконденсации хромосом в ядрах разных клеток может быть различной. Когда хромосома или ее участок деконденсированы полностью, эти зоны называют **диффузным хроматином**. При неполном разрыхлении хромосом в интерфазном ядре видны участки **конденсированного хроматина** (иногда называемого гетерохроматином).

Степень деконденсации хроматина в интерфазе может отражать функциональную нагрузку этой структуры: чем более диффузен хроматин, тем выше в нем синтетические процессы. Так, в клетках лимфоцитов хроматин образует значительные скопления по периферии клеточного ядра. При стимуляции этих клеток к синтезу ДНК по мере включения предшественников ДНК (H^3 -тимидина) наблюдается постепенная деконденсация хроматина. Таким же образом меняется структура хроматина при синтезе РНК. Падение синтеза 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, то они переходят в диффузное состояние.

Максимальная конденсация хроматина отмечается во время митотического деления клеток, когда он образует плотные тельца — хромосомы. В этот период хромосомы не несут никаких синтетических нагрузок.

Исходя из сказанного, можно считать, что хромосомы клеток могут находиться в двух структурно-функциональных состояниях: в рабочем, частично или полностью деконденсированном, когда в интерфазном ядре при их участии 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.

Хромосомный цикл

Как известно, половые мужские и женские клетки несут одинарный набор хромосом и, следовательно, содержат вдвое 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 количеству ДНК на клетку (*c*) зависит от ее пloidности: клетки с числом хромосом $2n$ содержат $2c$ количества ДНК. При оплодотворении происходит слияние двух клеток, каждая из которых несет $1n$ набор хромосом, поэтому образуется 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 делению клеток предшествует фаза синтеза, редупликации ДНК, что должно приводить к появлению клеток с количеством ДНК $4c$ и числом хромосом $4n$, т. е. вдвое больше, чем у исходной диплоидной клетки. И только после деления такой тетраплоидной ($4c$) клетки снова возникнут две исходные клетки.

В ядрах интерфазных клеток выявить тела хромосом с помощью морфологических методов очень трудно, поскольку они находятся в разрыхленном, деконденсированном состоянии. В интерфазе происходит удвоение, редупликация хромосом. Этот период, называемый синтетическим, или **S-периодом**, характеризуется синтезом ДНК. В это время количество ДНК в интерфазном ядре больше, чем $2c$. После окончания S-периода оно становится равным $4c$, ибо произошло удвоение хромосомного материала. Однако морфологически регистрировать удвоение числа хромосом на этой стадии не всегда удастся. Собственно хромосомы как нитевидные плотные тела начинают обнаруживаться микроскопически в начале митотического деления клетки, а именно в **профазе** (рис. 6). Если попытаться подсчитать число хромосом в профазе, то их количество будет равно $2n$, но это ложное впечатление, потому что в профазе каждая из хромосом двойная за счет 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.

И в профазе, и в следующем периоде деления клетки — в **метафазе** — сестринские хромосомы остаются связанными друг с другом в виде пары. В метафазе хромосомы выстраиваются в экваториальной плоскости клетки и разъединяются. И в профазе и в метафазе клетки остаются тетраплоидными.

В **анафазе** каждая из хромосом данной пары расходится к противоположным полюсам клетки, после чего тело исходной клетки начинает делиться. На следующем этапе — в **телофазе** — разошедшиеся диплоидные ($2n$) наборы хромосом начинают деконденсироваться. 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.

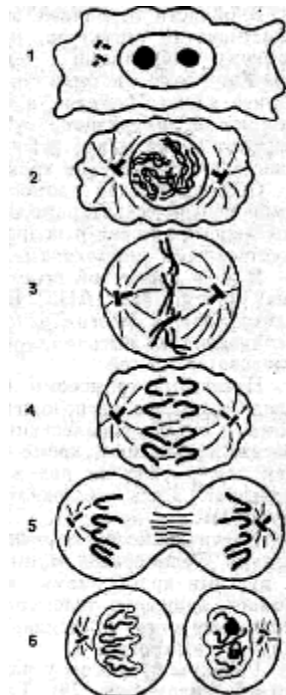


Рис. 6. Схема стадий митотического деления клетки. 1 — интерфаза; 2 — профазе; 3 — метафаза; 4 — анафаза; 5 — ранняя телофаза; 6 — поздняя телофаза, начало реконструкции ядер

Общая морфология митотических хромосом

Морфологию митотических хромосом лучше всего изучать в момент их наибольшей конденсации, т. е. в метафазе и в начале анафазы. Хромосомы животных и растений в этом состоянии представляют собой палочковидные структуры разной длины и довольно постоянной толщины; у большей части хромосом удается легко найти зону **первичной перетяжки** — центромеру, которая делит хромосому на два **плеча** (рис. 7). Хромосомы с равными или почти равными плечами называют **метацентрическими**, с плечами неодинаковой длины — **субметацентрическими**; палочковидные хромосомы с очень коротким, почти незаметным вторым плечом — **акроцентрическими**.

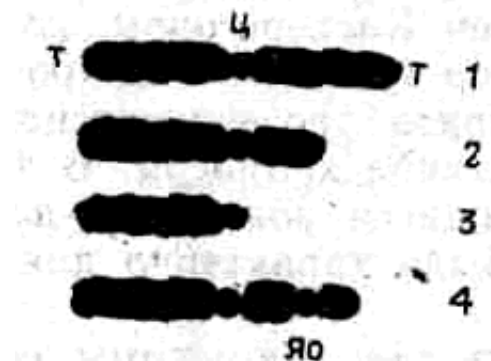


Рис. 7. Схема общей морфологии метацентрических (1); субметацентрических (2); акроцентрических (телоцентрических) (3); спутниковых (ядрышковых) (4). Т — теломеры; Ц — центромеры (первичные перетяжки); ЯО — ядрышковый организатор (вторичная перетяжка)

В области первичной перетяжки расположен **кинетохор** — структура, имеющая форму диска и связанная тонкими фибриллами с телом хромосомы в области перетяжки. Кинетохор в структурном, и функциональном отношении изучен плохо. Известно, в частности, что он является одним из центров полимеризации тубулинов; к нему

от центриолей отрастают пучки микротрубочек митотического веретена, которые участвуют 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.

В зоне первичной перетяжки (как и во всем теле хромосомы) присутствует ДНК. В зоне хромосомы, примыкающей к центромере, у многих видов локализована **сателлитная ДНК**, отличающаяся высоким уровнем повторения 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 них в интерфазе происходит образование ядрышка. Здесь же локализована ДНК, ответственная за синтез рРНК.

Плечи хромосом оканчиваются **теломерами**, конечными участками. Теломерные концы хромосом не способны соединяться с другими хромосомами или их фрагментами, в отличие от концов, лишенных теломерных участков в результате разрывов; последние могут присоединяться к таким же разорванным концам других хромосом.

Размеры хромосом у разных организмов варьируют в широких пределах. Так, длина хромосом может колебаться от 0,2 до 50 мкм. Самые мелкие хромосомы отмечены у некоторых простейших, грибов, водорослей. Очень мелкие хромосомы имеют клетки льна и морского камыша: они настолько малы, что с трудом видны под обычным микроскопом. Наиболее длинные хромосомы обнаружены у некоторых прямокрылых насекомых, у амфибий и у лилейных. Длина хромосом у человека находится в пределах 1,5—10 мкм.

Число хромосом также весьма разнообразно у представителей живого мира, но является характерным для каждого вида животных или растений. У некоторых радиолярий число хромосом достигает 1000—1600. Рекордсменом среди растений по числу хромосом (около 500) является папоротник уховник, 308 хромосом у тутового дерева, у речного рака 196 хромосом. Наименьшее количество хромосом (1 хромосома на гаплоидный набор) наблюдается у одной из рас аскариды, у сложноцветного *Нарциссус gracilis* всего 4 хромосомы (2 пары).

Совокупность числа, величины и морфологии хромосом называется **кариотипом** данного вида (рис. 8). 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 их форме и структуре. Следовательно, структура кариотипа может быть таксономическим (систематическим) признаком, который все чаще используется в систематике животных и растений.

Клеточный цикл

В отличие от клеточного цикла прокариотов эукариотические клетки удваивают число своих хромосом в результате синтеза ДНК задолго до цитотомии, т. е. до разделения исходной клетки на две дочерние. Время протекания клеточного цикла у эукариотов также значительно больше, чем у бактерий. Так, если для бактериальных клеток время от деления до деления клетки составляет 20—30 мин, то у одноклеточных эукариотов, например у инфузории туфельки, клеточный цикл занимает уже 10—20 ч, а время клеточного цикла у амебы — около 1,5 сут. Около суток продолжается клеточный цикл и у многоклеточных организмов.



Рис. 8. Кариотип мужчины. Хромосомы обозначены согласно денверской системе

Клетки различных тканей и органов высших позвоночных имеют неодинаковую способность к делению. Одни из них полностью теряют свойство делиться: это большей частью специализированные, дифференцированные клетки, например клетки центральной нервной системы. В организме есть постоянно обновляющиеся ткани (различные эпителии, кровь, рыхлая и плотная соединительные ткани). В них часть клеток делится постоянно (например, клетки базального слоя покровного эпителия, клетки крипт кишечника, кровяные клетки костного мозга и селезенки), заменяя отработанные или погибающие клеточные типы. Многие клетки, не размножающиеся в обычных условиях, приобретают вновь это свойство при процессах репаративной регенерации органов и тканей.

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

Клетки многоклеточных организмов обладают разной способностью к делению. Если в раннем эмбриогенезе клетки животных организмов делятся часто, то у взрослых особей они большей частью теряют эту способность. У круглых червей и коловраток клетки теряют способность к делению после прохождения эмбрионального развития, и рост организма, например аскариды, происходит не за счет роста числа клеток, а за счет увеличения их размера.

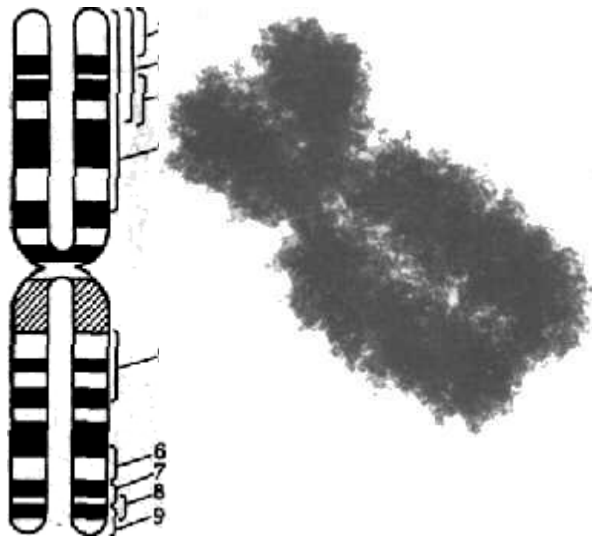


Рис. 9. Генетическая карта хромосомы 1 человека. Отдельные гены локализованы в определенных сегментах хромосомы. 1 — группа крови Сцианна, группа крови Do, фосфопируватгидратаза; 2 — фосфоглюконатдегидрогеназа, эритроцитарная группа крови резус (Rh), аденилаткиназа локус 2; 3 — фосфоглюкомутаза локус 1; 4 — уридин-монофосфаткиназа, эллиптоцитоз I, α -амилаза слюны, α -амилаза панкреатическая, группа крови Даффи и др.; 5 — глукосо-1-фосфатуридилтрансфераза, катаракта; 6 — пептидаза С, 7 — 5S РНК гены; S — фумаратгидратаза; 9 — гуанилаткиназа, место для аденовируса 12, α -фруктозидаза

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 положение было доказано при наблюдении за распределением импульсной метки (например, меченого тритием предшественника ДНК — тимидина) среди размножающихся клеток, взятых через определенные интервалы времени. Через некоторое время после введения метки в образцах встречались как меченые, так и немеченые интерфазные клетки, а также делящиеся клетки, но тоже не содержащие метку. В последних синтез ДНК уже закончился до начала эксперимента. В препаратах, взятых в более поздних стадиях, появлялись меченые делящиеся клетки — это как раз те клетки, которые в момент введения меченого предшественника синтезировали ДНК, были в интерфазе в **синтетическом периоде (S-период)**. Через некоторое время снова появлялись немеченые делящиеся клетки — это те, которые в момент введения меченого предшественника еще не вступили в S-период. Наконец, меченые делящиеся клетки снова появились — это те клетки, которые вступили в деление уже второй раз. Если построить график встречаемости меченых митозов (рис.10), то получится многовершинная кривая: точки между соседними вершинами ограничивают период, соответствующий длительности клеточного цикла, т. е. времени от деления до следующего деления клетки. Время от начала эксперимента до появления первых меченых митозов — это время интерфазы после S-периода, **постсинтетический период**, или, как принято обозначать, **G₂-период**.

Оказалось, что S-периоду предшествует **пресинтетический** или **G₁-период**, — отрезок времени до начала синтеза ДНК. Таким образом, весь клеточный цикл состоит как бы из четырех отрезков времени: собственно митоза (M), пресинтетического (G₁), синтетического (S) и постсинтетического (G₂) периодов: $T = G_1 + S + G_2 + M$.

Как было найдено, общая продолжительность как всего клеточного цикла, так и отдельных его отрезков (периодов) значительно варьирует не только у разных организмов, но и у клеток разных органов одного организма. Но для клеток одного органа эти величины относительно постоянны (табл. 1).

Различные периоды клеточного цикла отличаются друг от друга по общему содержанию в клетках белка, ДНК и РНК и по уровню (интенсивности) их синтеза.

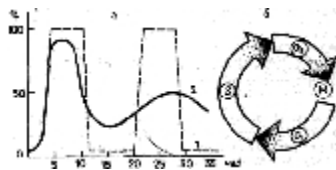


Рис. 10. Изменение количества меченых митозов в разное время после однократного введения ³H-тимидина.

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

Таблица 1. Длительность митотического цикла и его периодов (в часах)

Вид	Митотический цикл	Митоз	G ₁	S	G ₂
Вика посевная (20°C), боковые корни	18,1	1,0	3,7	8,0	5,4
Горох (22°C)	19,3	2,3	6,7	8,0	2,3
Кукуруза, клетки периферии чехлика	22,5	2,2	6,3	6,7	7,3
Мышь, эпителий тонкой кишки	18,75	1,0	9,5	7,5	0,75
эпителии роговицы	72,0	0,75	—	8,50	4,0
L-клетки (опухолевые фибробласты)	20,0	1,0	9-11	6-7	3-4

В G₁-периоде клетки имеют диплоидное содержание ДНК на ядро (2c), в S-периоде содержание ДНК колеблется от 2c до 4c, в G₂-периоде содержание ДНК соответствует тетраплоидному (4c). Следовательно, если мы изучаем

однородную популяцию клеток, то простой фотометрией ДНК в интерфазных клетках можно определить, в каком из периодов клеточного цикла находится та или иная клетка (рис. 36).

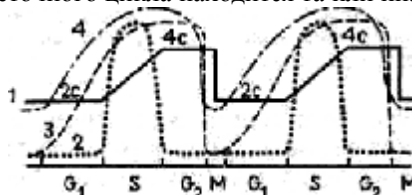


Рис. 36. Диаграмма уровней клеточных синтезов в течение клеточного цикла.

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

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.

Регулярное повторение последовательности клеточных циклов легко можно наблюдать во время прогрессивного роста клеток в культуре ткани. В естественных условиях в растущих тканях растений и животных всегда есть клетки, которые находятся «вне цикла», не переходят регулярно из G_1 - в S -, а затем в G_2 - и потом в M -фазу; такие клетки принято называть клетками G_0 -периода. Именно они представляют собой так называемые покоящиеся, перестающие размножаться клетки. В некоторых тканях клетки могут находиться в G_0 -фазе длительное время не изменяя особенно своих морфологических свойств: они сохраняют в принципе способность к делению, превращаясь в камбиальные, стволовые клетки (например, в цветочной ткани). Чаще потеря способности делиться (хотя бы и временно) сопровождается специализацией, дифференцировкой клеток. Дифференцирующиеся клетки выходят из цикла, но в особых условиях могут снова входить в него. Так, у мышей, например, большинство клеток печени находится в G_0 -периоде. Они не участвуют в синтезе ДНК и не делятся, однако если часть печени удалить, 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 навсегда теряют способность к делению. 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.

Полиплоидия

Количество ДНК, приходящееся на ядро эукариотической клетки, зависит еще от одной характеристики — плоидности, при которой может меняться не только содержание ДНК, но и структура интерфазных ядер.

Полиплоидия — это кратное гаплоидному ($1n$) количеству увеличения ДНК и соответственно хромосом на ядро. Существуют, естественные ряды полиплоидных растений. Полиплоидные особи могут быть получены экспериментально, например путем нарушения процесса деления клеток. При этом после репликации ДНК до уровня $4c$ клетки снова вступают в S -период.

Однако среди почти всех многоклеточных эукариотов есть организмы, у которых часть соматических клеток могут быть полиплоидными. Количество ДНК у них обычно в четное количество раз выше, чем в клетках с диплоидным набором хромосом ($4c$, $8c$, $16c$, $32c$ и т. д.). Одной из характерных черт таких полиплоидных клеток будет прогрессивное падение их способности к митозу. Более того, все они возникают вследствие нарушения именно этого процесса. Поэтому чаще всего соматическая полиплоидия регистрируется не по числу хромосом, а по количеству ДНК в данной клетке.

Так, в меристеме корней конских бобов (*Vicia faba*) встречаются клетки с количеством ДНК $8c$ (октоплоидные), а кукурузы — с $16c$. Известны объекты и с огромным содержанием ДНК: в ядрах клеток-подвесок фасоли количество ДНК в 8192 раза больше, чем в гаплоидном ядре. Соответственно увеличению ДНК увеличивается и объем таких интерфазных ядер. Так, размер полиплоидных ядер в подвесках фасоли достигает 60 мкм.

Те же закономерности встречаются и у беспозвоночных животных. Так, у личинок двукрылых в ядрах гигантских клеток так называемой слюнной железы обнаруживается огромное количество ДНК: например, у *Drosophila melanogaster* — $512c$, у *Chironomus tentante* — $16384c$. В пищеводной железе аскариды их содержится 30 — 260 тыс. c , в нейронах аплизии — 260 тыс. c , в шелкоотделительной железе шелкопряда — 500 тыс. c (!).

Часто полиплоидные клетки встречаются и у позвоночных животных, особенно у млекопитающих. Так, в ядрах клеток печени мышей количество ДНК может достигать 4 — $32c$, в ядрах миокардиоцитов — $8c$, мегакариоцитов — 8 — $64c$, трофобластов плаценты крысы — $4096c$ (!).

Полиплоидные клетки возникают также в результате нарушений процесса митоза. Один из путей соматической полиплоидии — выпадение конечных фаз митоза при так называемом полиплоидирующем митозе. При этом, когда клетки с тетраплоидным количеством ДНК вступают в митоз, их хромосомы расходятся на две группы, но деления тела клетки не происходит. Каждая группа хромосом одевается ядерной оболочкой, и в клетке возникают два диплоидных интерфазных ядра ($2n52$). Сама же клетка по определению остается тетраплоидной. Через некоторое время она вступает в S -период, в результате чего в ней будут содержаться уже два тетраплоидных ядра ($4n52$), и клетка станет октоплоидной. После этого клетка снова вступает в митоз, ее хромосомные наборы объединяются, и она делится полностью на две дочерние, каждая из которых становится одноядерной тетраплоидной ($4c$ ДНК). Эти события могут многократно повторяться, что в ряде случаев приводит к появлению клеток, где количество ДНК возрастает до $64c$, как у мегакариоцитов. Эти клетки имеют огромные многолопастные ядра.

Так, в частности, возникают полиплоидные клетки печени, кардиомиоцитов, эпителия мочевого пузыря и др.

Другими словами, при полиплоидирующем митозе происходит несколько раундов репликации ДНК с выпадением нескольких раундов цитотомии, что приводит к прогрессивному увеличению количества ДНК на ядро.

Второй способ полиплоидизации клеток связан с полным выпадением митоза при следующих друг за другом раундах репликации ДНК. В этом случае цикличность событий можно представить себе так: GПСПГПСПГПСП и т. д. При этом последовательно нарастает количество ДНК: 2с—4с—8с—16с— и т. д. Так возникают гигантские ядра трофобластов плаценты (4096с, что соответствует 10 циклам редупликации), гигантские ядра слюнных желез двукрылых (16384с — 12 циклов репликации), огромные ядра клеток шелкоотделительной железы шелкопряда (около 500000с, что соответствует результату 18— 20 циклов репликации). Такой тип полиплоидизации получил название процесса **политении** — многократности. Впервые он был описан и подробно исследован на слюнных железах двукрылых.

Полиплоидия — явление широко распространенное. У млекопитающих, в частности, очень велико число полиплоидных (одно или двухъядерных) кардиомиоцитов (60—80%). Биологический смысл соматической полиплоидии, видимо, заключается в повышении функциональной мощности клеток при увеличении общего числа генов, в том числе и генов тканеспецифических функций. Так, в полиплоидных клетках соответственно увеличению ДНК возрастает транскрипционная активность, увеличен, по сравнению с диплоидными клетками, синтез белка.

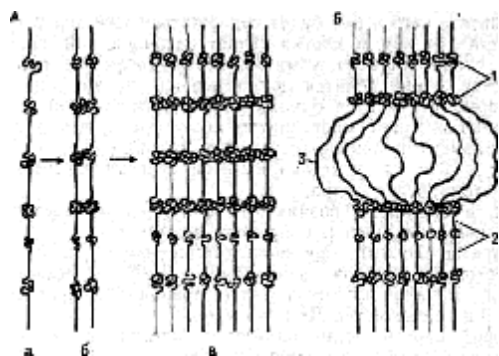


Рис. 38. Схема образования политенной хромосомы (А). а — нить интерфазной хромосомы с участками конденсированного хроматина; б — две нити после редупликации; в — 8 сближенных нитей в результате трехкратной редупликации хромосом. Б — строение участков политенной хромосомы. 1 — диски; 2 — междисковые участки; 3 — пuffed, образовавшийся за счет деконденсации хроматина диска

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 индивидуальность, переходя 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.

Каково пространственное расположение отдельных 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 принадлежит 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 их расположение было показано при изучении пространственной локализации политенных хромосом. С помощью послыльных 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. Было обнаружено, что действительно в объеме ядер хромосомы располагаются, повторяя ана-телофазную ориентацию (так называемую «ориентацию по Раблю»). На ядерной оболочке фиксированы теломерные участки всех хромосом. На противоположном полюсе ядра также в связи с ядерной оболочкой располагаются центромерные районы хромосом, часто объединенные в один хромоцентр — крупный блок интерфазного хроматина (Рис.44).

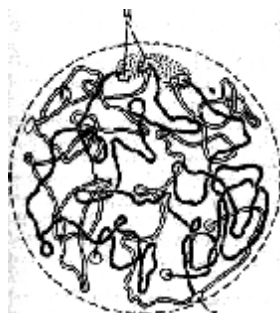


Рис. 44. Трехмерная реконструкция топографии политенных хромосом в ядре слюнной железы дрозофилы. 7 — теломеры хромосом; Ц — центромеры

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, — это метаболически активное состояние, связанное с синтезом ДНК и РНК.

Эухроматин и гетерохроматин

Еще в начале 30-х годов было замечено (Э. Гейтц), что в интерфазных ядрах существуют постоянные участки конденсированного хроматина. Его наличие 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 (хромоцентров). Первоначально понятие гетерохроматина имело сугубо морфологическое значение, потому что при изучении препаратов окрашенных ядер, конечно, нельзя знать, может ли данный участок конденсированного хроматина — хромоцентр — перейти в будущем в разрыхленное, эухроматическое состояние. 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. Об этом их свойстве упоминалось выше. Кроме них постоянно конденсированными могут быть некоторые участки в составе 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**.

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 позже всего остального хроматина, в его состав входит особая (сателлитная) ДНК, обогащенная часто повторяющимися (высокоповторяющимися) последовательностями нуклеотидов. Он локализован в центромерных, теломерных и интеркалярных зонах митотических хромосом. Доля конститутивного хроматина может быть неодинаковой у разных объектов. Так, у млекопитающих на его долю приходится 10—15% всего генома, а 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.

Степень компактизации всей остальной, основной массы хроматина ядра может меняться в зависимости от функциональной активности. Эта масса относится к эухроматину. Эухроматические неактивные участки, которые находятся в конденсированном состоянии, стали называть **факультативным гетерохроматином**, подчеркивая необязательность такого его состояния. В таблице 2 даны сравнительные общие характеристики эухроматических и гетерохроматических районов интерфазных хромосом.

Таблица 2. Эухроматин и гетерохроматин.

Свойства	Эухроматин		Гетерохроматин
	активный	неактивный (факультативный гетерохроматин)	Гетерохроматин конститутивный
Структура	диффузный	конденсированный	конденсированный
Синтез РНК	+	—	—
Синтез ДНК	+	+	+
Тип нуклеотидных последовательностей ДНК	уникальные, умеренные повторы	уникальные, умеренные повторы	высокоповторяющаяся, сателлитная ДНК
Локализация	плечи хромосом	плечи хромосом	центромера, теломера, интеркалярный гетерохроматин

Занятие 4. Структура хроматина.

Фракции хроматина, полученные из разных объектов, обладают довольно однообразным набором компонентов. По суммарному химическому составу хроматин из интерфазных ядер мало отличается от хроматина из митотических хромосом. Главными компонентами хроматина являются ДНК и белки. Среди белков хроматина основную массу составляют гистоны (табл. 1).

Таблица 1. Химический состав хроматина. Содержание белков и РНК дано по отношению к ДНК

Источник хроматина	ДНК	Гистоны	Негистоны	РНК
Стебель зародыша гороха	1,0	1,03	0,29	0,26
Печень крысы	1,0	1,16	0,67	0,043
Клетка HeLa (опухоль человека)	1,0	1,02	0,71	0,09
Тимус телят	1,0	1,14	0,33	0,007
Эритроциты курицы	1,0	1,08	0,54	0,02

В среднем в хроматине около 40% массы 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. В состав хроматиновой фракции входят также мембранные компоненты, РНК, углеводы, липиды, гликопротеиды.

В структурном отношении хроматин представляет собой нитчатые комплексные молекулы дезоксирибонуклеопротеида (ДНП- комплекс ДНК и белков), которые состоят из ДНК, ассоциированной с гистонами. Именно за счет ассоциации гистонов с ДНК образуются очень лабильные, изменчивые нуклеиново- гистоновые комплексы, где отношение ДНК: гистон равно примерно единице, т. е. оба компонента присутствуют в равных количествах (по массе). Нитчатые фибриллы (образованные комплексом ДНК и гистонов) и есть элементарные хромосомные, или хроматиновые, нити, толщина которых в зависимости от плотности упаковки ДНК может колебаться от 10 до 30 нм. Фибриллы ДНП могут в свою очередь дополнительно уплотняться (компактизоваться) с образованием более высоких уровней структуризации ДНП, вплоть до митотической хромосомы. Роль некоторых негистоновых белков заключается именно в образовании высоких уровней компактизации хроматина.

ДНК хроматина

В препарате хроматина на долю ДНК приходится обычно 30—40%. Это двухцепочечная спиральная молекула, подобная чистой, выделенной ДНК в водных растворах.

Длина индивидуальных линейных (в отличие от прокариотических хромосом) молекул ДНК может достигать сотен микрометров и даже нескольких сантиметров. Результаты исследований показали, что расчетная длина ДНК на хромосому близко совпадает с цифрами, полученными автордиографическим методом.

Общее количество ДНК, входящее в ядерные структуры клеток, в геном организмов, колеблется от вида к виду. Как правило, у микроорганизмов количество ДНК на клетку значительно ниже, чем у позвоночных и высших растений (табл. 2). У мыши на ядро приходится почти в 600 раз больше ДНК, чем у кишечной палочки. Сравнивая количество ДНК на клетку у эукариотических организмов, 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 и окунь (1,4—1,9 пг) или, например, рыба голец и бык (6,4 и 7 пг). Значительны колебания количества ДНК в больших таксономических группах.

Таблица 2. Содержание ДНК в клетках некоторых объектов (пг, 10⁻¹² г)

Объект	Количество ДНК
Бактериофаги	
на частицу	
T7	0,000007
T4	0,000027
Бактерии	
на клетку	
кишечная палочка	0,009
Грибы	
на гаплоидную клетку	
дрожжи	0,027
неирозпора	0,017
Высшие растения	
на диплоидную клетку	
лен	1,4
кукуруза	15,4
лилия	134,2
Беспозвоночные животные	
дрозофила	0,2
сверчок домашний	12,0
Рыбы	
осетр	3,2
протоптерус	100,0
Амфибия	
тритон обыкновенный	73,0
амфиума	108,0
Пресмыкающиеся	
черепаха зеленая	5,0
Птицы	
курица	2,3
Млекопитающие	
мышь	5,0
человек	6,0

ДНК эукариотов делят на три фракции: 1) с 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 и 3) с уникальными последовательностями. 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.

Сателлитная ДНК, или фракция ДНК с часто повторяющимися последовательностями, не участвует в синтезе основных типов РНК в клетке, не связана с процессом синтеза белка. У *S. cerevisiae* центромерная ДНК состоит из повторяющихся участков по 220 н. п. Центромерная ДНК человека (альфонидная сателлитная ДНК) состоит из тандема мономеров по 470 н. п., организованных в группы димеров или пентамеров, которые в свою очередь образуют большие последовательности. С этой специфической центромерной ДНК связываются особые центромерные белки, участвующие в образовании кинетохора — структуры, обеспечивающей связь хромосом с микротрубочками веретена, и в движении хромосом в анафазе.

ДНК с часто повторяющимися последовательностями обнаружена также в теломерных участках хромосом многих эукариотических организмов (от дрожжей до человека). Здесь чаще всего встречаются повторы, в которые входят 3 — 4 гуаниловых нуклеотида (G). У человека теломеры содержат 250—1500 повторов —TTAGGG—. Эти участки ДНК выполняют особую роль — они ограничивают хромосому с концов и предотвращают ее укорачивание в процессе многократной репликации.

Часто повторяющиеся последовательности ДНК интерфазных хромосом связываются специфически с белками — ламинами, подстилающими ядерную оболочку, и участвуют в закоривании растянутых деконденсированных интерфазных хромосом, тем самым, определяя порядок локализации хромосом в объеме интерфазного ядра.

Фракция **умеренно повторяющихся** (от 10^2 до 10^3 раз) **последовательностей** принадлежит к пестрому классу участков ДНК, играющих важную роль в обменных процессах. В нее входят гены **рибосомных ДНК**, которые могут быть повторены у разных видов от 100 до 1000 раз. В эту же фракцию входят многократно повторенные участки для синтеза всех **тРНК**. Более того, некоторые структурные гены, ответственные за синтез определенных белков, также могут быть многократно повторены. Это 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. Это акцепторные и регуляторные участки разных генов.

Итак, ДНК эукариотических клеток гетерогенна по составу. Она 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 и фракция уникальных последовательностей, несущая информацию для большинства белков клетки.

Отсюда становятся понятными различия в количестве ДНК, которые наблюдаются у разных организмов. Эти различия связаны с неодинаковой долей тех или иных классов ДНК в геноме организмов. Так, например, у амфибии *Ampyluma* (ДНК которой более чем в 20 раз превышает длину ДНК 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 отражает фракция уникальных последовательностей.

Молекулы ДНК отличаются не только разной последовательностью нуклеотидов, но и спецификой их синтетической активности.

Репликация ДНК эукариотов

Бактериальная хромосома реплицируется как одна структурная единица, имеющая одну стартовую точку репликации и одну точку терминирования. 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 электронно-микроскопическом изучении вирусных и бактериальных реплицирующихся хромосом.

У эукариотических клеток организация репликации иного характера — **полирепликационная**.

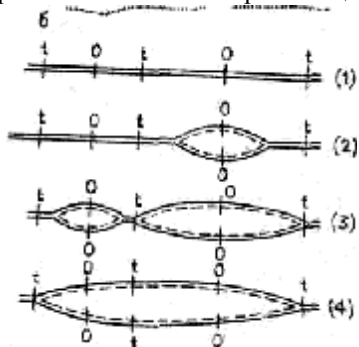


Рис. 1. Репликация эукариотической ДНК. Схема репликации: четыре диаграммы представляют последовательные стадии двух смежных единиц репликации (репликонов); сплошные линии указывают исходные, пунктирные — новосинтезированные цепи молекулы ДНК. O — начало репликации; t — конец репликации; 1 — перед началом репликации; 2—репликация началась в правом репликационе; 3 — репликация началась в левом репликационе; 4 — репликация закончилась в обоих репликационах

Скорость движения репликационной вилки оказалась равной 1—3 тыс. нуклеотидов (н.п.) в минуту у млекопитающих и около 1 тыс. н. п. в минуту у некоторых растений, что намного ниже скорости репликации ДНК у бактерий (50 тыс. н.п./мин). В этих же экспериментах была прямо доказана полирепликационная структура ДНК хромосом эукариотов: по длине хромосомной ДНК, вдоль нее, располагается множество независимых участков репликации — репликонов. По 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 100 тыс. н. п. Следовательно, в гаплоидном наборе млекопитающих должно быть 20000—30000 репликонов. У низших эукариотов величина репликонов меньше, около 40 тыс. н. п. Так, у дрозофилы на геном приходится 3500 репликонов, а у дрожжей — 500. Как говорилось, синтез ДНК в репликоне идет в двух противоположных направлениях.

Реплицирующиеся концы, или вилки, в репликоне прекратят 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 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 эукариотов. Так, бактериальная монорепликонная хромосома длиной в 1500 мкм синтезируется примерно 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 часа. 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. Длительность процесса репликации отдельных хромосом прямо не зависит от их размеров.

Таким образом, синтез ДНК в геноме эукариотов 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.

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 реализации 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 среднем на интерфазное ядро млекопитающих приходится около 2м ДНК, которая локализуется в сферическом ядре со средним диаметром около 10 мкм. Это значит, что такая огромная масса ДНК должна быть уложена с коэффициентом упаковки, равным $1 \cdot 10^4$ — $1 \cdot 10^5$. При этом в ядре должен сохраниться определенный порядок расположения частично или полностью деконденсированных хромосом. 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 регулировании функциональных нагрузок принадлежит ядерным белкам.

Как уже говорилось, 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. Гистоны связаны с ДНК в виде молекулярного комплекса, в виде субъединиц, или нуклеосом.

Гистоны — относительно небольшие по молекулярной массе белки. Практически у всех эукариотов они обладают сходными свойствами, обнаруживаются одни и те же классы гистонов: H1, H2A, H2B, H3, H4.

Гистоны синтезируются в цитоплазме, транспортируются в ядро и связываются с ДНК во время ее репликации — в S-периоде, т. е. синтеза 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.

Гистоноподобные белки были обнаружены в составе вирусов, бактерий, митохондрий. Так, например, у *E. coli* в клетке и в большом количестве обнаруживаются белки, по аминокислотному составу напоминающие гистоны H2B и H2A.

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. 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 10000. Оказалось, что в процессе компактизации ДНК существует несколько уровней, первые из которых прямо определяются взаимодействием гистонов с ДНК.

Первый уровень компактизации ДНК. Структурная роль нуклеосом

В ранних биохимических и электронно-микроскопических работах было показано, что препараты ДНП содержат нитчатые структуры с диаметром от 5 до 50 нм. На, ультратонких срезах интерфазных ядер и митотических хромосом после фиксации глутаровым альдегидом обнаруживались хроматиновые фибриллы толщиной 25—30 нм.

Крупным событием в изучении хроматина было открытие двумя разными способами **нуклеосом** — дискретных частиц хроматина. Так, при осаждении на подложку для электронной микроскопии препаратов хроматина в щелочных условиях при низкой ионной силе можно было видеть, что нити хроматина напоминали «бусы на нитке»: небольшие, около 10 нм, глобулы, связанные друг с другом отрезками ДНК длиной около 20 нм (рис. 2).

ДНК, полученная из хроматина, обработанного нуклеазой (ферментом, разрезающим ДНК), состояла из серии отрезков, кратных 200 парам оснований; встречались отрезки в 200, 400, 600, 800 и больше нуклеотидных пар (н. п.).

Это говорит о том, что нуклеазной атаке в составе хроматина подвергаются участки ДНК, расположенные примерно через каждые 200 н. п. После такой нуклеазной обработки из хроматина путем центрифугирования удается выделить фракцию частиц со скоростью седиментации 11S, получивших название **нуклеосом**. Нуклеосома устроена следующим образом: **октамер** гистонов (см. Рис. 3) образует белковую основу-сердцевину (по англ. «core», часто в нашей литературе этот термин используется без перевода: кор, коровая частица), по поверхности которой располагается ДНК величиной в 146 н. п., образующая 1,75 оборота. Остальные 54 н. п. ДНК образуют участок, с белками сердцевинки не связанный, — **линкер**, который, соединяя две соседние нуклеосомы, переходит в ДНК следующей нуклеосомы. Гистон H1 связывается частично с основой (сердцевинкой) и с участком линкера (около 30 н.п.). Следовательно, полная нуклеосома содержит около 200 н.п. ДНК (146 — сердцевина, 30 н. п. — участок линкера в комплексе с гистонами H1, 30 н. п. — свободная ДНК), октамер сердцевинных (коровых) гистонов и одну молекулу гистона H1. Молекулярная масса полной нуклеосомы — 262000 дальтон. Рассчитано, что на весь гаплоидный геном человека ($3 \cdot 10^9$ пар оснований) приходится $1,5 \cdot 10^7$ нуклеосом (Рис. 3).

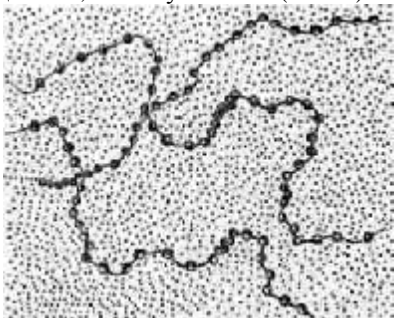


Рис. 2. Нуклеосомы в виде «бусин на нити»

Сердцевина, или коровая частица (или минимальная нуклеосома), очень консервативна по своей структуре: она всегда содержит 146 н.п. ДНК и октамер гистонов. Линкерный участок может варьировать от 8 до 114 н.п. на нуклеосому. На Рис. 4 представлена схема расположения гистонов в сердцевинной части нуклеосомы.

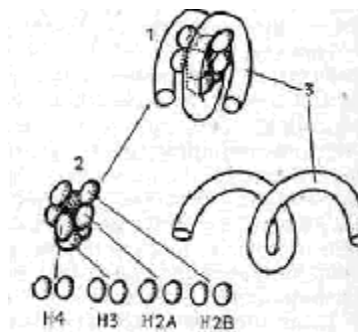


Рис. 3. Схема строения нуклеосомной частицы (1): в состав ее входят четыре пары гистонов в октамере (2) и фрагмент ДНК длиной 146 пар оснований (3)

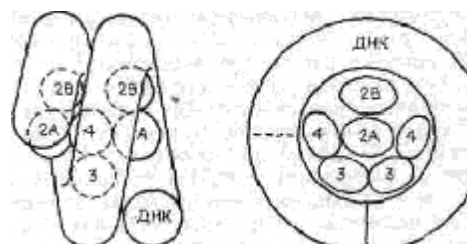


Рис. 4. Схема расположения гистонов в нуклеосоме

Второй уровень компактизации—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 электронно-микроскопических исследованиях было показано, что как в митотических хромосомах, так и в интерфазных ядрах выявляются фибриллы хроматина с диаметром 25—30 нм (Рис. 5).

Относительно характера упаковки нуклеосом в составе фибриллы хроматина диаметром 25 нм существуют, по крайней мере, две точки зрения. Одна из них защищает так называемый соленоидный тип укладки нуклеосом. Согласно этой модели, нить плотно упакованных нуклеосом диаметром 10 нм образует в свою очередь витки с шагом спирали около 10 нм. На один виток такой суперспирали приходится 6—7 нуклеосом (Рис. 5). 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.

Гистон H1 обеспечивает взаимодействие между соседними нуклеосомами, не только сближая и связывая их друг с другом, но и способствуя образованию кооперативной связи между нуклеосомами, благодаря чему возникает довольно плотная спираль из фибриллы диаметром 10 нм. При удалении, даже частичном, гистона H1 фибрилла 25 нм переходит в фибриллу 10 нм, а при полном удалении его последняя разворачивается в структуру типа «бусин на нити». Такой спиральный, или соленоидный, тип упаковки ДНК приводит к ее компактизации: плотность упаковки становится равной приблизительно 40 (т. е. на каждый 1 мкм нити приходится 40 мкм ДНК).

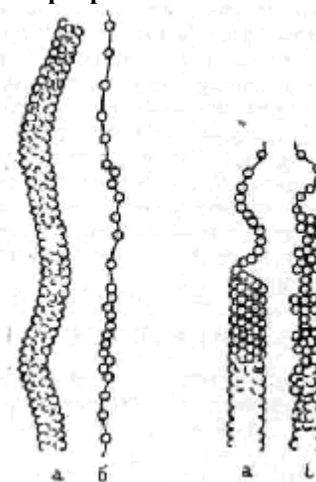


Рис. 5. Слева: фибрилла 30-нм хроматина (а) и нуклеосомная нить ДНП (б). Справа: схема строения фибриллы 30-нм хроматина: а — соленоидный тип; б — нуклеомерный тип укладки нуклеосомной фибриллы.

Если же исследовать хроматин в составе ядер или в виде выделенных препаратов, но при поддержании определенной концентрации магния (не ниже 1 мМ), то можно видеть дискретность в составе 25-нм фибриллы хроматина: она состоит как бы из сближенных глобул того же размера — **нуклеомеров**. В зарубежной литературе такие 25-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 Н1. Негистоновые белки в конформационных превращениях нуклеомеров не участвуют.

Таким образом, основная фибрилла хроматина диаметром 25 нм представляет собой линейное чередование нуклеомеров вдоль компактизованной молекулы ДНК (см. Рис. 5).

Противоречие между соленоидной и нуклеомерной моделями 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.

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 характером укладки 25-нм фибрилл в новые компактизационные уровни, где ведущую роль играют негистоновые белки.

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, отличающаяся друг от друга как по общим свойствам, так и по функциональной значимости. Во фракцию негистоновых белков входит около 450 индивидуальных белков с различным молекулярным весом (5—200 тыс.).

Петлевые домены ДНК—третий уровень структурной организации хроматина

Сорокакратного уплотнения ДНК, которое достигается при сверхспиральном характере ее компактизации, совершенно недостаточно для получения реального ($1 \cdot 10^4$) уровня уплотнения ДНК. Следовательно, должны существовать более высокие уровни компактизации ДНК, которые, в конечном счете, определяют размеры и общие характеристики хромосом. Такие высшие уровни организации хроматина были обнаружены при искусственной его деконденсации, когда выяснилось, что поддержание их связано с негистоновыми белками. В этом случае специфические белки связываются с особыми участками ДНК, которая в местах связывания образует большие петли, или домены. Таким образом, более высокие уровни компактизации ДНК связаны не с ее дополнительной спирализацией, а с образованием поперечной петлевой структуры, идущей вдоль интерфазной или митотической хромосомы (Рис. 6, 7, 8).

Розетки фибрилл хроматина—**хромомеры** — можно видеть в ядрах самых разнообразных объектов, животных, растений, простейших. Средний размер таких петлевых розеток достигает 100—150 нм. Размер отдельной петли совпадает с размером средних репликонов и может соответствовать одному или нескольким генам. На хромосому в среднем приходится более 2000 таких петлевых доменов ДНК. В своих основаниях петли ДНК связаны негистоновыми белками ядерного матрикса, в состав которых могут входить ферменты как репликации ДНК, так и транскрипции. Такая петельнодоменная структура хроматина обеспечивает не только структурную компактизацию хроматина, но и организует функциональные единицы хромосом — репликоны и транскрибируемые гены. Комплекс белков, участвующий в такой структурно-функциональной организации хроматина, относится к негистоновым белкам ядерного матрикса.

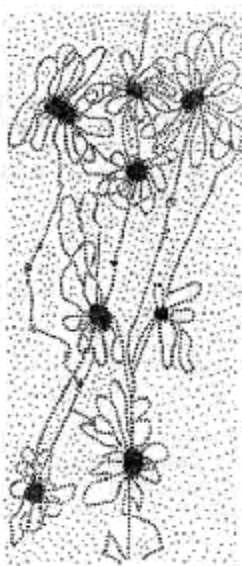


Рис. 7. Хромомеры, выделенные из макронуклеуса инфузории *Bursaria*.

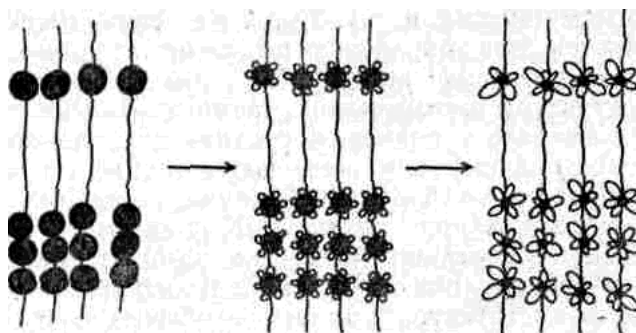


Рис. 6. Хромомеры в дисках политенных хромосом при их искусственной деконденсации

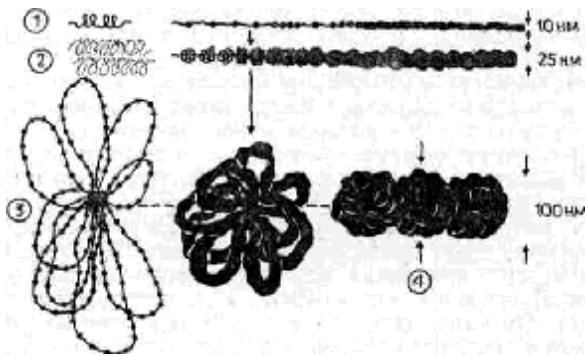


Рис. 8. Схема начальных уровней компактизации хроматина. 1 - нуклеосомный; 2 — нуклеомерный (30-нм фибрилла ДНП); 3 — хромомерный (петлевой домен); 4 — хромономерный

ЯДЕРНЫЙ БЕЛКОВЫЙ МАТРИКС.

Общий состав ядерного 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 и 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. Химический состав ядерного матрикса сходен у различных объектов (табл. 7).

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

Ядерный матрикс состоит, по крайней мере, из трех морфологических компонентов: периферического белкового сетчатого (фиброзного) слоя — ламины (nuclear lamina, fibrous lamina, zonula nucleum limitans), внутреннего, или интерхроматинового, матрикса и «остаточного» ядрышка.

Ламина представляет собой тонкий фиброзный (нитчатый) слой, подстилающий внутреннюю мембрану ядерной оболочки. Структурная роль ламины очень велика: она образует сплошной белковый слой по периферии ядра, достаточный для поддержания морфологической целостности ядра.

Внутриядерный матрикс представлен рыхлой фиброзной сетью, располагающейся между участками хроматина. Часто в состав этой губчатой сети входят различные гранулы рибонуклеопротеидной природы.

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

Как видно из табл. 7, основной компонент остаточных структур ядра — белок, содержание которого может колебаться от 98 до 88%. Белковый состав ядерного матрикса из разных клеток довольно близок. Для него характерны три белка фиброзного слоя, называемые **ламинами**. Кроме этих основных полипептидов в матриксе присутствует большое количество минорных компонентов с молекулярным весом от 11—13 до 200 тыс.

УЛЬТРАСТРУКТУРА МИТОТИЧЕСКИХ ХРОМОСОМ

Одним из промежуточных уровней компактизации хроматина может быть **хромомерный уровень**. Хромомеры хорошо выявляются в интерфазных политенных хромосомах, в мейотических хромосомах. Они видны в электронном микроскопе при искусственной деконденсации хроматина, ядра и митотических хромосом (см. Рис. 6, 7). В их строении выявляется петельно-доменный принцип третьего уровня компактизации хромосом.

При изучении ультраструктурных основ строения митотических хромосом необходимо учитывать **хромономерный уровень** компактизации хроматина. Хромономеру — нитчатую хроматиновую структуру со средней толщиной 0,1—0,2 мкм — удается проследить в естественных условиях на разных стадиях начальной конденсации хромосом в профазе митоза и при деконденсации хромосом в телофазе. Такие хромомеры выявляются в клетках как растений, так и животных.

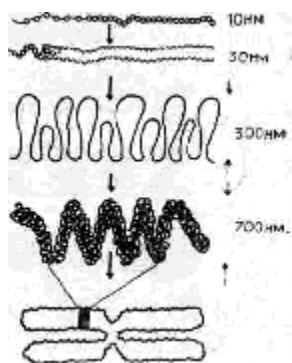


Рис. 9. Схема уровней организации хроматина

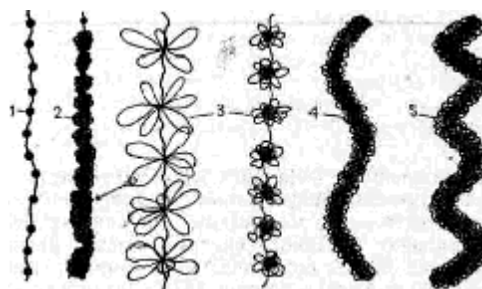


Рис. 10. Схема различных уровней компактизации хроматина. 1 — нуклеосома; 2 — нуклеомер, «сверхбусина»; 3 — хромомер, петлевой домен; 4 — хромономер; 5 — хроматида

Итак, по нашим представлениям, можно оценить некоторые этапы компактизации ДНК, которые приводят в конце концов к построению плотного тела митотической хромосомы (Рис. 9, 10).

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. Четвертый уровень — **хромонемный**: сближенные в линейном порядке хромомеры образуют толстые (0,1—0,2 мкм) хромосомные нити, 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 петлистых структур.

Занятие 5. Ядрышко. Синтез рРНК и мРНК.

Внутри интерфазных ядер как при витальных наблюдениях, так и на фиксированных и окрашенных препаратах видны мелкие, обычно шаровидные тельца — ядрышки. Впервые ядрышки были описаны Фонтана в 1774 г. В живых клетках они выделяются на фоне диффузной организации хроматина тем, что обладают свойством высокого светопреломления. Последнее свойство связано с тем, что ядрышки являются наиболее плотными структурами в клетке. Ядрышки — обязательный компонент клеточного ядра. Они обнаруживаются практически во всех ядрах эукариотических клеток, за редким исключением.

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

Долгое время функциональное значение ядрышка было непонятно. Вплоть до 50-х годов многие исследователи считали, что вещество ядрышка представляет собой своего рода запас, который используется и исчезает в момент деления ядра. Однако еще в 30-х годах было показано (Мак-Клинтон, Хейтц, Навашин), 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. Позднее в 40-х годах, когда было найдено, что ядрышки содержат РНК, стала понятна их «базофилия», сродство к основным (щелочным) красителям (вследствие кислой природы РНК). По данным цитохимических и биохимических исследований, **основным компонентом ядрышка является белок**: на его долю приходится 70—80% от сухого веса. Такое большое содержание белка и определяет высокую плотность ядрышек. Кроме белка в составе ядрышка обнаружены 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 рибосомами. Следующим этапом в изучении ядрышка было открытие двух принципиальных фактов: первый — «ядрышковый организатор» является вместилищем генов рибосомных РНК; второй — ядрышко является источником основной массы цитоплазматической РНК, представленной главным образом рибосомной РНК, т. е. ядрышко является источником всех клеточных рибосом.

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 также 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 представлена именно рибосомной 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 белков и несколько молекул РНК. Рибосомы прокариотов и эукариотов по своим размерам и молекулярным характеристикам отличаются, хотя и обладают общими принципами организации и функционирования.

Полная, работающая рибосома состоит из двух неравных субъединиц: она легко обратимо диссоциирует на большую субъединицу и малую. Размер полной прокариотической рибосомы составляет $20 \times 17 \times 17$ нм, эукариотической — $25 \times 20 \times 20$. 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 детали очертания 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. 1), ее длина составляет около 23 нм, а ширина — 12 нм. Большая субъединица похожа на полусферу с тремя торчащими

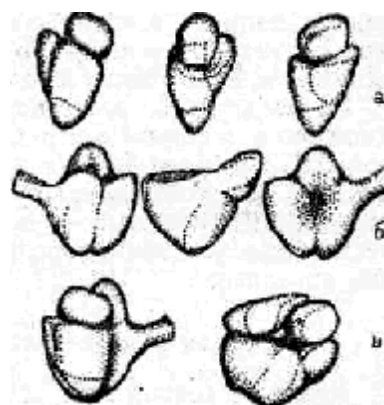


Рис. 1. Рибосомы бактерий в разных проекциях. а — малая субъединица; б — большая субъединица; в — полная 70S рибосома, вид сверху и сбоку

выступами. При ассоциации в полную 70S рибосому малая субчастица ложится одним концом на один из выступов 50S частицы, а другая — в ее желобок. В состав малых субъединиц входит по одной молекуле РНК, а в состав большой — несколько: у прокариотов — две, а у эукариотов — три молекулы. Характеристики молекулярной композиции рибосом даны в табл. 1.

Таким образом, в состав эукариотической рибосомы входят четыре молекулы РНК разной длины: 28S РНК содержит 5000 нуклеотидов, 18S РНК — 2000, 5,8 S РНК — 160, 5S РНК — 120 нуклеотидов.

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, например, сама по себе молекула 18S РНК в физиологических ионных условиях образует палочковидную частицу, определяющую форму малой субъединицы рибосомы.

Таблица 1. Молекулярная характеристика рибосом

Объект	Коэффициент седиментации полной рибосомы и ее субъединиц	Количество молекул РНК на субъединицу	Коэффициент седиментации РНК	Количество белковых молекул на субъединицу
Рибосомы прокариотов	30S→ 70S	1	16S	21
	50S→	2	23S 5S	34
Рибосомы эукариотов	40S→ 80S	1	18S	Всего около 80
	60S→	3	28S 5S 5,8S	

Под действием низких ионных сил, особенно при удалении ионов магния, плотные рибосомные субъединицы могут разворачиваться. Для того чтобы образовались рибосомы, необходимо наличие четырех типов рибосомных РНК в эквимольных отношениях и наличие всех рибосомных белков. Сборка рибосом может происходить спонтанно *in vitro*, если последовательно добавлять к РНК белки в определенной последовательности.

Следовательно, для биосинтеза рибосом необходим синтез множества специальных рибосомных белков и 4 типов рибосомной РНК. Где эта РНК синтезируется, на каком количестве генов, где эти гены локализованы, как они организованы в составе ДНК хромосом — все эти вопросы в последнее десятилетие были успешно разрешены при изучении строения и функции ядрышек.

Множественность рибосомных генов

Ядрышковый организатор (место расположения генов рибосомальных РНК) представляет собой не точечный локус хромосомы, а является множественным по своей структуре, содержит несколько одинаковых генных участков, каждый из которых отвечает за образование ядрышка. В составе геномов эукариотов рибосомные гены представлены сотнями и тысячами единиц; они принадлежат к фракции умеренно повторяющихся последовательностей ДНК. Даже у бактерий может быть несколько (6—7) рассеянных по геному идентичных последовательностей, ответственных за синтез рРНК. В табл. 2 приведены некоторые примеры числа генов рРНК у различных представителей эукариотов.

Таблица 2 Количество рибосомных генов на гаплоидный набор хромосом

Объект	Число генов	Объект	Число генов
Хордовые		Моллюски	
Млекопитающие		устрица	220
человек	200	Нематоды	
мышь	100	аскарида	300
кошка	1000		
Птицы		Простейшие	
курица	200	эвглена	800
		тетрахимена	290
Амфибии		Высшие растения	
тритон гребенчатый	4100	фасоль	2000
амфиума	19600	кукуруза	8500
Рыбы		Грибы	
линь	120	дрожжи пекарские	140
лосось	730		
неоцератод	4800	Водоросли	
Беспозвоночные		хламидомонада	150
Иглокожие		ацетабулария	1900
морской еж	260		
Насекомые		Слизневики	
сверчок домашний	170	диктиостелиум	200
шелкопряд тутовый	240	физарум	80

Аmplифицированные ядрышки

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

Однако существуют случаи, когда гены рРНК подвергаются дифференциальной репликации. При этом дополнительная репликация генов рРНК происходит в целях обеспечения продукции большого количества рибосом. В результате такой сверхсинтеза генов рРНК их копии могут включаться в состав хромосомы или же становиться свободными, экстрахромосомными. В последнем случае эти внехромосомные копии генов рРНК могут функционировать, 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 это явление изучено на растущих ооцитах амфибий, хотя оно встречается как у животных, так и у растений.

Строение и функционирование генов рРНК

В ядрышковых организаторах определенных хромосом локализованы места множественных сгруппированных вместе генов рибосомной РНК. Но как уже говорилось, существуют 4 типа молекул рибосомной РНК, каждый из которых в полной эукариотической рибосоме представлен один раз. Значит ли это, что для каждой из этих РНК (28S рРНК, 18S рРНК, 5.8S рРНК, 5S рРНК) должен существовать отдельный ген, было долгое время неясным.

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 13000 оснований. Во время процессинга происходит разрыв предшественника на три фрагмента и, кроме того, наблюдается значительная деградация РНК (около 50%, т. е. 6000 нуклеотидов). Кроме этих данных было вычислено, что молекула 5S РНК синтезируется независимо от 45S РНК и локализация гена 5S рРНК не связана с ядрышковым организатором.

Таким образом, 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. 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, у ксенопуса — 24 000, у гребенчатого тритона — 32 000.

В интенсивно функционирующих ядрышках синтезируется огромное число рибосом: 1500—3000 штук в минуту. Поэтому в ядрышке насчитывается около $5 \cdot 10^4$ предшественников рибосом.

Белки ядрышка

Несмотря на то что ядрышко является базофильной, богатой нуклеиновыми кислотами, структурой, основным ее химическим компонентом являются белки. Во фракции выделенных ядрышек отношение белок: ДНК составляет 8:1.

Ядрышки богаты негистоновыми белками. Во фракцию негистоновых белков (исключая рибосомные белки) входит около 40 различных белков.

Структурные типы ядрышек

Приведенные выше описания дают основу для понимания разнообразия строения ядрышек в клетках в зависимости от уровня синтеза рРНК. Обычно различают несколько структурных типов ядрышек: ретикулярный (или нуклеолономный) компактный, кольцевидный, остаточный (покоящийся), сегрегированный.

Ретикулярный тип ядрышка наиболее характерен для большинства клеток. Для него свойственны нуклеолономное строение, обилие гранул и фибриллярного плотного материала. Во многих случаях фибриллярные центры выявляются

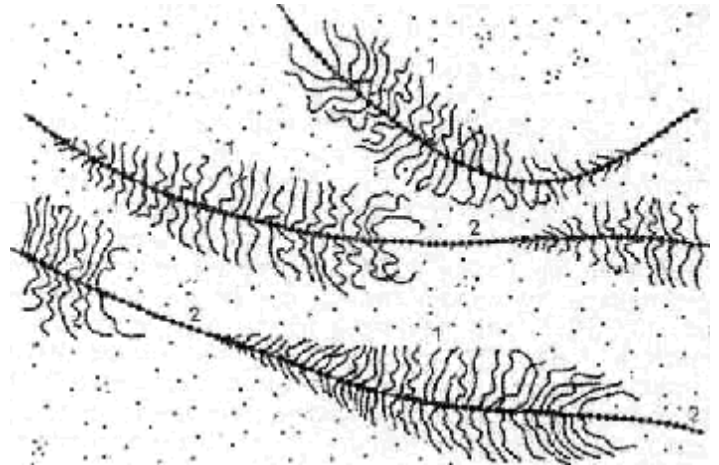


Рис. 2. Рибосомные транскрипты в выделенных амплифицированных ядрышках, в препарате по О. Миллеру. 1 — транскрибируемый участок (р-ген); 2 — спейсеры

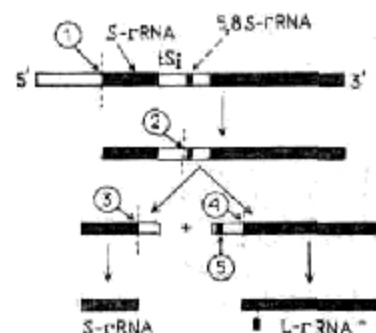


Рис. 3. Процессинг 45S РНК /—5 — места последовательного расщепления предшественника рибосомных РНК

плохо, вероятно, из-за высокого уровня транскрипции. Этот тип ядрышек встречается в клетках животных и растений. Так, например, ретикулярный тип ядрышка гигантских политенных хромосом двукрылых насекомых и гигантских хромосом антиподиальных клеток ячменя очень сходен.

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.

Ядрышко во время митоза

При световой микроскопии ядрышко выявляется во время интерфазы, в митотических клетках оно исчезает. При использовании цейтраферной микрокиносъемки можно наблюдать в живых клетках, как по мере конденсации хромосом ядрышко в профазе исчезает. 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. Исчезновение ядрышек совпадает с прекращением синтеза клеточной (в основном рибосомной) РНК, который возобновляется в поздней телофазе, совпадая по времени с появлением новых ядрышек.

Занятие 6. Ядерная оболочка.

Структура, ограничивающая периметр 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 от процессов синтеза нуклеиновых кислот, что создает дополнительные, по сравнению с прокариотами, возможности для регуляции геной 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 «привратниками» (контрольными пунктами), регулирующими потоки ядерного «импорта» и «экспорта». Кроме того, как уже упоминалось, 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. Внутренняя мембрана ядерной оболочки структурно связана с ламиной — фиброзным периферическим слоем ядерного белкового матрикса. В общем виде ядерная оболочка 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.

Компоненты ядерной оболочки

Внешняя мембрана ядерной оболочки, непосредственно контактирующая с цитоплазмой клетки, имеет ряд структурных особенностей, позволяющих отнести ее к собственной мембранной системе эндоплазматического ретикула (ЭПР). Так, на внешней ядерной мембране обычно располагается большое количество рибосом, как и на мембранах ЭПР. Существуют многочисленные наблюдения о непосредственном переходе внешней ядерной мембраны в систему каналов ЭПР, что особенно подчеркивает структурную идентичность этих мембран (рис. 1).

Так, у клеток, бедных эндоплазматическим ретикулом внешняя ядерная мембрана может представлять собой минимальный объем эндоплазматического ретикула, который может участвовать в синтезе белкового и липидного компонентов мембран. Описаны случаи, когда от внешней ядерной оболочки отщепляются мембранные вакуоли, направляющиеся в проксимальный отдел аппарата Гольджи. Состав липидов и белков внешней ядерной мембраны и ретикула во многом сходен. Возможно, именно это определяет их общие биохимические функции, что особенно подчеркивается наличием рибосом на поверхности мембран, обращенной в гиалоплазму. Рибосомы синтезируют мембранные и секретруемые белки, которые могут транспортироваться в перинуклеарное пространство, а оттуда в полости цистерн ЭПР. Так, например, при стимуляции образования γ -глобулинов в плазмацитах 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 не имеет на своей поверхности рибосом, но связана с **фиброзным слоем—ядерной ламиной (lamina nucleum limitans)**, которая в свою очередь закоривает хроматин на ядерной оболочке. Связь хроматина с внутренней мембранной оболочкой является ее характерной особенностью, хотя существуют примеры, когда эти связи нарушаются при сохранении целостности ядерной оболочки. Так, в ооцитах амфибий на стадии диплотены все хромосомы собираются в центре ядра и полностью теряют связь с ядерной оболочкой. С другой стороны, при делении клеток с так называемым закрытым типом митоза большая часть внутренней ядерной мембраны теряет связь с хроматином.

Белки ламины не образуют неизменную структуру. Фиброзный слой ламины все время перестраивается, особенно в связи с ростом поверхности ядра, во время клеточного цикла.

Наиболее характерной и обращающей на себя внимание структурой в составе ядерной оболочки является **ядерная пора**. Пory в оболочке образуются за счет слияния двух ядерных мембран в виде округлых сквозных отверстий или перфораций с диаметром около 90 нм.

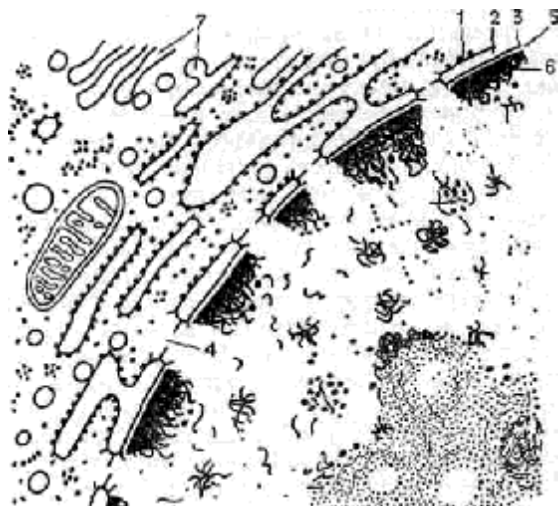


Рис. 1. Участок периферии ядра. 1 — внешняя мембрана ядерной оболочки; 2 — перинуклеарное пространство; 3 — внутренняя мембрана ядерной оболочки; 4 — ядерные поры; 5 — ламина; 6 — хроматин; 7 — мембраны цитоплазмы

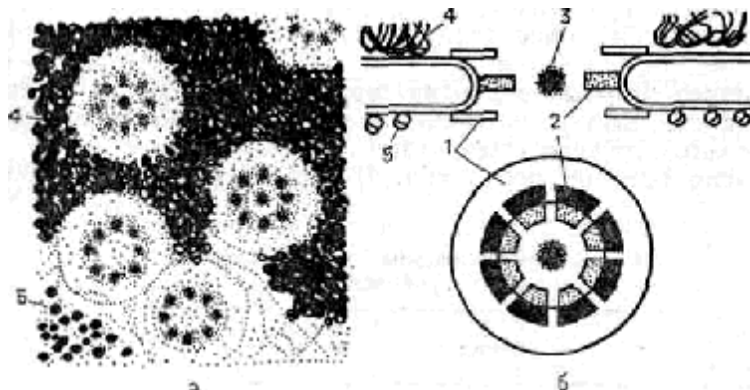


Рис. 2. Строение ядерных пор.

а — внешний вид ядерных пор в ядре ооцитов; б — схема строения ядерной поры: 1 — кольцо; 2 — спицы; 3 — центральная гранула; 4 — хроматин; 5 — рибосома

Альдегидная фиксация или метод замораживания и складывания в электронно-микроскопических исследованиях позволяет видеть, что округлое сквозное отверстие в ядерной оболочке заполнено сложноорганизованными глобулярными и фибриллярными структурами. 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 вещества ядра и цитоплазмы могут сообщаться непосредственно. Компоненты комплекса пор, кроме мембран, имеют белковую природу. Комплекс поры состоит из трех основных структур: цитоплазматических и ядерных «колец», центральных «спиц» и «центральной гранулы» (рис. 2). Трехмерная реконструкция порового комплекса получена путем математической обработки электронно-микроскопических снимков пор выделенных ядерных оболочек ооцитов ксенопуса (рис. 3).

Два кольца — одно со стороны цитоплазмы, другое со стороны ядра — обрамляют пору в тесной связи с ядерными мембранами. Диаметр колец составляет около 120 нм. Они имеют октогонально-симметричную субструктуру, в виде восьми субъединиц. Эти кольца связаны с центральной зоной комплекса поры, которая содержит восемь «спиц», или выростов, торчащих к центру отверстия поры. Спицы представляют собой наиболее выраженные структуры, и их окончания определяют центральный диаметр поры, равный приблизительно 80 нм. Кольца, спицы и их соединяющие элементы вместе образуют некую сложную структуру с двумя осями симметрии: октогональную — с осью, перпендикулярной поро, и билатеральную — с осью, параллельной плоскости ядерной оболочки. Центральная гранула (10—40 нм в диаметре) встречается во многих порах между концами спиц. Ее функциональная роль не ясна. Некоторые авторы считают, что это временная структура, какая-то частица в момент ее выхода из ядра, хотя это прямо не доказано.

Размер ядерных пор и их структура стандартны не только для данной клетки, но и для всех клеток данного организма, более того, для всех эукариотов.

Число ядерных пор (табл. 1) зависит от метаболической активности клеток: чем выше синтетические процессы в клетках, тем больше пор на единицу поверхности клеточного ядра. Так, у эритробластов (клетки — предшественники ядерных эритроцитов) низших позвоночных животных во время интенсивного синтеза и накопления гемоглобина обнаруживается в ядре около 30 ядерных пор на 1 $\mu\text{м}^2$. После того как эти процессы заканчиваются, в ядрах зрелых клеток (эритроцитов) прекращаются синтезы ДНК и РНК, и количество пор падает до 5 на $\mu\text{м}^2$. В ядерных оболочках полностью зрелых сперматозоидов поры не обнаруживаются, так же как у микронуклеусов некоторых инфузорий. Количество пор может изменяться в течение клеточного цикла. участков.

Таблица 1. Количество ядерных пор в различных объектах

Объект	Число ядерных	Число пор на 1
Ксенопус		
почка	10,05	3400
ооцит	51,0	37,6-Ю ⁸
Мышь		
культура ткани	10,83	5050
лимфоцит	3,3	400
Человек		
культура ткани	11,24	3930
лимфоцит	4,47	700
Крыса		
гепатоцит	16,1	3800

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

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 окончательных 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 этих окончательных мембран неизвестно.

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 же 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 сортировщика, узнающего и отбирающего специальным образом переносимые молекулы.

По некоторым оценкам, в состав порового комплекса входит не меньше 1000 белковых молекул. Для сравнения заметим, что в состав полной рибосомы входит лишь 80 молекул белка.

Через ядерную оболочку беспрепятственно в обе стороны осуществляется пассивный транспорт высокомолекулярных соединений, имеющих массу не более $5 \cdot 10^3$. 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 молекулярным весом больше 20 000—40 000 D, проникают в ядро медленно или не проникают совсем. Так, инъецированные в цитоплазму белки с м.в.=17 тыс. могут проникнуть в ядро довольно быстро, за 2—3 мин, белки м.в.=40 тыс. — за 30 мин, белки с м.в. =60 тыс. вообще не проникают в ядра. Считается, что белки с гидродинамическим радиусом больше 3,5 нм (что соответствует глобулярному белку с м.в.=65 тыс.) не могут просто механически проходить через ядерную пору. В этих случаях ядерная пора выступает в качестве реального молекулярного сита.

Дело осложняется тем, что многие белки как поступают в ядро, так и выходят из него против градиента концентрации. Так, 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 3 мин, 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 м. в. >60 тыс.

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), 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.

Импорт кариофильных белков

Впервые аминокислотные последовательности ядерной локализации (NLS) были обнаружены на С-конце субъединиц молекулы нуклеоплазмина (ядерный белок, принимающий участие в структуризации хроматина).

Подробно строение NLS изучено у белка — Т-антигена вируса SV40. Кариофильный сигнал состоял из последовательности Pro — Lys — Lys — Lys — Arg — Lys — Val. Одна лишь аминокислотная замена (Lys на Thr или Asp) полностью лишает этот фрагмент кариофильных свойств. Оказалось, что можно создавать химерные белки с этим аминокислотным доменом, благодаря чему необычные для ядер белки (альбумин плазмы, иммуноглобулин G и даже ферритин с м.в.=465 тыс.) могут транспортироваться через ядерные поры.

Эти данные показывают, что NLS-участки «узнаются» ядерными порами, в состав которых должны входить белки-рецепторы. Роль таких белков-рецепторов поровых комплексов отводится нуклеопоринам.

Для транслокации белков необходимо наличие АТФ: в отсутствие АТФ кариофильные белки связывались с ядерной оболочкой, но не попадали в ядро.

Экспорт из ядра в цитоплазму

Все зрелые продукты транскрипционной активности ядер транспортируются в цитоплазму (экспортируются) через ядерные поры. По всей вероятности, такой экспорт из ядра аналогичен импорту кариофильных белков. Одна и та же пора может принимать участие как в импорте, так и в экспорте макромолекул.

Комплексы ядерных пор также должны «узнавать» специфический сигнал в РНК на экспорт, хотя в этом отношении прямых данных нет. Однако ядерные поры «узнают» и не экспортируют короткие (состоящие из 100 нуклеотидов) тРНК, если в их структуре есть лишь одна замена (метиониновая тРНК в 57-м положении). Незрелые формы иРНК, имеющие интронные участки, не транспортируются. Вообще в цитоплазме не обнаруживаются незрелые РНК. Вероятно, для экспорта некоторых РНК необходима их связь с белками. Так, 5S рРНК переносится в цитоплазму вместе с транскрипционным фактором ТФПА, или с белком L5.

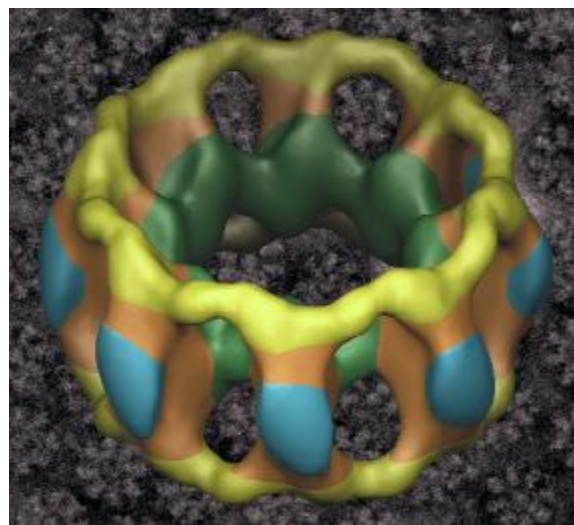


Рис. 3. Строение ядерной поры

Занятие 7. Общие свойства биологических мембран. Плазматическая мембрана.

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%. Структурной основой мембран является двойной слой липидов.

К **липидам** относится большая группа органических веществ, плохо растворимых в воде (гидрофобность) и хорошо растворимых в органических растворителях и жирах (липофильность). Состав липидов, входящих в мембраны клетки, очень разнообразен. Характерными представителями липидов клеточных мембран являются **фосфолипиды** (глицерофосфатиды), **сфингомиелины** и **холестерины** (стероидные липиды) (рис. 1).

Характерной особенностью мембранных липидов является разделение их молекулы на две функционально различные части: неполярные, не несущие зарядов хвосты, состоящие из жирных кислот, и заряженные полярные головки. Полярные головки несут на себе отрицательные заряды или могут быть нейтральными (в случае, если они имеют одновременно положительные и отрицательные заряды). Наличие неполярных хвостов объясняет хорошую растворимость липидов в жирах и органических растворителях.

Если полярные липиды смешать с водой, то образуется эмульсия, состоящая из мицелл. При этом незаряженные (гидрофобные) хвосты будут стремиться образовывать однородную фазу в центре мицеллы, а заряженные гидрофильные, головки будут обращены 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 масло, то образуются мицеллы, как бы вывернутые наизнанку: их гидрофобные хвосты будут направлены в масляную фазу, а заряженные (гидрофильные) головки располагаются внутри мицеллы (рис. 2).

На поверхности воды растворы полярных липидов, растекаясь, образуют мономолекулярную пленку, в которой в водную фазу будут направлены 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, 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. 3).

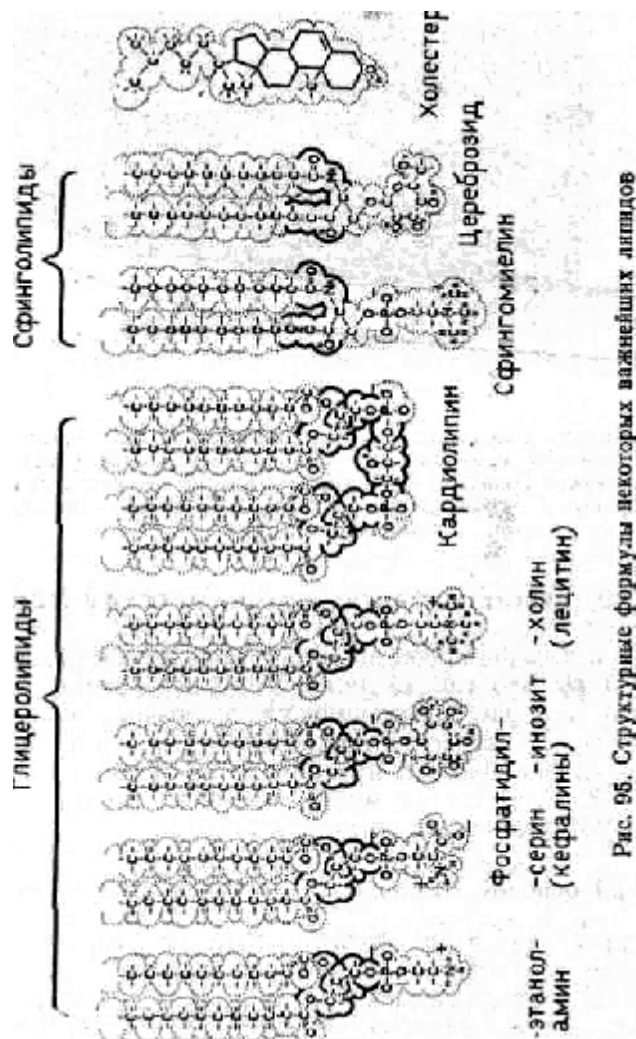


Рис. 1. Схема строения молекул фосфолипидов.

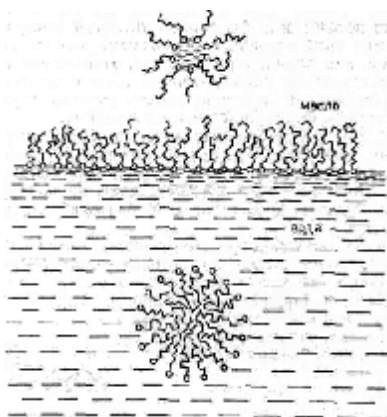


Рис. 2. Мономолекулярный слой липидов на поверхности раздела фаз вода — масло и мицеллы липидов в масле и воде.

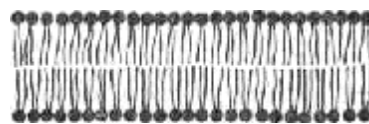


Рис. 3. Сплошной билипидный слой, образующийся в воде при высокой концентрации липидов.

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. Такое свойство может быть использовано для практических целей. Например, при смешивании липидов в водной среде образуется масса полых мембранных пузырьков, липосом (рис. 4). Жидкость, попавшая внутрь пузырьков, уже не может свободно обмениваться с жидкостью, находящейся снаружи. Таким способом искусственные мембранные липосомы можно «загрузить»

лекарственными веществами, которые могут в нужных концентрациях поступать к клеткам.

В среднем в липопротеидных мембранах белки по весу составляют 50%, но их количество в разных мембранах неодинаково. Так, в мембранах митохондрий на долю белков приходится около 75%, а в плазматической мембране клеток миелиновой оболочки — около 25%. Белковые молекулы как бы вкраплены в билипидный слой мембраны. Часть их 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+} .

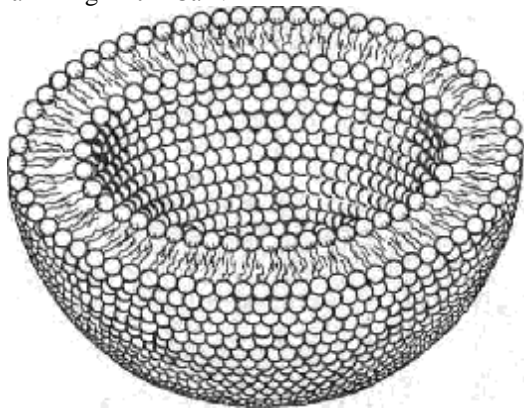


Рис. 4. Липосома: замкнутый билипидный слой в виде вакуоли

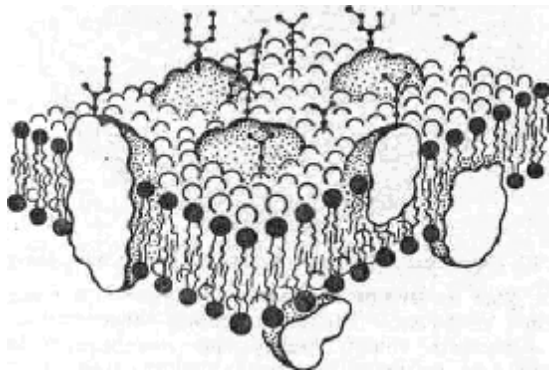


Рис. 5. Мозаичная модель клеточных мембран («липидное озеро»)

Клеточные мембраны асимметричны. Состав липидов по обе стороны мембраны различен, что определяет асимметричность в строении билипидного слоя. Так, с помощью химического маркирования было найдено, что 80% сфингомиелина, 75% фосфатидилхолина и 20% фосфатидил-этанолamina локализованы на наружной поверхности плазматической мембраны, на внутренней располагаются весь фосфатидилсерин и 80% фосфатидилэтанолamina.

Особенно выражена асимметрия мембран в отношении интегральных белков. В составе естественных мембран белки строго ориентированы. Большой частью 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. Полуинтегральные и примембранные белки также асимметрично расположены в мембранах. Так, в эндоплазматическом ретикулуме белки-ферменты, синтезирующие липиды, находятся на цитозольной стороне мембран, а ферменты, пришивающие сахара к белковым цепочкам, — гликозидазы — локализованы на внешней стороне мембраны.

Наличие углеводного компонента характерно практически для всех мембран клетки, но особенно 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 везикулов 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-ацетилгалактоза-мин, пентозы — арабиноза и ксилоза, а также нейраминавая (сиаловая) кислота.

Мембраны ассоциированы 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 не только позволяет сделать мембраны более жесткими, но и обеспечивает их подвижность, необходимую для выполнения транспортных функций.

Рост мембран происходит за счет встраивания готовых мембранных пузырьков. После деления клеток увеличивается объем растущих дочерних клеток, и тем самым растет клеточная поверхность, увеличивается площадь

В плазматической мембране эти белки тесно связаны с белковыми структурами цитоскелета. 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). Белки в липидных слоях мембран располагаются так, что их неполярные участки как бы погружены в «жирную» часть мембраны, где находятся гидрофобные участки липидов. Полярная (гидрофильная) же часть таких белков взаимодействует с головками липидов и обращена в сторону водной фазы (рис. 5).

Интересно, что большая часть липидных молекул (70%) не связана с белками, так что белковые молекулы как бы плавают в «липидном озере». Липиды и белки мембран обладают латеральной подвижностью. Исследование искусственных липидных бислоев показало, что эти мембраны представляют собой двумерную жидкость, вязкость которой сравнима с вязкостью оливкового масла.

Молекулы липидов в составе таких, а также естественных мембран движутся с огромной скоростью (коэффициент диффузии для них равен 10^{-8} см²/с), достигающей 2 мкм за 1 с.

Липидные молекулы могут перемещаться 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 часто имеют олигосахаридные цепочки, направленные во внеклеточную среду (рис. 5).

плазматической мембраны. Однако это не единственный пример быстрого роста объема и поверхности. Поверхность быстро растущих клеток в тычиночных нитях злаков может за 1 ч увеличиться в 65 раз, т. е. каждую минуту плазмалемма нарастает на ее первоначальную величину. Такую большую скорость роста плазматической мембраны можно объяснить только тем, что в растущую мембрану быстро встраиваются мембранные пузырьки (этот процесс называется интеркаляция), подобно тому как это происходит при экзоцитозе.

Откуда же берутся эти готовые блоки, мембранные пузырьки? Удалось проследить, что первичный генезис мембран осуществляется в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), 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 либо с лизосомами, либо с плазматической мембраной, либо 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.

Рост мембран митохондрий и пластид имеет иной характер. Площадь мембран митохондрий увеличивается за счет синтеза основной массы белков и липидов в гиалоплазме клетки, вслед за чем митохондриальные белки и липиды транспортируются через мембранную оболочку митохондрий и встраиваются в их компоненты.

ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА

Плазматическая мембрана, или плазмалемма, среди различных клеточных мембран занимает особое место. Это поверхностная периферическая структура, ограничивающая клетку снаружи; она непосредственно связана с внеклеточной средой, а, следовательно, со всеми веществами и стимулами, воздействующими на клетку. Именно поэтому плазматическая мембрана играет роль барьера, преграды между сложно организованным внутриклеточным содержимым и внешней средой. При этом она не только служит механическим барьером, но, главное, ограничивает свободный двусторонний поток через мембрану низко- и высокомолекулярных веществ. Более того, плазмалемма выступает как структура «узнающая», рецептирующая, различные химические вещества и регулирующая избирательный транспорт этих веществ в клетку и из нее. Другими словами, плазматическая мембрана осуществляет функции, связанные с регулируемым избирательным трансмембранным транспортом веществ и исполняет роль первичного клеточного анализатора. В этом отношении плазмалемму 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. Как ни странно, но плазматическую мембрану можно уподобить мембране внутриклеточной вакуоли, но вывернутой наизнанку: она не окружена гиалоплазмой, а окружает ее.

Барьерно-транспортная роль плазмалеммы.

Окружая клетку со всех сторон, плазматическая мембрана играет роль механического барьера.

Гликокаликс- представляет собой внешний по отношению к липопротеидной мембране слой, содержащий полисахаридные цепочки мембранных интегральных белков — гликопротеидов. Гликокаликс обеспечивает механическую устойчивость плазматической мембраны. Кроме гликокаликса механическая устойчивость плазматической мембраны обеспечивается структурой примыкающего к ней со стороны цитоплазмы кортикального слоя и внутриклеточных фибриллярных структур.

Барьерная роль плазмалеммы заключается в ограничении свободной диффузии веществ. Плазматическая мембрана, как и другие липопротеидные мембраны клетки, является полупроницаемой. Это значит, что молекулы проходят через нее с различной скоростью. Максимальной проникающей способностью обладают вода и растворенные в ней газы, значительно медленнее (примерно в 10^4 раз) проникают сквозь мембрану ионы. Поэтому если клетку, например, эритроцит, поместить в среду, где концентрация солей ниже, чем в клетке (гипотония), то вода снаружи устремится внутрь клетки, что приведет к увеличению ее объема и разрыву плазматической мембраны («гипотонический шок»). 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.

Трансмембранный перенос. В транспорте ионов через плазмалемму принимают участие мембранные транспортные белки. Эти белки могут проводить в одном направлении одно вещество (унипорт) или несколько веществ одновременно (симпорт), а также вместе с импортом одного вещества выводить из клетки другое (антипорт). Глюкоза, например, может входить в клетки симпортно вместе с ионом Na^+ .

Транспорт ионов может происходить по градиенту концентраций, т. е. пассивно, без дополнительной затраты энергии. В случае пассивного транспорта некоторые мембранные транспортные белки образуют молекулярные комплексы, каналы, через которые растворенные молекулы проходят сквозь мембрану за счет простой диффузии по градиенту концентрации. Часть этих каналов открыта постоянно, другие могут 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).

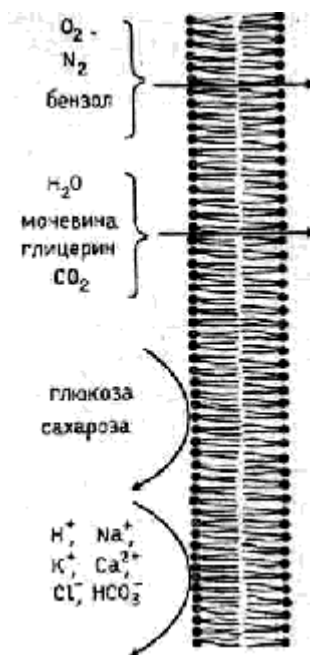


Рис. 6. Проницаемость искусственного билипидного слоя для различных молекул

Таблица 14. Примерные концентрации ионов

Ион	Концентрация ионов, мМ	
	внутриклеточная	внеклеточная
Na ⁺	5—15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	30	1—2
Ca ²⁺	1—2	2,5—5
Cl ⁻	4	110

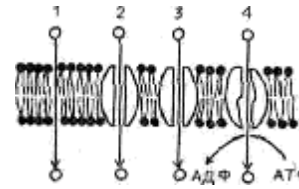


Рис. 7. Схема переноса ионов и молекул через плазматическую мембрану. 1 — простая диффузия; 2 — облегченная диффузия; 3 — каналобразующий белок; 4 — белок-переносчик

Макромолекулы, такие, как белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды, липопротеидные комплексы и другие, сквозь клеточные мембраны не проходят, в отличие от ионов и мономеров. Транспорт макромолекул, их комплексов и частиц внутрь клетки происходит совершенно иным путем — посредством эндоцитоза. При эндоцитозе определенный участок плазмалеммы захватывает, как бы обволакивает внеклеточный материал, заключает его в мембранную вакуоль, 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 они распадаются, деполимеризуются до мономеров, которые путем трансмембранного переноса попадают в гиалоплазму. Основное биологическое значение эндоцитоза — получение строительных блоков за счет внутриклеточного переваривания, которое осуществляется на втором этапе эндоцитоза, после слияния первичной эндосомы с лизосомой — вакуолью, содержащей набор гидролитических ферментов.

Эндоцитоз формально разделяют на пиноцитоз и фагоцитоз. Фагоцитоз — захват и поглощение клеткой крупных частиц (иногда даже клеток или их частей). Пиноцитоз вначале определялся как поглощение клеткой воды или водных растворов разных веществ. Сейчас известно, что оба процесса протекают очень сходно, и поэтому употребление этих терминов может отражать лишь различия в объемах и массе поглощенных веществ. Общее для обоих процессов то, что поглощенные вещества на поверхности плазматической мембраны окружаются мембраной в виде вакуоли, которая перемещается внутрь клетки.

Эндоцитоз, включая пиноцитоз и фагоцитоз, может быть неспецифическим, или **конститутивным**, и **специфическим**, опосредуемым рецепторами (рецепторным). Неспецифический эндоцитоз 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.

Как неспецифический, так и рецепторный эндоцитоз, приводящий к отщеплению мембранных пузырьков, происходит в специализированных участках плазматической мембраны — в так называемых **окаймленных ямках**. 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 небольшие впячивания, ямки (рис. 8а). 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. 8б). 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 эндоцитозных вакуолей, окаймленных пузырьков.

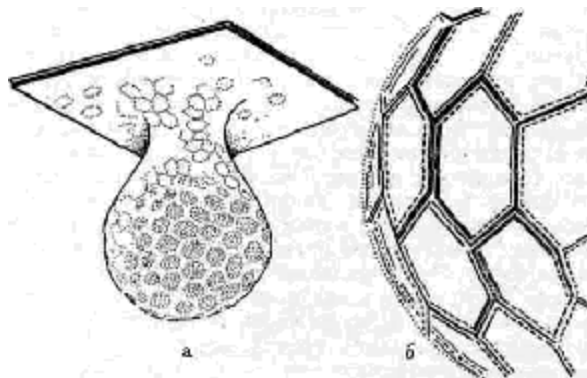


Рис. 8. Окаймленные пузырьки. а — вид со стороны цитозоля; б — трискелионы на поверхности пузырька.

После того как окаймленный пузырек отделяется от плазмалеммы и начинает переноситься в глубь цитоплазмы, клатриновый слой распадается, диссоциирует, мембрана эндосом (пиносом) приобретает обычный вид. После потери клатринового слоя эндосомы начинают сливаться друг с другом. **Специфический**, или опосредуемый рецепторами, эндоцитоз имеет ряд отличий от неспецифического. Главное состоит 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.

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 вакуоли сливаются, и пузырек опустошается в окружающую среду. С помощью экзоцитоза происходит процесс рециклизации мембран, участвующих в эндоцитозе.

Рецепторная роль плазмалеммы. В качестве рецепторов на поверхности клетки могут выступать белки мембраны или элементы гликокаликса (полисахариды, гликопротеиды). Считается, что такие чувствительные к отдельным веществам участки разбросаны по поверхности клетки или собраны в небольшие зоны. Так, на поверхности бактериальных клеток или клеток животных существует ограниченное число мест, с которыми могут связываться вирусные частицы.

Роль многих клеточных рецепторов заключается не только в связывании специфических веществ или способности реагировать на физические факторы, но и в передаче сигналов с поверхности внутрь клетки.

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).

Межклеточные соединения (контакты).

У многоклеточных организмов за счет межклеточных взаимодействий образуются сложные клеточные ансамбли, поддержание которых осуществляется 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. За агрегацию однородных клеток отвечают трансмембранные гликопротеиды, так называемые **кадгерины**.

В эпителиальных пластах или при тесном соседстве клеток друг с другом (например, в сердечной мышце, кровеносных органах) между клетками всегда сохраняется пространство шириной 10—20 нм. Это простое, неспециализированное соединение (контакт), обеспечивающее слипание клеток за счет элементов гликокаликса, в состав которого входят и специфические молекулы кадгеринов. Именно слои гликокаликса двух соседних клеток как бы удерживают их плазматические мембраны на определенном расстоянии друг от друга, оставляя свободным межклеточное пространство для транспорта различных веществ (рис. 9). В это межклеточное пространство достаточно свободно диффундируют ионы и низкомолекулярные вещества, через них могут проходить и полимеры. Со стороны цитоплазмы в участках простого соединения клеток не наблюдается каких-либо специальных образований.

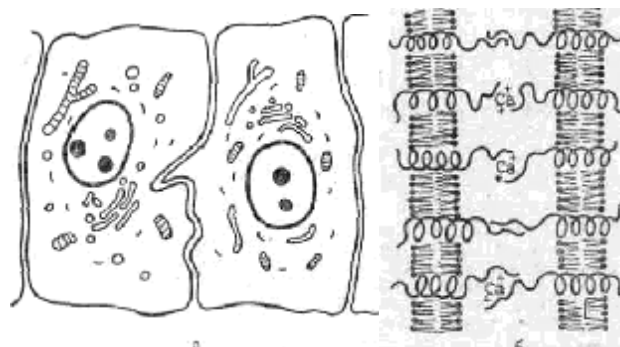


Рис. 9. Схема простого межклеточного соединения. а — простое соединение, без участия специальных структур; б — трансмембранные гликопротеиды определяют связывание двух соседних клеток

Иногда, особенно в однослойных эпителиях, плазматические мембраны соседних клеток образуют множественные впячивания, напоминающие плотничий шов. Это создает дополнительную прочность межклеточному соединению.

Кроме такого простого адгезивного (но специфического) соединения есть целый ряд специальных межклеточных структур, контактов или соединений, которые выполняют определенные функции. Это запирающие, закоривающие и коммуникационные соединения.

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 осмиофильных слоя обеих мембран как бы сливаются в один общий слой толщиной 2—3 нм. Слияние мембран происходит не по всей площади плотного контакта, а представляет собой ряд точечных сближений мембран (рис. 10).

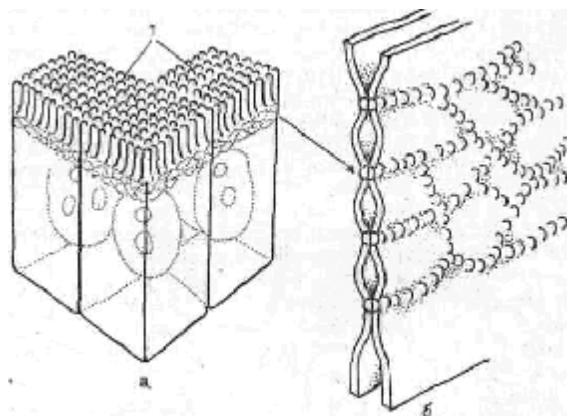


Рис. 10. Плотное соединение.

а — расположение плотного соединения (вставочная пластинка) на клетках кишечного эпителия; б — трехмерная схема участка плотного соединения

Замыкающий, или плотный, контакт встречается между всеми типами эпителия (эндотелий, мезотелий, эпэндима).

Закоривающие (сцепляющие) соединения, или контакты, так называются потому, что они не только соединяют плазматические мембраны соседних клеток, но и связываются с фибриллярными элементами цитоскелета (рис. 11, 12). Для этого типа соединений характерно наличие двух типов белков. Один из них представлен трансмембранными линкерными (связующими) белками, которые участвуют или в собственно межклеточном соединении или в соединении плазмалеммы с компонентами внеклеточного матрикса (базальная мембрана эпителиев, внеклеточные структурные белки соединительной ткани). Ко второму типу относятся внутриклеточные белки, соединяющие, или закоривающие, мембранные элементы такого контакта с цитоплазматическими фибриллами цитоскелета.

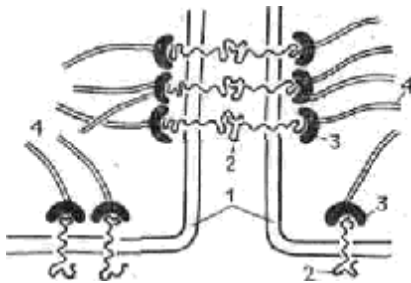


Рис. 11. Схема строения заякоривающих адгезивных соединений. 1 — плазматическая мембрана; 2 — трансмембранные линкерные гликопротеиды; 3 — внутриклеточные белки сцепления; 4 — элементы цитоскелета

Они построены по общему плану со сцепляющими лентами, но выражены в виде небольших участков — бляшек на плазмалемме. В этом случае трансмембранные линкерные белки специфически связываются с белками внеклеточного матрикса, например с фибронектином (рис. 13). 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 в создании механизма, позволяющего клеткам перемещаться.

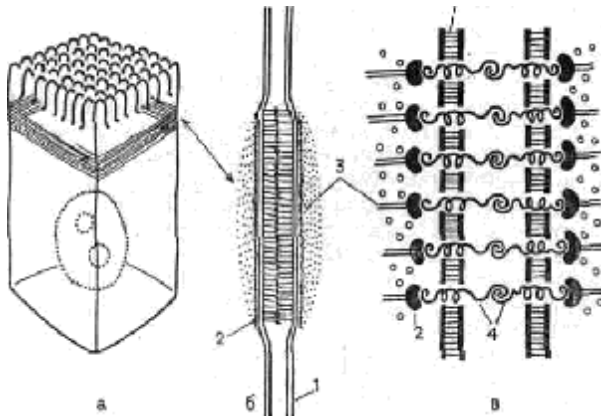


Рис. 12. Адгезивный (сцепляющий) пояс (лента).
а — расположение его в клетке; б — вид на ультратонком срезе; в — схема: 1 — плазматическая мембрана; 2 — слой винкулина; 3 — актиновые микрофиламенты; 4 — линкерные гликопротеиды

а — расположение его в клетке; б — вид на ультратонком срезе; в — схема: 1 — плазматическая мембрана; 2 — слой винкулина; 3 — актиновые микрофиламенты; 4 — линкерные гликопротеиды

Десмосомы, имеющие вид бляшек или кнопок, также соединяют клетки друг с другом (рис. 14). В межклеточном пространстве здесь также виден плотный слой, представленный взаимодействующими интегральными мембранными гликопротеидами — десмоглеинами, которые также в зависимости от ионов Ca^{2+} сцепляют клетки друг с другом. С цитоплазматической стороны к плазмалемме прилежит слой белка десмоплакина, с которым связаны промежуточные филаменты цитоскелета. Десмосомы встречаются чаще всего в эпителиях, в этом случае промежуточные филаменты содержат кератины. Клетки сердечной мышцы, кардиомиоциты, содержат десминовые 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 (рис. 14). Так, в эпителиях линкерные гликопротеиды десмосомы взаимодействуют с белками базальной мембраны, куда входят коллаген, ламин, протеоглики 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 (см. рис. 14). Подобно этому десмосомы прочно связывают друг с другом клетки сердечной мышцы, что позволяет им выдерживать 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.

Щелевые контакты считаются коммуникационными соединениями клеток. Эти структуры участвуют в прямой передаче химических веществ из клетки в клетку, что может не только играть большую физиологическую роль при функционировании специализированных клеток, но и обеспечивать межклеточные взаимодействия при развитии организма, при дифференцировке его клеток. Для этого типа контактов характерно сближение плазматических мембран двух соседних клеток на расстояние 2—3 нм. Именно это обстоятельство долгое время не позволяло на ультратонких срезах отличить данный вид контакта от плотного разделительного (замыкающего) контакта.

Зоны щелевых контактов (размером от 0,5 до 5 мкм) усеяны частицами 7—8 нм в диаметре, расположенными гексагонально с периодом 8—10 нм и имеющими в центре канал около 2 нм шириной. Эти частицы получили

К заякоривающим соединениям относятся межклеточные сцепляющие точечные контакты, сцепляющие ленты, фокальные контакты, или бляшки сцепления. Все эти межмембранные контакты связываются внутри клеток с актиновыми микрофиламентами. К заякоривающим межклеточным соединениям относятся десмосомы и полудесмосомы. Их мембранные компоненты связываются с иными элементами цитоскелета, а именно с промежуточными филаментами.

Фокальные контакты, или бляшки сцепления, встречаются у многих клеток и особенно хорошо изучены у фибробластов.

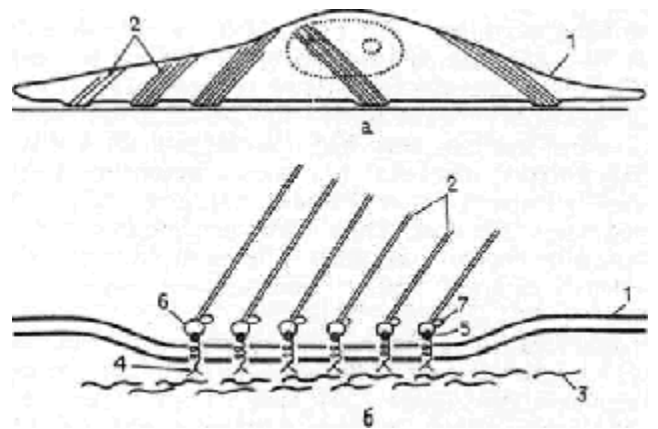


Рис. 13. Фокальный контакт.

название **коннексонов** (рис. 15). В зонах щелевого контакта может быть от 10—20 до нескольких тысяч коннексонов в зависимости от функциональных особенностей клеток. 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.

Через щелевые контакты могут транспортироваться вещества с молекулярным весом не более 1—1,5 тыс. и размером не более 1,5 нм (у насекомых через щелевой контакт могут проходить вещества с молекулярным весом до 2 тыс.). Это разные ионы, аминокислоты, нуклеотиды, сахара, витамины, стероиды, гормоны, цАМФ. Ни белки, ни нуклеиновые кислоты через щелевые контакты проходить не могут.

Синаптический контакт (синапсы). Синапсы — участки контактов двух клеток, специализированных для односторонней передачи возбуждения или торможения от одного элемента к другому (рис. 16). Этот тип контактов характерен для нервной ткани и встречается как между двумя нейронами, так и между нейронами и каким-либо иным элементом — рецептором или эффектором. Примером синаптического контакта является также нервно-мышечное окончание. В принципе передача возбуждения может осуществляться и другими типами контактов (например, щелевым контактом в сердечной мышце), однако именно в синаптической связи достигается высокая эффективность в реализации нервного импульса. Синапсы образуются на терминальных участках отростков нервных клеток (нейронов) — на дендритах и аксонах. Межнейронные синапсы обычно имеют вид грушевидных расширений (бляшек). Синаптические бляшки могут контактировать как с телом другого нейрона, так и с его отростками.

Плазмодесмы. Этот тип межклеточных связей встречается у растений. Плазмодесмы представляют собой тонкие трубчатые цитоплазматические каналы, соединяющие две соседние клетки. Диаметр этих каналов обычно составляет 20—40 нм. Ограничивающая эти каналы мембрана непосредственно переходит в плазматические мембраны соседствующих клеток. Плазмодесмы проходят сквозь клеточную стенку, разделяющую клетки (рис. 17). Таким образом, у некоторых растительных клеток плазмодесмы соединяют гиалоплазму соседних клеток, поэтому формально здесь нет полного разграничения, отделения тела одной клетки от другой. Функциональная роль плазмодесм очень велика. С их помощью обеспечивается межклеточная циркуляция растворов, содержащих питательные вещества, ионы и другие соединения.

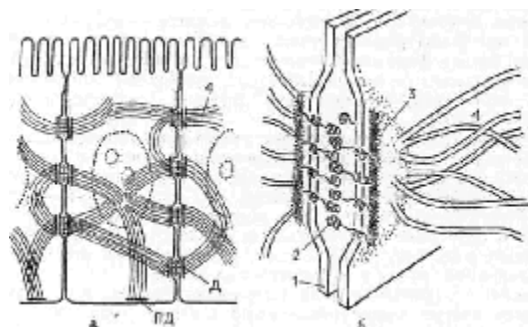


Рис. 14. Десмосома.

а — расположение в клетке; б — молекулярная схема:
1 — плазматическая мембрана; 2 — десмоглеиновый слой; 3 — слои десмоплакина; 4 — промежуточные филаменты. Д — десмосома, ПД — полудесмосома

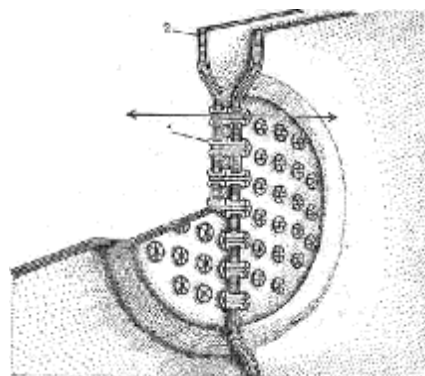


Рис. 15. Щелевое соединение, общая схема
1 — коннексон; 2 — плазматическая мембрана

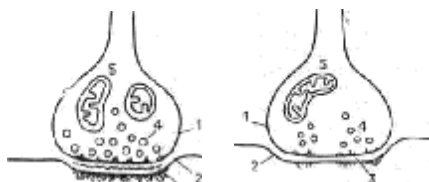


Рис. 16. Схема синаптического нервного соединения.

1 — просинаптическая мембрана (мембрана отростка нервной клетки); 2 — постсинаптическая мембрана; 3 — синаптическая щель; 4 — синаптические пузырьки; 5 — митохондрии

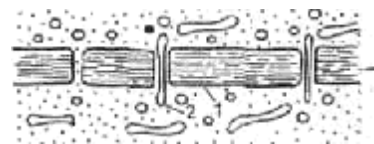


Рис. 17. Плазмодесмы.

1 — плазматическая мембрана; 2 — мембрана десмотубулы; 3 — клеточная стенка

Специализированные структуры плазматической мембраны.

Плазматическая мембрана многих клеток животных может образовывать различной структуры выросты. Часто такие сложные выросты включают в себя специальные структуры цитоплазмы (микротрубочки, фибриллы), что приводит к развитию очень сложно организованных участков клетки, таких, как **реснички**, **жгутики**, отростки чувствительных клеток и т.п.

Наиболее часто встречаются на поверхности многих животных клеток **микроворсинки**. Это выросты цитоплазмы, ограниченные плазматической мембраной, имеющие форму цилиндра с закругленной вершиной. Микроворсинки характерны для клеток эпителия, но обнаруживаются и среди соединительных клеток (фибробласты, лейкоциты). Толщина микроворсинок около 100 нм. Число и длина микроворсинок различны у разных типов клеток. Больше всего микроворсинок обнаружено в так называемой щеточной каёмке кишечного и почечного эпителия. Здесь они образуют плотный непрерывный слой на апикальной поверхности клетки. Их высота достигает 0,6—0,8 мкм. На одну клетку кишечного эпителия приходится до 3000 микроворсинок. Узкие промежутки между микроворсинками, плазматическая мембрана которых имеет толстый слой гликокаликса, образуют своего рода сито, через которое в процессе всасывания проходят различные вещества. В центральных частях микроворсинок щеточной каемки лежат продольно актиновые филаменты, оканчивающиеся в цитоплазме в зоне терминальной сети.

Роль микроворсинок до конца не ясна, однако возрастание их числа резко увеличивает площадь поверхности клетки. Это особенно важно для клеток, участвующих во всасывании. Так в кишечном эпителии на 1 мм² поверхности насчитывается до 2·10⁸ микроворсинок.

Другой класс плазматических выростов — **реснички** и **жгутики**. Они также покрыты плазматической мембраной и содержат систему микротрубочек, связанных с базальным тельцем. Диаметр реснички равен примерно 200 нм, длина может достигать 20 мкм. Количество ресничек на клетку варьирует. Если ресничка одна, то ее называют жгутиком; его длина варьирует от 1 мкм до 2 мм.

Клеточные оболочки

Как уже говорилось, у многих клеток простейших и животных снаружи от плазматической мембраны, экстрацеллюлярно, лежит слой гликокаликса. Он включает в себя длинные, ветвящиеся молекулы полисахаридов, связанных с белками (гликопротеины) и липидами плазматической мембраны. Этот слой несет множество функциональных нагрузок: создание околоклеточной среды, фильтрация и частичная механическая защита клетки от повреждений, хотя ее роль в сохранности клеток невелика, и др.

Иная картина у прокариотических клеток и у клеток растений. И у тех и у других снаружи клеток расположена плотная, часто многослойная структура — клеточная оболочка, или клеточная стенка. **Клеточная оболочка** — это тоже (как и полисахаридные участки гликокаликса) экстрацеллюлярная структура, лежащая за плазматической мембраной. Клеточные оболочки являются продуктами жизнедеятельности клетки: их компоненты синтезируются клеткой, выделяются из цитоплазмы и собираются вне клетки, вблизи плазматической мембраны в виде сложных неоднородных комплексов.

Основой строения клеточных стенок являются, как и в случае гликокаликса, полисахариды. Организация клеточных полисахаридных стенок такова, что они проницаемы для воды, солей, многих органических молекул. При дополнительном отложении в матриксе стенки клеток растений солей и органических веществ, например лигнина, кутина и других, она становится жесткой и водонепроницаемой.

Роль клеточных стенок и для прокариотических клеток, и для клеток растений чрезвычайно велика. Это не только защитная оболочка и внешний каркас, за счет которого строится сложное тело растений, но и фактор, обеспечивающий тургорные свойства клеток.

Клеточная стенка (оболочка) растений

Клеточная стенка растений формируется при участии плазматической мембраны и является экстраклеточным (внеклеточным) многослойным образованием, защищающим поверхность клетки и служащим как бы ее наружным скелетом (рис. 18). Клеточная стенка состоит из двух компонентов: аморфного пластичного гелеобразного матрикса (основы) с высоким содержанием воды и опорной фибриллярной системы. Дополнительные полимерные вещества и соли, часто входящие в состав оболочек, придают им жесткость и делают их несмачиваемыми. В химическом отношении главные компоненты оболочек растений относятся к структурным полисахаридам.

В состав матрикса оболочек входят гетерогенные группы полисахаридов-гемицеллюлозы и пектиновые вещества. Гемицеллюлозы представляют собой полимерные цепи, состоящие из различных гексоз (глюкозы, маннозы, галактозы и др.), пентоз (ксилозы, арабинозы) и уроновых кислот (глюкуроновой и галактуровой). Пектиновые вещества — гетерогенная группа, в которую входят разветвленные, сильно гидратированные полимеры, несущие отрицательные заряды, обусловленные множеством остатков галактуроновой кислоты. Благодаря свойствам своих компонентов матрикс представляет собой мягкую пластическую массу, укрепленную фибриллами.

Волокнистые компоненты клеточных оболочек растений состоят обычно из целлюлозы — линейного, неветвящегося полимера глюкозы.

Кроме целлюлозы, гемицеллюлозы и пектинов в состав клеточных оболочек входят дополнительные компоненты, придающие им особые свойства. Так, инкрустация (включение внутрь) оболочек лигнином (полимер кониферилового спирта) приводит к одревеснению клеточных стенок, повышению их прочности. Лигнин замещает в таких оболочках пластические вещества матрикса и играет роль основного вещества с высокой прочностью. Часто матрикс укреплен минеральными веществами (SiO₂, CaCO₃ и др.).

При делении клеток растений после расхождения хромосом в экваториальной плоскости клеток появляется скопление мелких мембранных пузырьков, которые в центральной части клеток начинают сливаться друг с другом. Этот процесс слияния мелких вакуолей происходит от центра клетки к периферии и продолжается до тех пор, пока мембранные пузырьки не сольются между собой и с плазматической мембраной боковой поверхности клетки. Так образуется **клеточная пластинка**, или фрагмопласт. В центральной части ее располагается аморфное вещество

матрикса, которое наполняло сливающиеся пузырьки. Эти первичные вакуоли происходят от мембран аппарата Гольджи.

Растущая первичная клеточная стенка состоит из трех слоев: центрального — срединной пластинки, состоящей только из аморфного матрикса, и двух периферических — первичной оболочки, содержащей гемицеллюлозу и целлюлозные фибриллы. Если срединная пластинка—продукт активности исходной клетки, то первичная оболочка образуется за счет выделения гемицеллюлозы и фибрилл целлюлозы двумя новыми клеточными телами. Все дальнейшее увеличение толщины клеточной (вернее, межклеточной) стенки обусловлено активностью двух дочерних клеток, которые с противоположных сторон выделяют вещества клеточной оболочки, утолщающейся путем подслаивания все новых и новых пластов.

Главный волокнистый компонент клеточной стенки больших групп грибов (базидиомицетов, аскомицетов, зигомицетов) **хитин** — полисахарид, где основным компонентом является N-аце-тилглюкозамин. В состав клеточной стенки грибов кроме хитина могут входить вещества матрикса, гликопротеиды и различные белки, синтезированные в цитоплазме и выделенные клеткой наружу.

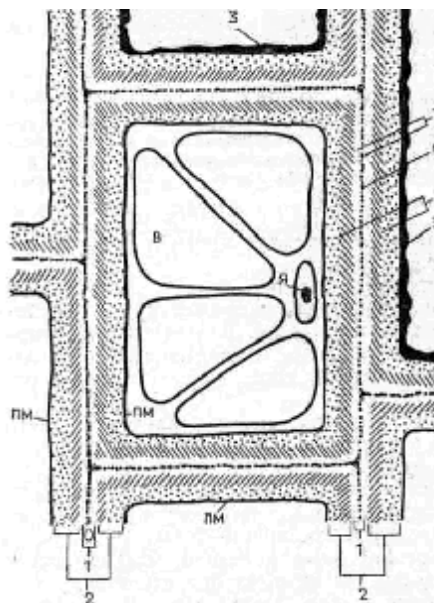


Рис. 18. Схема строения клеточной стенки растений:
0 — срединная пластинка; 1 — первичная оболочка (два слоя по обе стороны от 0); 2 — слои вторичной оболочки; 3 — третичная оболочка; ПМ — плазматическая мембрана; В — вакуоль; Я — ядро

Клеточные оболочки бактерий

Опорным каркасом клеточной стенки бактерий и сине-зеленых водорослей также служит в значительной степени однородный полимер — пептидогликан, или **муреин**. Жесткий каркас, окружающий бактериальную клетку, представляет собой одну гигантскую мешковидную молекулу сложного полисахарида-пептида. Каркас этот называют муреиновым мешком. Основа структуры муреинового мешка — сеть параллельных полисахаридных цепей, построенных из чередующихся дисахаридов (ацетилглюкозамина и соединенного с ацетилмурамовой кислотой), связанных многочисленными пептидными поперечными связями. Основу пептидной части муреина составляют тетрапептиды, образованные различными аминокислотами.

Бактериальная стенка может составлять до 20—30% от сухой массы бактерии. Это связано с тем, что в ее состав кроме многослойного муреинового каркаса входит большое количество дополнительных компонентов, как и в матриксе стенки растений. У **грамположительных** бактерий сопутствующими компонентами служат полимерные вещества, сложным образом вплетенные в муреиновую сеть. К ним относятся теихоевые кислоты, полисахариды, полипептиды и белки. Клеточная стенка грамположительных бактерий обладает большой жесткостью, ее муреиновая сеть многослойна.

Стенки **грамотрицательных** бактерий содержат однослойную муреиновую сеть. Периферия грамотрицательных бактерий содержит наружную мембрану, затем однослойную муреиновую сеть, ниже нее расположена плазматическая мембрана. Между внешней липопротеидной мембраной бактериальной стенки и плазматической мембраной лежит периплазматическое пространство, или **периплазма**. Ширина периплазмы обычно составляет около 10 нм. Она состоит из тонкого (1—3 нм) муреинового слоя и раствора, содержащего специфические белки двух типов — гидролитические ферменты и транспортные белки.

Занятие 8. Гранулярный эндоплазматический ретикулум. Гладкий ретикулум и другие мембранные вакуоли.

Строение гранулярного ретикулума

На ультратонких срезах этот тип ЭР представлен замкнутыми мембранами, которые на сечениях имеют вид вытянутых мешков, цистерн или же узких каналов (рис. 1). Ширина полостей цистерн может очень варьировать в зависимости от функциональной активности клетки.

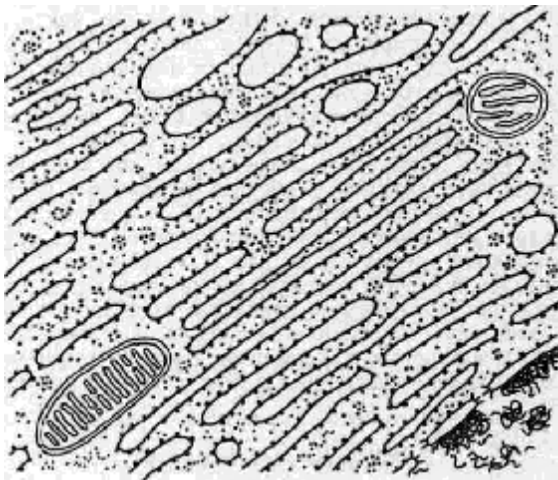


Рис. 1. Гранулярный эндоплазматический ретикулум (эргастоплазма) в клетке поджелудочной железы (рисунок)

Гранулярный (или шероховатый, в отличие от гладкого) ЭР в клетках может быть представлен или в виде редких, разрозненных мембран, или же в виде локальных скоплений таких мембран (эргастоплазма). Первый тип гранулярного ЭР характерен для недифференцированных клеток или клеток с низкой метаболической активностью. Эргастоплазма свойственна клеткам, активно синтезирующим секреторные белки.

Наличие полисом на мембранах однозначно говорит о том, что гранулярный ЭР является одним из мест синтеза белков. Сейчас очевидно, что за этот синтез ответственны собственно рибосомы.

Количество рибосом на ЭР четко связано с его синтетической активностью. Так, в мембранах ЭР в клетке несекретирующей молочной железы связывается до 25% клеточных рибосом, после стимуляции лактации их количество возрастает до

70%. Падение числа рибосом на мембранах ЭР может происходить при дифференцировке клеток.

Как оказалось, с элементами гранулярного ЭР связан не весь синтез белка в клетке, а только его часть.

Рибосомы в составе полисом гиалоплазмы синтезируют белки, необходимые для собственных нужд, для поддержания и обеспечения жизнедеятельности данной клетки (синтезы для «домашнего пользования»). Рибосомы же, связанные с мембранами ЭР, участвуют в синтезе белков, выводимых из данной клетки, — «экспортируемых» белков.

Действительно, большое число клеток многоклеточных организмов, богатых гранулярным ЭР, синтезирует и выводит огромное количество белков. Так, например, клетки аципусов поджелудочной железы синтезируют и выделяют массу белков-ферментов, участвующих в расщеплении пищи в кишечном тракте (протеиназы, липазы, нуклеазы и др.); клетки печени синтезируют альбумины крови; плазмоциты — γ -глобулины, клетки молочной железы — казеин, слюнной железы — пищеварительные ферменты амилазу и РНКазу и т. д. Такая же картина наблюдается у растений: железистые клетки, выделяющие белковые вещества, богаты гранулярным ЭР. Другими словами, клетки многоклеточных организмов, богатые эргастоплазмой, синтезируют белки, необходимые или для работы других клеток, или для выполнения общеорганизменных функций (пищеварительные ферменты, белки плазмы крови, гормоны и др.) (рис. 2).

Наименьшая ширина их может составлять около 20 нм, но в некоторых случаях достигает нескольких микрометров. Особенностью этих мембран является то, 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 рибо-нуклеопротеиды. Теперь хорошо известно, что гранулы Паладе являются не чем иным, как рибосомами, связанными с мембранами ЭР. На мембранах рибосомы собраны в полисомы (множество рибосом, объединенных одной информационной РНК), имеющие вид плоских спиралей, розеток или гроздей. Это функционирующие, синтезирующие белок рибосомы, которые прикрепляются к мембранам своей большой субъединицей.

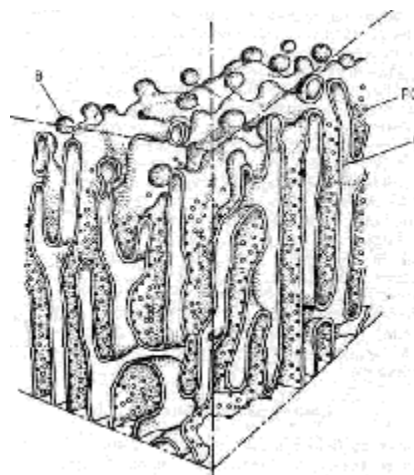


Рис. 2. Схема строения каналов и полостей гранулярного эндоплазматического ретикулума: рс — рибосомы, прикрепленные к мембранам со стороны гиалоплазмы; п — полости плоских цистерн и каналов, отделенных мембранами от гиалоплазмы; в — вакуоли с синтезированными продуктами, отщепляющиеся от цистерн гранулярного ЭР; в этих зонах исчезают рибосомы на мембранах

У одноклеточных также можно наблюдать гранулярный ЭР, который, по-видимому, участвует в синтезе экспортируемых белков. Среди них могут быть не только ферменты внеклеточного пищеварения (что характерно, например, для низших грибов), но и белки, а также гликопротеиды гликокаликса. Кроме синтеза выводимых из клетки белков гранулярный ЭР принимает участие в синтезе белков-ферментов, необходимых для внутриклеточного пищеварения, которые, попадая в полости фагоцитарных или пиноцитозных вакуолей, участвуют в расщеплении макромолекул в лизосомах.

Многочисленные исследования гранулярного ЭР и продуктов его активности — белков — показали, что в ряде случаев в этой мембранной структуре на рибосомах синтезируются белки, не участвующие в обменных процессах данной клетки, т. е. «белки, «ненужные» ей или в ряде случаев даже вредные для нее. Так, например, для роста и размножения клеток молочной железы совсем не нужен казеин молока, который они синтезируют. Более того, клетки пищеварительных желез вырабатывают большое количество гидролитических ферментов, расщепляющих различные биологические макромолекулы. Поэтому синтез таких ферментов и свободный выход их в гиалоплазму должны привести к самоперевариванию клетки (автолизу), к ее гибели. Однако этого не происходит, потому что сразу после синтеза такие белки переносятся через мембрану ЭР в полость вакуолей и тем самым изолируются от содержимого гиалоплазмы и цитоплазматических структур. Такие белки системой мембран ЭР отделяются, сегрегируются и накапливаются в отдельных замкнутых мембранных полостях.

Следовательно, роль гранулярного ЭР 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 ЭР очень важна, так как связана с целым рядом процессов, приводящих к выделению таких белков с помощью вакуолей ап-ларата Гольджи.

Отличительной чертой вакуолярной системы является то, что синтезированные полимеры и продукты их превращений отделены от собственно цитоплазмы, цитозоля, и становятся изолированными от цитозольных ферментов. Такое разобщение очень важно для одновременного протекания в клетке синтетических процессов.

Синтез растворимых белков

Итак, синтез белка в ЭР происходит на рибосомах. Однако долгое время оставался неясным вопрос о том, как же может синтезированная белковая молекула пройти сквозь мембрану ЭР и очутиться в полости вакуолей. Этот механизм перехода еще далек от полного понимания, но появился целый ряд новых данных, разъясняющих возможные пути трансмембранного переноса белков.

Было обнаружено, что многие секретируемые белки имеют не постоянную аминокислотную последовательность в процессе их синтеза. Во время их «созревания» в полости вакуолей гранулярного эндоплазматического ретикула они теряют часть N-концевой последовательности. Это послужило основой для сформулирования гипотезы о «сигнальных последовательностях» на концах молекул секретируемых белков. В дальнейшем эта гипотеза получила целый ряд подтверждений. Теперь пути синтеза белков на рибосомах ЭР можно представить в следующем виде (рис. 3). Еще в гиалоплазме происходит связывание иРНК, кодирующей секреторный белок, с рибосомой и начинается

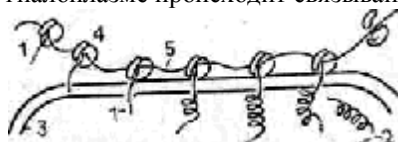


Рис. 3. Схема синтеза секреторных белков на рибосомах ЭР. 1 — «сигнальные» последовательности полипептида; 2 — отщепление «сигнального» конца; 3 — мембрана ЭР; 4 — рибосома; 5 — мРНК

синтез белковой цепи. Важно то, что сначала синтезируется «сигнальная последовательность», богатая гидрофобными аминокислотами, куда входит 5—10 аминокислот. Эта «сигнальная последовательность» в цитозоле «узнается» и связывается с «узнающей сигнальной 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 ЭР, обращенной к гиалоплазме, расположены рецепторные белки, связывающиеся с частицами. После этого SRP-частица диссоциирует от рибосомы, синтез пептидной цепи восстанавливается, и белок начинает по мере роста его цепи, ко-трансляционно, проходить через мембрану в полость цистерны ЭР. В процессе связывания рибосомы с мембраной ЭР принимают участие многие белки мембраны.

После того как синтезированный белок окажется в полости ЭР, происходит ферментативное отщепление «сигнального конца», приводящее к «созреванию» белка. По окончании синтеза полипептидной цепи в вакуоле гранулярного ЭР оказывается белковая молекула, потерявшая в результате процесса созревания (сходного с «процессингом» РНК) до двух десятков N-концевых аминокислот. Когда рибосома закончит считывание иРНК и произойдет освобождение C-концевых последовательностей цепи, она теряет связь с мембраной и диссоциирует на две субъединицы, готовые принять участие в синтезе новой белковой цепи. Конечно, с иРНК связывается не одна рибосома, а последовательно около десятка, т. е. полисома, поэтому весь комплекс (рибосомы, синтезирующиеся белки и иРНК) прочно удерживается на мембране ЭР.

Большинство белков, синтезированных в гранулярном ЭР, относится к гликопротеидам. Связывание синтезирующейся белковой цепи с олигосахаридами (гликозилирование) происходит также ко-трансляционно. При этом на белковую молекулу переносится готовый блок олигосахаридов, который связывается с аспарагиновыми остатками белковой молекулы (рис. 4). 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 ЭР. По мере транслокации белковой цепи во время ее синтеза каждый аспарагиновый остаток связывается с олигосахаридным комплексом с помощью фермента, являющегося интегральным белком мембран ЭР. Свободные

секреторные белки, попадая в просвет вакуолей ЭР, претерпевают дальнейшую модификацию: теряют три глюкозных остатка и одну маннозу. После этого они транспортируются в аппарат Гольджи. В дальнейшем эти белки могут выводиться из клетки в процессе секреции или же попадать в лизосомы и участвовать во внутриклеточном расщеплении биополимеров.

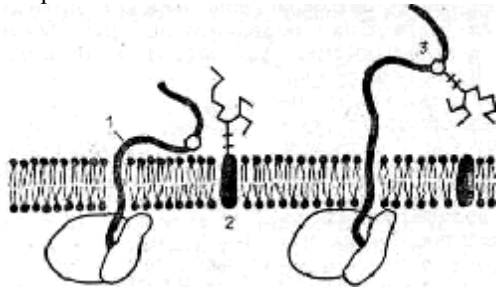


Рис. 4. Первичное гликозилирование белков в ЭПР. 1 — синтезирующийся полипептид; 2 — гликолипид; 3 — перенос олигосахарида на аспарагин синтезирующегося полипептида

Синтез клеточных мембран

На рибосомах ЭР синтезируется также основная часть мембранных белков клетки. По мере синтеза мембранные белки, в отличие от синтеза секреторных, не освобождаются от мембран, а остаются в их составе, становясь, таким образом, или трансмембранными интегральными белками, или полуинтегральными (рис. 5). Эти белки также подвергаются модификациям: они могут терять сигнальный конец и обычно гликозилируются также по мере роста белковой цепи.

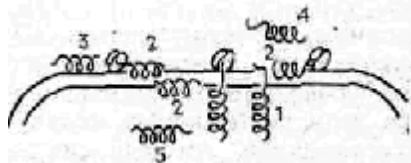


Рис. 5. Схема синтеза различных клеточных белков на рибосомах ЭПР. 1 — интегральные белки мембран; 2 — полуинтегральные мембранные белки; S — белки, ассоциированные с мембраной; 4 — белки гиалоплазмы; 5 — секреторные белки

белков и покрыт 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 вирус развивается: по мере выхода вируса из клетки образуется вырост плазматической мембраны, напоминающий короткую микроворсинку, куда включается рибонуклеопротеидный комплекс (РНП) нуклеоид вируса. Затем вырост 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.

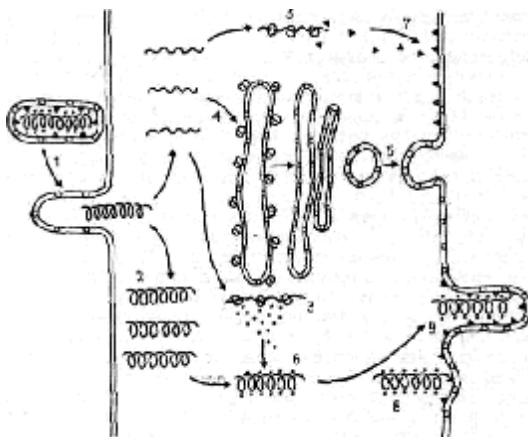


Рис. 6. Схема развития вируса везикулярного стоматита (VSV) в инфицированной клетке. 1 — вхождение вирусной РНК в клетку; 2 — репликация вирусной РНК и образование информационных РНК; 3 — синтез М- и N-белков на рибосомах цитозоля; 4 — синтез G-белка в ЭПР; 5 — G-белок на пути к плазматической мембране; 6 — связывание N-белка с вирусной РНК; 7 — связывание M-белка с плазматической мембраной; 8, 9 — образование новой вирусной частицы и выход ее из клетки

Сегодня можно сказать что важнейшей функцией гранулярного ЭР, вне зависимости от специализации или таксономической принадлежности клеток, является функция образования, построения клеточных мембран. Элементы гранулярного ЭР синтезируют все мембранные белки и липидный компонент мембран. Кроме того, именно в гранулярном ЭР происходит сборка липопротеидных мембран. Этот процесс хорошо прослежен и проанализирован на примере образования вируса везикулярного стоматита (VSV) (рис. 6). Этот РНК-содержащий вирус построен из небольшого числа

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, или G-белок, — интегральный белок мембраны, окружающий зрелую вирусную частицу. Q-белок состоит из 550 аминокислот и имеет две боковые полисахаридные цепи. Он асимметрично расположен в мембране: большая его часть вместе с углеводными цепочками выступает наружу, а 30 аминокислот локализованы с цитоплазматической стороны мембраны. При заражении клеток VSV с молекулы его РНК считается плоть разных иРНК, с помощью которых на рибосомах клетки синтезируются вирусные белки. 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 также начинается с синтеза «сигнальной» аминокислотной последовательности, которая проходит сквозь мембрану и как бы тянет за собой остальную растущую цепь аминокислот.

Однако в отличие от секреторных белков G-белок остается связанным с мембраной ЭР. Большая его часть находится в просвете цистерн ЭР, где она принимает специфическую конформацию и присоединяет два первичных участка углеводных цепей. Дальнейшая судьба G-белка хорошо известна: через 20—30 мин после синтеза он обнаруживается в составе интегральных белков мембран аппарата Гольджи, где происходит дополнительный рост его углеводных цепей. Позже этот белок обнаруживают в составе интегральных белков плазматической мембраны.

Из приведенных экспериментов следует, что интегральные белки мембран эндоплазматического ретикулаума, мембран аппарата Гольджи, секреторных вакуолей и плазматической мембраны имеют одно происхождение: они синтезируются и встраиваются в мембрану в гранулярном ЭР.

Более того, было показано, что и липидный компонент различных мембран синтезируется и встраивается в мембрану в гранулярном ЭР. В мембранах ЭР локализованы ферменты синтеза фосфолипидов, который происходит на цитоплазматической стороне мембраны. Включенные в мембрану новые липиды располагаются на ее цитоплазматической стороне. Для их переноса на другую сторону мембраны необходимо участие специальных белков-транслокаторов («флиппаз»).

Следовательно, гранулярный эндоплазматический ретикулум представляет собой настоящую «фабрику» клеточных мембран. От того, какие интегральные и периферические белки будут синтезироваться на рибосомах ЭР и какие фосфолипиды будут включаться в мембрану, зависит тип образующегося нового участка мембраны: будет ли он компонентом гладкого ЭР, мембран аппарата Гольджи, лизосомы, или плазматической мембраны.

Секреция белков и образование мембран у бактерий

В принципе рост плазматической мембраны и ее производных у бактерий происходит тем же образом, что и образование мембран у эукариотических клеток.

Как известно, синтез белков у бактерий осуществляется на 70S рибосомах, которые так же, как и у клеток высших организмов, имеют двоякую локализацию. Большая часть рибосом бактериальных клеток образует полисомы в цитоплазме, около 25% рибосом связано с плазматической мембраной. Такие рибосомы участвуют в синтезе как мембранных, так и экскретируемых белков. Многие бактериальные клетки получают питательные вещества за счет деградации полимеров около бактериальной поверхности. Для этого бактерии должны выделять гидролизующие ферменты в окружающую среду. Это происходит намного проще, чем у эукариотических клеток: часть рибосом, локализованных на внутренней (цитоплазматической) поверхности плазматической мембраны, синтезирует белки, которые, подобно секреторным белкам, проходят через мембрану и оказываются вне клетки. Выделенные гидролазы застревают в компонентах муреиновой бактериальной стенки и там функционируют. На других рибосомах, связанных с мембранами, синтезируются белки, необходимые для построения самой мембраны, подобно тому, как это происходит в гранулярном ЭР эукариотических клеток. Так что в этом отношении бактерию можно уподобить вакуоли гранулярного ЭР, как бы вывернутой наизнанку.

На примере бактерий хорошо изучен путь синтеза липидных компонентов мембран. Так, было найдено, что фосфоти-дилэтаноламин синтезируется с помощью ферментов, являющихся интегральными белками плазматической мембраны, активные участки которых находятся на цитоплазматической стороне мембраны. Синтезированные здесь липиды встраиваются во внутренний липидный слой. Оказалось, что новосинтезированные липиды довольно быстро обнаруживаются и во внешнем слое мембраны.

Занятие 9. Аппарат Гольджи. Лизосомы. АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

Многие выделяемые из клеток вещества, такие, как белки, липопротеиды, стероиды, синтезируются и накапливаются в элементах эндоплазматического ретикулаума. Однако выведение их за пределы клетки (экзоцитоз) происходит с участием другой мембранной органеллы — **аппарата Гольджи** (АГ), также характерной для всех эукариотических клеток.

В 1898 г. К. Гольджи, используя свойства связывания тяжелых металлов (осмия или серебра) с клеточными структурами, выявил в нервных клетках сетчатые образования, которые он назвал «внутренним сетчатым аппаратом». Дальнейшее усовершенствование метода окраски металлами (импрегнации) дало возможность убедиться, что сетчатые структуры (аппарат Гольджи) встречаются во всех клетках животных 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; в других клетках это были отдельные темные участки в форме палочек зерен, вогнутых дисков и т. п., лежащие независимо друг от друга (**диктиосомы**) (рис. 1). Между сетчатой и диффузной формами АГ нет принципиального различия, так как часто в одних и тех же клетках наблюдается смена форм этого органоида. Элементы АГ часто связаны с вакуолями, что особенно характерно для секреторных клеток.

Морфология АГ меняется в зависимости от стадий клеточной секреции, что послужило основанием Д. Н. Насонову (1924) выдвинуть гипотезу о том, что этот органоид обеспечивает сепарацию и накопление веществ в самых различных клетках.

Долгое время в растительных клетках не удавалось обнаружить элементов аппарата Гольджи обычными методами микротехники. Однако с появлением метода электронной микроскопии элементы АГ были найдены во всех растительных клетках, где они располагались по периферии клетки.

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, однако детали такого увеличения пока неясны. Некоторые авторы предполагают, что элементы АГ могут возникать из мембран, отшнуровывающихся от ядерной оболочки.

Тонкое строение аппарата Гольджи

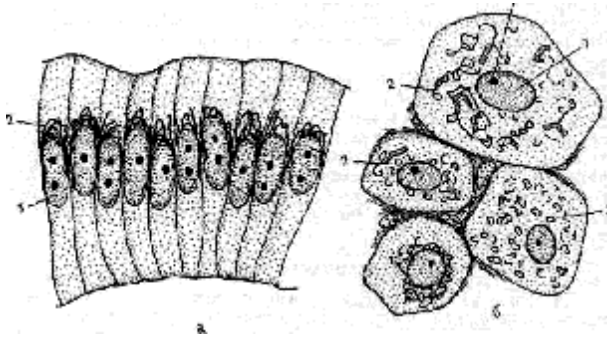


Рис. 1. Типы аппарата Гольджи.
а — сетчатый тип (клетки кишечного эпителия); б — диффузный тип (клетки нервного ганглия): 1 — ядро; 2 — АГ; 3 — ядрышко

Как показали электронно-микроскопические исследования, аппарат Гольджи представлен мембранными структурами, собранными вместе в небольшой зоне. Отдельная зона скопления этих мембран является **диктиосомой** (рис. 2). В диктиосоме плотно друг к другу (на расстоянии 20—25 нм) расположены в виде стопки плоские мембранные мешки, или цистерны, между которыми находятся тонкие прослойки гиалоплазмы. Каждая отдельная цистерна имеет диаметр около 1 мкм и переменную толщину; в центре мембраны могут быть сближены (25 нм), а на периферии иметь расширение (ампулы), ширина которых непостоянна. Количество мешочков в стопке обычно не превышает 5—10, но у некоторых одноклеточных их число может достигать 20. Кроме плотно расположенных плоских цистерн в зоне АГ наблюдается множество вакуолей. Мелкие 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, между ними располагается средний участок (рис. 3).

В секретирующих клетках АГ обычно 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. К проксимальной части диктиосомы примыкает сетевидная, или губкообразная, система мембранных полостей. Считается, что эта система может представлять собой зону перехода элементов ЭР в зону аппарата Гольджи (рис. 4).

В средней части диктиосомы периферия каждой цистерны также сопровождается массой мелких вакуолей около 50 нм в диаметре. В дистальном, или транс- участке диктиосомы к последней мембранной плоской цистерне примыкает участок, состоящий из трубчатых элементов и массы мелких вакуолей, часто имеющих фибриллярную опушенность по поверхности со стороны цитоплазмы — это опущенные, или окаймленные, пузырьки такого же типа, как и окаймленные пузырьки при пиноцитозе. Здесь, в так называемой транс-сети аппарата Гольджи проходит 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 мегавольтовый 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 под световым микроскопом. В случае диффузной формы АГ каждый отдельный его участок представлен диктиосомой. У клеток растений преобладает диффузный тип организации АГ; обычно в среднем на клетку приходится около 20 диктиосом. 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.

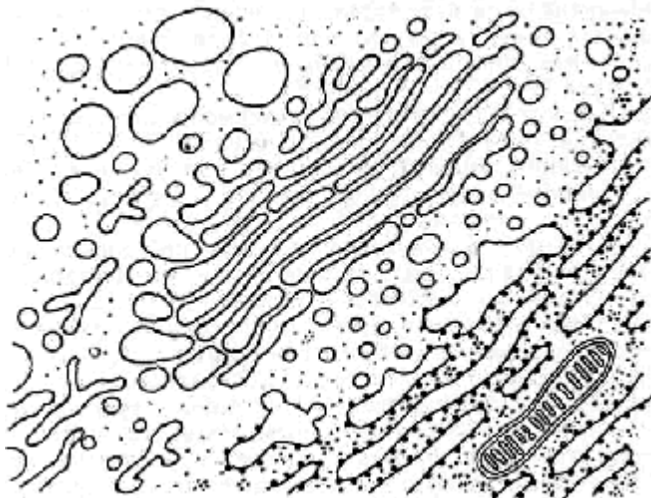


Рис. 2. Аппарат Гольджи на ультратонком срезе

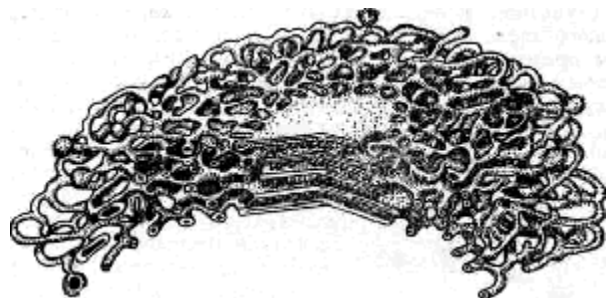


Рис. 4. Трехмерная реконструкция диктиосомы растительной клетки



Рис. 3. Схема строения диктиосомы. П — проксимальная (цис- часть); Д — дистальная (транс- часть); В — вакуоли; Ц — плоские мембранные цистерны; А — ампулярные расширения цистерн

Секреторная функция аппарата Гольджи

Мембранные элементы АГ участвуют в сегрегации и накоплении продуктов, синтезированных в ЭР, в их химических перестройках, созревании: это главным образом перестройка олигосахаридных компонентов гликопротеинов в составе водорастворимых секретов или в составе мембран.

В цистернах АГ происходит синтез полисахаридов, осуществляется их взаимосвязь с белками, приводящая к образованию мукопротеидов. Но главное, с помощью элементов аппарата Гольджи готовые секреты выводятся за пределы клетки. Кроме того, АГ является источником 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 состав белков зимогеновых гранул входят разнообразные ферменты: протеазы, липазы, карбогид-разы, нуклеазы. При секреции содержимое зимогеновых гранул выбрасывается из клеток в просвет железы, а затем перетекает в полость кишечника (рис. 5).

АГ является промежуточным звеном между собственно синтезом секретируемого белка и выведением его из клетки.

Синтезированный на рибосомах экспортируемый белок отделяется и накапливается внутри цистерн ЭР, по которым он транспортируется к зоне мембран АГ. Здесь от гладких участков ЭР отщепляются мелкие вакуоли, содержащие синтезированный белок, которые поступают в зону вакуолей в проксимальной части диктиосомы. В этом месте вакуоли могут сливаться друг с другом и с плоскими цис- цистернами диктиосомы. Таким способом белковый продукт переносится уже внутри полостей цистерн АГ.

По мере модификации белков в цистернах аппарата Гольджи, они с помощью мелких вакуолей переносятся от цистерны к цистерне в дистальную часть диктиосомы, пока не достигают трубчатой мембранной сети в транс- участке диктиосомы. Здесь мелкие пузырьки отщепляются и содержат 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 выбрасывания напоминает пиноцитоз, только с обратной последовательностью стадий. Он носит название **экзоцитоз**.

Механизмы, управляющие миграцией вакуолей от ЭР к зоне АГ и от этой зоны к плазматической мембране, еще неизвестны, ясно лишь, что они зависят от энергетических возможностей клетки: при подавлении синтеза АТФ процессы переноса вакуолей полностью прекращаются. Миграцию, перемещение секреторных вакуолей можно подавить, разрушая микротрубочки и сократимые микрофиламенты цитоплазмы. Это показывает, что движение вакуолей определяется цитоскелетными компонентами клеток (см. ниже).

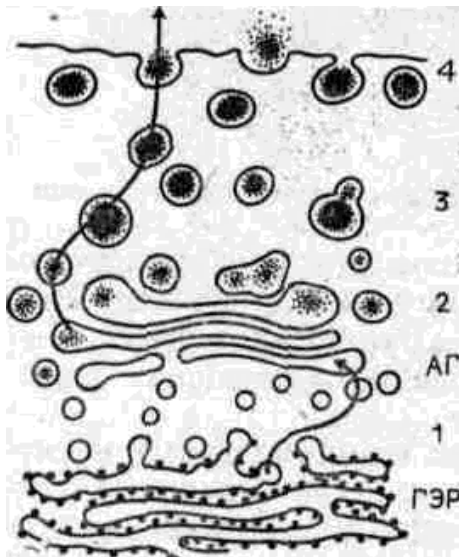


Рис. 5. Схема связи ЭР, аппарата Гольджи с образованием и выведением зимогена из зацинарных клеток поджелудочной железы. / — переходная зона между ЭР и АГ; 2 — зона созревания секреторных гранул; 3 — отделившиеся от АГ зимогеновые гранулы; 4 — их выход (экзоцитоз) за пределы клетки

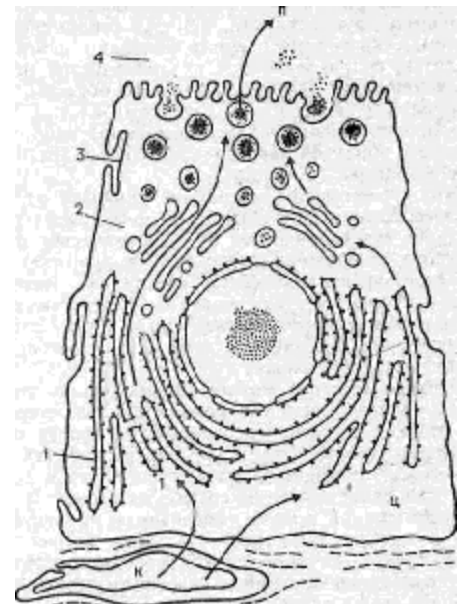


Рис. 6. Последовательность обнаружения (1, 2, 3, 4) метки от -лизина при синтезе и выведении белкового секрета из клетки поджелудочной железы. к — кровеносный капилляр; ак — цитоплазма клетки, п — просвет железы. Стрелки показывают путь миграции метки

Модификации белков в аппарате Гольджи

В цис-зону аппарата Гольджи синтезированные в ЭР 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. 7). В цис-цистернах АГ 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, фукозу и сиаловые кислоты. При этом возникает специальный комплекс олигосахаридов (см. рис. 7). Такие превращения олигосахаридов осуществляются с помощью ферментов — гликозилтрансфераз, входящих в состав мембран цистерн АГ. Так как каждая зона в диктиосоме имеет свой набор ферментов гликозилирования, то глико-протеиды 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-фосфатная 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.

В ряде специализированных клеток в аппарате Гольджи синтезируются собственно полисахариды.

В аппарате Гольджи растительных клеток синтезируются полисахариды матрикса клеточной стенки (гемицеллюлозы, пектины). Кроме того, диктиосомы растительных клеток участвуют в синтезе и выделении слизей и муцинов, в состав которых входят также полисахариды. Основной каркасный полисахарид растительных клеточных стенок, целлюлоза, синтезируются, как уже говорилось, на поверхности плазматической мембраны.

В аппарате Гольджи клеток животных синтезируются длинные неразветвленные полисахаридные цепи глюкозаминогликанов. Один из них, гиалуроновая кислота, входящая в состав внеклеточного матрикса соединительной ткани, содержит несколько тысяч повторяющихся дисахаридных блоков. Многие гликозаминогликаны ковалентно связаны с белками и образуют протеоглики (мукопротеины). Такие полисахаридные цепи модифицируются в АГ и связываются с белками, которые в виде протеогликанов секретируются клетками. В аппарате Гольджи происходит также сульфатирование глюкозаминогликанов и некоторых белков.

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 выходят 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 путей их следования.

В цис- и средних зонах диктиосом все эти белки идут вместе без разделения, они только раздельно модифицируются в зависимости от их олигосахаридных маркеров. Непосредственное 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. 8, 9).

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 АГ 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 pH внутри цистерн транс-сети. На мембранах эти М-6-Ф-рецепторные белки образуют кластеры — группы, которые концентрируются в зонах образования мелких пузырьков, покрытых клатрином.

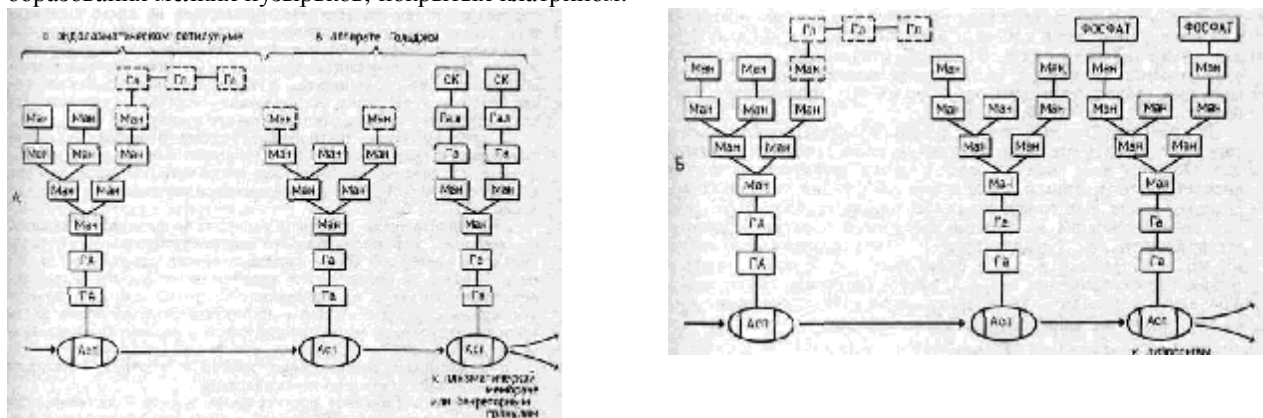


Рис. 7. Пути гликозилирования гликопротеидов в аппарате Гольджи. А — белки секреторных гранул и плазматической мембраны; Б — белки лизосом; Ман — манноза; Асп — аспарагин; Гл — глюкоза; СК — сиаловая кислота; ГА — N-ацетилглюкозамин; Гал — галактоза

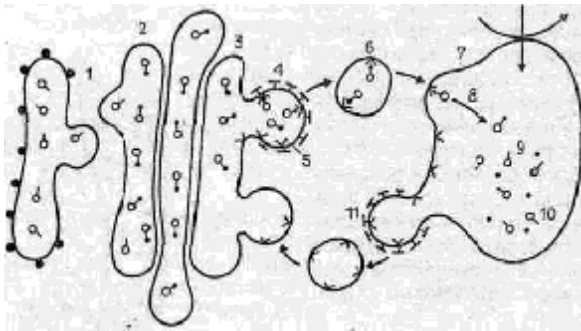


Рис. 8. Сортировка кислых гидролаз в аппарате Гольджи, поступление их в лизосомы и рециклизация рецепторов: 1 — поступление гидролаз из ЭПР; 2 — фосфорилирование; 3 — перенос в транс-сеть АГ; 4 — связывание с рецептором; 5 — клатриновая оболочка; 6 — первичная лизосома; 7 — объединение со вторичной лизосомой; 8 — диссоциация от рецептора; 9 — дефосфорилирование; 10 — активированная гидролаза; 11 — возврат (рециклизация) рецепторов

Вероятнее всего, часть белков, которые накапливаются в секреторных вакуолях и выводятся из клетки после поступления сигнала (например, нервного или гормонального), проходят такую же процедуру отбора (сортировки) на рецепторах трансцистерн аппарата Гольджи. Секреторные белки попадают сначала в мелкие вакуоли, тоже одетые клатрином, которые затем сливаются друг с другом. С секреторных вакуолей часто происходит агрегация накопленных белков в виде плотных секреторных гранул. Это приводит к повышению концентрации белка в вакуолях примерно в 200 раз по сравнению с его концентрацией в аппарате Гольджи. По мере накопления в секреторных вакуолях белки 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. Многие клетки постоянно выделяют белки, способствующие связыванию их с субстратами, постоянно к поверхности клетки идет поток мембранных пузырьков, несущих элементы гликокаликса и мембранных гликопротеидов. Поток выделяемых клеткой компонентов не подлежит сортировке в рецепторной транссистеме аппарата Гольджи. Первичные вакуоли этого потока также отщепляются от мембран АГ. По своей структуре они относятся к окаймленным вакуолям, но содержат не клатрин, а какой-то другой материал, связывающийся с цитоплазматической стороной мембраны (рис. 10).

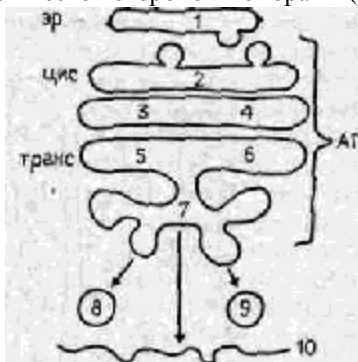


Рис. 9. Локализация ферментов модификации белков в аппарате Гольджи. / — синтез белка в ЭР; 2 — фосфорилирование лизосомных олигосахаридов; 3 — отщепление маннозы; 4 — присоединение N-ацетилглюкозамина; 5 — присоединение маннозы; 6 — присоединение сialовой кислоты; 7 — сортировка белков на рецепторах в транс-сети; 8 — лизосома; 9 — секреторная вакуоль; 10 — плазмалемма

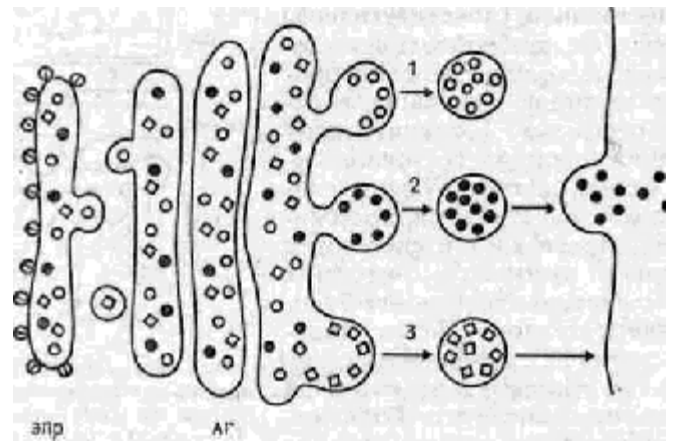


Рис. 10. Три потока транспорта белков через аппарат Гольджи. лизосомный поток; 2 — поток постоянной секреции; 3 — поток регулируемой секреции

ЛИЗОСОМЫ

Лизосомы в клетках не представляют собой самостоятельных структур. Они образуются за счет активности эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи и в этом отношении напоминают секреторные вакуоли. Основная их роль — участие в процессах внутриклеточного расщепления как экзогенных, так и эндогенных биологических макромолекул.

Наличие лизосом разного типа в клетках отражает процесс переноса гидролитических ферментов, необходимых для внутриклеточного расщепления экзогенных или эндогенных (аутофагоцитоз) полимеров. Это процесс секреции, но как бы направленный «внутри» клетки.

Сходство лизосомных вакуолей с секреторными находит свое отражение не только в общности 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. Так, у клеток гриба нейроспоры лизосомы, выбрасывая гидролазы из клетки, обеспечивают внеклеточный протеолиз. Возможно, что 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.

Общие характеристики лизосом.

Лизосомы как мембранные внутриклеточные частицы были открыты биохимиками (Де Дюв, 1955).

Фракции лизосом были выделены из клеток различных органов, в том числе из почек. Почечные лизосомы в клетках способны концентрировать введенные в организм чужеродные белки. Например, после инъекции пероксидазы чужеродные белки концентрировались вместе с гидролитическими ферментами во фракции изолированных лизосом. Из этих наблюдений напрашивался вывод, что лизосомы участвуют в переваривании и детоксикации чужеродных веществ, поглощаемых путем пиноцитоза и фагоцитоза.

Характерной чертой лизосом является то, 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 мембраны лизосом встроены белки переносчики, для транспорта из лизосомы в гиалоплазму продуктов гидролиза: мономеров расщепленных молекул — аминокислот, Сахаров, нуклеотидов, липидов. При ознакомлении с работой лизосом всегда возникает вопрос: почему же эти мембранные образования не переваривают сами себя? Вероятнее всего, мембранные элементы лизосом защищены от действия кислых гидролаз олигосахаридными участками, которые или не «узнаются» лизосомными ферментами, либо просто мешают гидролазам взаимодействовать с ними. Так или иначе мембранные компоненты лизосом очень устойчивы к гидролазам, содержащимся внутри лизосомных пузырьков.

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.

Во фракции лизосом встречаются пузырьки с гомогенным, бесструктурным содержанием, а также пузырьки, заполненные плотным веществом, содержащим в свою очередь вакуоли, скопления мембран и плотные однородные частицы. Внутри некоторых лизосом часто можно видеть не только участки мембран, но и фрагменты митохондрий и ЭР. Иными словами, эта фракция по морфологии оказалась крайне неоднородной, несмотря на постоянство присутствия гидролаз.

Морфологическая гетерогенность лизосом

Среди различных по морфологии лизосомных частиц можно выделить по крайней мере четыре типа: **первичные лизосомы, вторичные лизосомы, аутофагосомы и остаточные тельца** (рис. 11). 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 активную кислую фосфатазу — маркерный для лизосом фермент.



Рис. 11. Образование лизосом и их участие в клеточных процессах. / — синтез гидролитических ферментов в ЭР; 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 — телоллизосомы; 10 — экскреция остаточных телц; // — первичные лизосомы принимают участие в образовании аутофагосомы {12}

Эти мелкие вакуоли, первичные лизосомы, практически очень трудно отличить от мелких вакуолей на периферии зоны аппарата Гольджи. Часть из них несет клатриновую оболочку. Более того, вакуоли этой периферической части АГ также содержат кислую фосфатазу. Проследивая процесс синтеза и локализацию этого фермента в клетках, нашли, 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, 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 вследствие кислой среды внутри вторичной лизосомы. Уже свободный фермент после потери фосфатной группы активируется и начинает функционировать.

Освободившиеся мембранные рецепторы переходят в мелкие пузырьки, отщепляющиеся от вторичной лизосомы, и уходят снова в транс-участок аппарата Гольджи, т. е. происходит их рециклизация.

Лизосомы могут сливаться друг с другом и таким путем увеличиваться в объеме, при этом их внутренняя структура усложняется. Поглощенные биогенные вещества, попавшие в состав лизосомы, расщепляются гидролазами до мономеров, которые транспортируются через мембрану лизосомы в состав гиалоплазмы, где они реутилизируются, включаются в различные синтетические и обменные процессы.

Однако расщепление, переваривание биогенных макромолекул внутри лизосом может идти в ряде клеток не до конца. В этом случае в полостях лизосом накапливаются непереваренные продукты и вторичные лизосомы переходят в **телолизосомы**, или **остаточные тельца**. Остаточные тельца содержат меньше гидролитических ферментов, в них содержимое уплотняется и перестраивается. Часто в остаточных тельцах наблюдается вторичная структуризация непереваренных липидов, которые образуют сложные слоистые структуры. Там же откладываются пигментные вещества. У человека при старении организма в телолизосомах клеток мозга, печени и в мышечных волокнах накапливается «пигмент старения» — липофусцин.

Аутолизосомы (аутофагосомы) постоянно встречаются в клетках простейших, растений и животных. По 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 ЭР, рибосомы, гранулы гликогена и т. д.

Процесс аутофагоцитоза связан с отбором и уничтожением измененных, «сломанных» клеточных компонентов. В этом случае лизосомы выполняют роль внутриклеточных чистильщиков, контролируемых 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, при гормональной индукции активности клеток печени). Значительно возрастает число аутофагосом при различных повреждениях клеток: в этом случае аутофагоцитозу могут подвергаться целые зоны внутри клеток.

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 ЭР синтезируется тироглобулин, белок-предшественник тиреоидного гормона. Тироглобулин с помощью АГ выводится из клеток в полость фолликулов щитовидной железы. При гормональной стимуляции йодированный тироглобулин снова попадает в железистую клетку путем пиноцитоза. Пиноцитозные вакуоли, содержащие тироглобулин, сливаются с первичными лизосомами, ферменты которых вызывают частичный гидролиз тироглобулина. Гидролиз приводит к образованию тироксина — тиреоидного гормона, который затем выводится из клетки, секретуруется и попадает в кровеносное русло.

Лизосомные патологии

Увеличение числа лизосом в клетках при патологических процессах — обычное явление. На его основе возникло представление 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». Их отличительным признаком является множество вакуолей, что видно под световым микроскопом. Например, при болезни Помпе в лизосомах происходит накопление гликогена, где он не расщепляется из-за отсутствия у таких больных фермента кислой α -глюкозидазы. Многие «болезни накопления» возникают вследствие первичной генной мутации, приводящей к потере активности отдельных ферментов, участвующих в функционировании лизосом.

Сейчас известно уже более 25 таких генетических заболеваний, связанных с патологией лизосом.

Занятие 10. Митохондрии и пластиды.

Для осуществления любых клеточных функций необходимы затраты энергии. Живые организмы получают ее, используя или внешние источники, например энергию Солнца, или энергию переноса электронов при окислении различных субстратов. В обоих случаях клетки синтезируют молекулу АТФ (аденозинтрифосфат), некую разменную «топливную» единицу, обладающую 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. В клетках животных синтез АТФ осуществляется главным образом специальными органеллами, митохондриями; в растительных клетках кроме митохондрий в энергообеспечении огромную роль играют хлоропласты, один из видов пластид. Оба органоида имеют общий план строения и выполняют сходные функции.

Митохондрий и пластиды — двухмембранные органоиды эукариотических клеток. Общим в их строении является то, что они отделены от цитоплазмы (гиалоплазмы) двумя мембранами — внешней и внутренней. Поэтому у митохондрий и пластид различают две полости (или два пространства): одну — между внешней и внутренней мембранами (межмембранные) и вторую, основную (матрикс), ограниченную внутренней мембраной. Другой же общей чертой 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** для митохондрий, **фотофосфорилирование** для хлоропластов). В матриксе и тех и других располагаются элементы авторепродукции этих клеточных мембранных органелл и локализованы ферменты некоторых метаболических процессов.

Система апторепродукции двухмембранных органелл представлена ДНК, РНК и рибосомами, которые могут определять генетические, автономные свойства этих структур.

Главными функциями пластид и митохондрий являются процессы энергетического характера, приводящие к синтезу АТФ, доноров энергии для любых клеточных процессов, в том числе для фотосинтетических процессов, идущих в хлоропластах растений.

В митохондриях, хлоропластах, как и в бактериях, АТФ синтезируется одним и тем же способом: с помощью энергии, отдаваемой электронами при продвижении их по электронно-транспортной цепи белков внутренней мембраны, протоны переносятся, «перекачиваются» с внутренней стороны мембраны на внешнюю. Вследствие этого возникает электрохимический протонный градиент, энергия которого с помощью других белков используется для синтеза АТФ.

В хлоропластах растений, кроме того, при использовании энергии АТФ, образованной в результате фотофосфорилирования, проходит важнейший биологический процесс — связывание CO_2 и синтез углеводов.

Митохондрии.

Митохондрий как органеллы синтеза АТФ характерны, за малым исключением, для всех эукариотических клеток как ауотрофных (фотосинтезирующие растения), так и гетеротрофных (животные, грибы) организмов. Их основная функция связана с окислением органических соединений и использованием освобождающейся при распаде этих соединений энергии, при синтезе молекул АТФ.

Одноклеточные организмы часто имеют всего одну сильно разветвленную митохондрию. Так, у трипанозом выявляется одна гигантская митохондрия, имеющая сложную разветвленную форму.

Гигантские одиночные митохондрии были описаны для одноклеточных зеленых водорослей (*Polytomella*, *Engiena*, *Chlorella*). Длинные ветвящиеся митохондрии найдены

в клетках культуры ткани млекопитающих, в клетках многих растений как в нормальных, так и в анаэробных условиях. В последнее время для изучения свойств митохондрии стал широко применяться флуорохром родамин. Этот краситель обладает способностью люминесцировать в фиолетовом свете, если он связывается с мембранами активных митохондрий. При этом в люминесцентном микроскопе видна единая митохондриальная система — митохондриальный ретикулум.

Обычные 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 (300000) и у гигантской амебы *Chaos chaos* (до 500000).

В клетках зеленых растений число митохондрий меньше, чем в клетках животных, так как часть их функций могут выполнять хлоропласты.

В некоторых клетках, например в сперматогониях, митохондрий могут сливаться друг с другом, образуя одну гигантскую митохондрию (хондросферу). В спермиях млекопитающих часто присутствуют гигантские митохондрии, спирально закрученные вокруг осевой части жгутика (рис. 1).

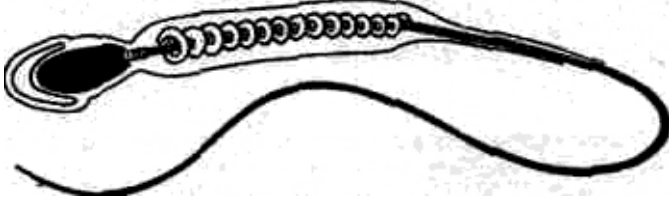


Рис. 1. Спиральные митохондрии чехлика хвоста спермия



Рис. 2. Схема общей организации митохондрий. 1 — внешняя мембрана; 2 — внутренняя мембрана; 3 — впячивания митохондрий у кишечных энтамеб, живущих в условиях анаэробноза, и у некоторых других паразитических простейших.

Обычно митохондрий скапливаются вблизи тех участков цитоплазмы, где возникает потребность в АТФ, образующейся в митохондриях. Так, в скелетных мышцах митохондрий находятся вблизи миофибрилл. В сперматозоидах они образуют спиральный футляр вокруг оси жгутика, что, вероятно, связано с необходимостью использования АТФ для движения хвоста сперматозоида.

Ультраструктура митохондрий

Митохондрии ограничены двумя мембранами (рис. 2). Наружная 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. Толщина этой мембраны около 7 нм; она не бывает связана ни с какими другими мембранами цитоплазмы и замкнута сама на себя, так что представляет собой мембранный мешок. Наружную 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. Характерной чертой внутренних мембран митохондрии является их способность образовывать многочисленные впячивания внутрь митохондрии. Такие впячивания чаще всего имеют вид плоских гребней, или крист.

У простейших, одноклеточных водорослей, в некоторых клетках высших растений и животных выросты внутренней мембраны имеют вид трубок (трубчатые кристы).

Функции митохондрии

Митохондрии осуществляют синтез АТФ, в основе которого лежат процессы окисления органических субстратов и фосфорилирования АДФ. В клетках окисление и выделение энергии, освобождающейся в результате этого процесса, проходят в несколько взаимосвязанных этапов.

Освободившиеся при окислении в цикле Кребса электроны, акцептированные на коферментах, переносятся 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. 3). Существуют три главных ферментных комплекса. Первый, NADH-дегидрогеназный комплекс принимает электроны от NADH и переносит их во второй комплекс — комплекс b—c₁, который в свою очередь переносит их на цитохромоксидазный комплекс, последний передает электроны на кислород, в результате чего образуется вода. На этом процесс окисления заканчивается.

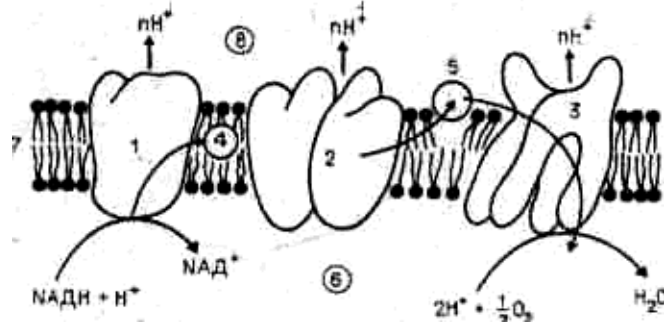


Рис. 3. Поток электронов через три главных ферментативных комплекса при переносе электронов от NADH к O₂
1 — NADH-дегидрогеназный комплекс; 2 — в с₁-комплекс; 3 — цитохром-оксидазный комплекс; 4 — убихинон; 5 — цитохром с; 6 — матрикс митохондрий; 7 — внутренняя митохондриальная мембрана; 8 — межмембранное пространство

Окисление исходного субстрата заканчивается выделением CO₂ и воды, но при этом не выделяется тепловая энергия как при горении, а образуются молекулы АТФ. Во внутренних митохондриальных мембранах, на поверхностях, смотрящих в матрикс, располагаются крупные белковые комплексы, ферменты, **АТФ-синтетазы**, которые синтезируют АТФ, используя энергию градиента протонов на внутренней мембране митохондрий.

Увеличение числа митохондрий

Как и другие органеллы цитоплазмы, число митохондрий может увеличиваться, что особенно заметно при делении клеток или при увеличении их функциональной нагрузки. Более того, митохондрий постоянно обновляются. Так, в клетках печени средняя продолжительность жизни митохондрий составляет около 10 дней.

Основная масса экспериментальных данных говорит о том, что число митохондрий увеличивается путем роста и деления предшествующих митохондрий.

Хлоропласты.

Строение хлоропластов в целом напоминает строение митохондрий. В хлоропластах происходят фотосинтетические процессы, в результате которых связывается углекислота, выделяется кислород и синтезируются сахара.

Для хлоропластов характерно наличие пигментов хлорофиллов, которые обуславливают окраску зеленым растениям. При помощи хлорофилла зеленые растения поглощают энергию солнечного света и превращают ее в химическую.

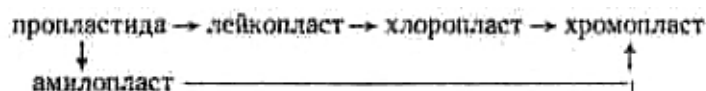
Биохимические исследования показали, что процесс фотосинтеза протекает в две фазы: световую и темновую. В первую фазу, протекающую только на свету, молекула хлорофилла поглощает квант света и запускается фотохимическая реакция (реакция Хилла). Во второй фазе, которая может идти в темноте, происходят фиксация и восстановление CO₂, приводящее к синтезу углеводов.

Онтогенез и функциональные перестройки пластид

Многих исследователей занимал вопрос о путях образования пластид.

Еще в конце прошлого столетия было найдено, что у нитчатой зеленой водоросли спирогиры деление клеток при вегетативном размножении сопровождается делением их хроматофора путем перетяжки.

У высших растений также встречается деление зрелых хлоропластов, но очень редко. Увеличение числа хлоропластов и образование других форм пластид (лейкопластов и хромопластов) следует рассматривать как путь превращения структур-предшественников, пропластид. Весь же процесс развития различных пластид можно представить в виде монотропного (идущего в одном направлении) ряда смены форм:



Во многих исследованиях был установлен необратимый характер онтогенетических переходов пластид. У высших растений возникновение и развитие хлоропластов происходят через изменения пропластид.

Пропластиды представляют собой мелкие (0,4—1 мкм) двухмембранные пузырьки, внутреннее строение которых не имеет каких-либо отличительных черт. Пропластиды чаще всего встречаются в делящихся тканях растений (в клетках меристемы корня, листьев, в точках роста стеблей и др.). По всей вероятности, их число увеличивается путем деления.

Судьба пропластид зависит от условий развития растений. При нормальном освещении они превращаются в хлоропласты.

При развитии в темноте у проростков вначале увеличивается объем пластид (этиопластов), но система внутренних мембран не строит ламеллярные структуры, а образует массу мелких пузырьков, которые скапливаются в отдельные зоны и даже могут формировать сложные решетчатые структуры. В мембранах этиопластов содержится протохлорофилл, предшественник хлорофилла желтого цвета. Под действием света из этиопластов образуются хлоропласты, протохлорофилл превращается в хлорофилл, синтезируются новые мембраны, фотосинтетические ферменты и компоненты цепи переноса электронов.

При освещении клеток мембранные пузырьки и трубочки быстро реорганизуются, из них развивается полная система ламелл и тилакоидов, характерная для нормального хлоропласта

Лейкопласты отличаются от хлоропластов отсутствием развитой ламеллярной системы. Встречаются они в клетках запасующих тканей. Из-за их неопределенной морфологии лейкопласты трудно отличить от пропластид, а иногда и от митохондрий. Они, как и пропластиды, бедны ламеллами, но тем не менее способны к образованию под влиянием света нормальных тилакоидных структур и к приобретению зеленой окраски. В темноте в проламеллярных телах лейкопластов могут накапливаться различные запасные вещества, а в строме лейкопластов откладываются зерна вторичного крахмала. Если в хлоропластах откладывается так называемый транзитный крахмал, который присутствует здесь лишь во время ассимиляции CO₂, то в лейкопластах может происходить истинное запасание крахмала. В некоторых тканях (в эндосперме злаков, в корневищах и клубнях) накопление крахмала в лейкопластах приводит к образованию **амилопластов**, строма которых сплошь заполнена гранулами запасного крахмала.

Другой формой пластид у высших растений является **хромопласт**, окрашивающийся обычно в желтый цвет в результате накопления в нем каротиноидов. Хромопласты образуются из хлоропластов и значительно реже из лейкопластов (например, в корне моркови). Процесс обесцвечивания и изменения хлоропластов легко наблюдать при развитии лепестков или при созревании плодов. При этом в пластидах могут накапливаться окрашенные в желтый цвет капельки (глобулы) или в них появляются тела в форме кристаллов. Эти процессы сопряжены с постепенным уменьшением числа мембран в пластиде, с исчезновением хлорофилла и крахмала. Образование окрашенных глобул объясняется тем, что при разрушении ламелл хлоропластов выделяются липидные капли, в которых хорошо растворяются различные пигменты (например, каротиноиды). Таким образом, хромопласты представляют собой дегенерирующие формы пластид, подвергнувшиеся липофанерозу — распаду липопротеидных комплексов.

Занятие 11. Микрофиламенты. Микротрубочки. Промежуточные филаменты. Клеточный центр. Двигательный аппарат бактерий.

Цитоскелет является опорно-двигательной системой клеток. Цитоскелетные компоненты представлены нитевидными, неветвящимися белковыми комплексами, или филаментами (тонкими нитями). Существуют три системы филаментов, различающихся по химическому составу, ультраструктуре и функциональным свойствам. Самые тонкие нити — это **микрофиламенты**; их диаметр составляет около 6 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 и 25 нм), образующиеся из разных, но родственных белков (рис. 1).

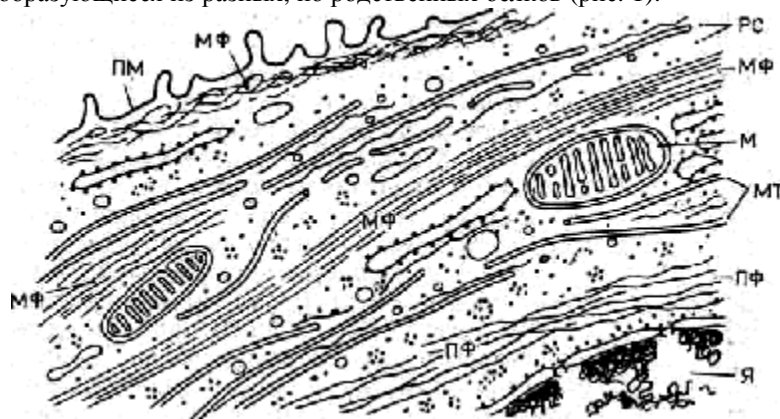


Рис. 1. Цитоскелетные компоненты клеток.

МФ — микрофиламенты, ПФ — промежуточные филаменты; МТ — микротрубочки, ПМ — плазматическая мембрана, Я — ядро, РС — рибосомы, М — митохондрии

Все фибриллярные структуры могут участвовать в качестве составных частей в процессах физического перемещения клеточных компонентов или даже целых клеток, кроме того, они же в ряде случаев исполняют сугубо каркасную скелетную роль. Элементы цитоскелета встречаются во всех без исключения эукариотических клетках; у прокариотов их нет. Степень выраженности цитоскелета в разных клетках может быть различной. Так, например, клетки эпидермиса кожи особенно богаты промежуточными филаментами, мышечные клетки — актиновыми микрофиламентами, очень много микротрубочек в пигментных клетках, меланоцитах.

МИКРОФИЛАМЕНТЫ. АКТИНОВЫЕ МИКРОФИЛАМЕНТЫ

Актиновые микрофиламенты встречаются во всех клетках эукариотов. Особенно они обильны в высокоспециализированных **мышечных волокнах** в клетках, выполняющих функции сокращения мышц. Актиновые филаменты входят также в состав специальных клеточных компонентов, таких, как **микроворсинки**, **ленточные соединения** эпителиальных клеток, в состав **стереоцилий чувствительных клеток**. Актиновые микрофиламенты образуют пучки в цитоплазме подвижных клеток животных и слой под плазматической мембраной — **кортикальный слой**. У многих растительных клеток и клеток низших грибов они располагаются в слоях движущейся цитоплазмы.

Основной белок микрофиламентов — **актин**. Этот белок имеет молекулярный вес около 42 тыс. и в мономерной форме имеет вид глобулы (G-актин). При его полимеризации образуется тонкая фибрилла (F-актин) толщиной 6 нм, представляющая собой пологую спиральную ленту (рис. 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 («плюс»-конец микрофиламента) и поэтому растет быстрее, чем противоположный («минус»-конец). Если концентрация G-актина недостаточна, то образовавшиеся фибриллы F-актина начинают разбираться.

В растворах, содержащих так называемую критическую концентрацию G-актина, устанавливается динамическое равновесие между полимеризацией и деполимеризацией, в результате чего длина фибриллы F-актина будет постоянна. 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.

В живых клетках такая, казалось бы, неустойчивая фибриллярная система стабилизируется массой специфических белков, ассоциирующих с F-актином. Так белок- **тропомиозин**, взаимодействуя и микрофиламентами, придает им необходимую жесткость. Целый ряд белков, например **филамин** и α -ак-тинин, 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 разборку, стабилизируют их. Особую роль при взаимодействии с актином играют белки **миозинового типа**, которые образуют вместе с актином комплекс, способный к сокращению при расщеплении АТФ (см. ниже).

Мышечные клетки

Специализированные мышечные клетки многоклеточных животных организмов имеют в цитоплазме сократимые фибриллы — **миофибриллы**. В скелетной* и сердечной мускулатуре миофибриллы имеют характерную особенность: они выглядят исчерченными, или поперечнополосатыми (отсюда и название — поперечнополосатая мышечная ткань) (рис. 3). Под световым микроскопом видно, что пучки миофибрилл окрашиваются по длине неравномерно: хорошо видно чередование равных по длине темных и светлых участков. Темные участки называются анизотропными дисками (А-диски), а светлые — изотропными (I-диски). Светлый I-диск пересекается полоской Z. Единицей строения и функционирования является **саркомер** — участок между двумя Z-дисками.

* Скелетные мышцы позвоночных состоят не из отдельных клеток, а из мышечных волокон, симпластов, образовавшихся за счет слияния мышечных клеток — миобластов.

Была выяснена химическая природа всех компонентов миофибрилл. Тонкие нити состоят в основном из белка актина, а толстые — из белка **миозина**. В состав Z-дисков входят белок α -актинин и десмин. В тонких нитях кроме актина находятся белки тропомиозин и тропонин.

Миозин в составе 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 концами длинных цепей и образуют глобулярные «головки». Последние обладают АТФазной активностью, могут реагировать с фибриллярным актином, образуя актомиозиновый комплекс, способный к сокращению. Толщина миозиновых фибрилл связана с тем, что длинные (150, им) молекулы миозина агрегируют так, что образуют пучки, в которые входит около 300 таких молекул. В миозиновых толстых (16 нм) протофибриллах

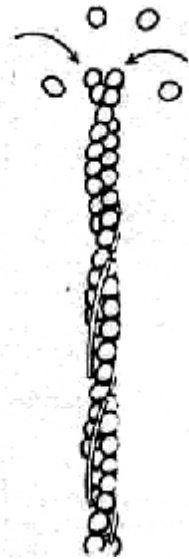


Рис. 2. Актиновый микрофиламент поляризован: на его плюс-конце полимеризация происходит быстрее

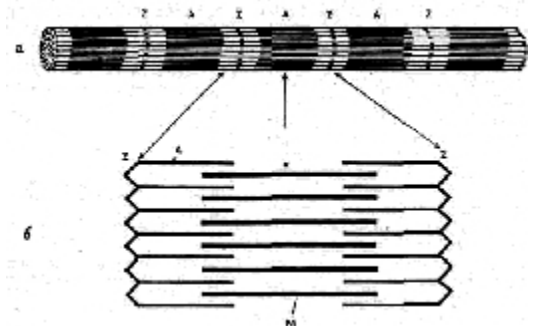


Рис. 3. Строение миофибрилл поперечнополосатой мышечной ткани. а — строение одиночной миофибриллы; б — схема строения саркомера: А — актиновые (тонкие) протофибриллы; At — миозиновые (толстые) протофибриллы; Z — диск, содержащий α -актинин

длинные молекулы лежат «хвост к хвосту» так, что головки миозина располагаются на концах нитей, в средней их части головок нет (рис. 4). Головки образуют поперечные мостики, связывающие между собой актиновые и миозиновые нити (рис. 5).

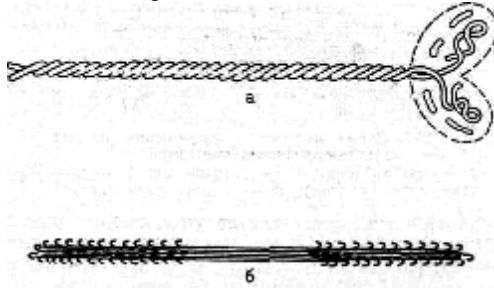


Рис. 4. Молекула миозина (а) и миозиновый протофиламент (б)

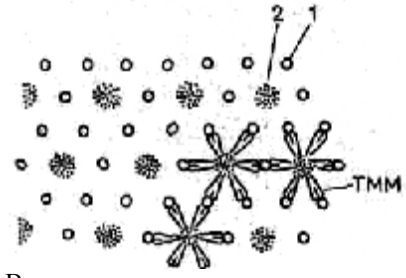


Рис. 5. Взаимное расположение актиновых (1) и миозиновых (2) молекул в анизотропной области саркомера. ТММ — головки миозина

За счет такой связи головок миозина с актином возникают актомиозиновые комплексы, АТФазная активность которых в сотни раз выше, чем у одних миозинов.

Актиновые протофибриллы связаны на одном конце с Z-диском, который состоит из палочковидных, биполярных молекул белка α -актинина, связывающего актиновые фибриллы в пучки. С двух сторон к Z-диску прикрепляются плюс-концы актиновых нитей соседних саркомеров. Функция Z-дисков заключается как бы в связывании соседних саркомеров друг с другом: Z-диски не являются сократимыми структурами.

В мышце нет сокращающихся, уменьшающих свою длину молекул. Сокращение происходит за счет уменьшения расстояния между Z-дисками, 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 толстых и тонких нитей. При этом толстые миозиновые нити как бы входят 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. 6).

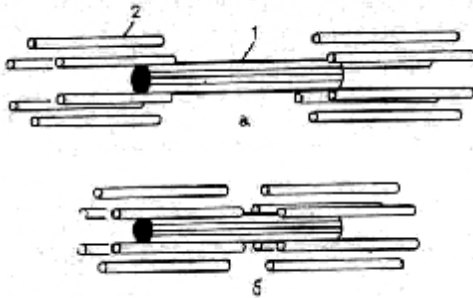


Рис. 6. Схема мышечного сокращения за счет взаимного скольжения нитей. а — расслабление; б — сокращение: 1 — толстые нити (миозин); 2 — тонкие нити (актин)

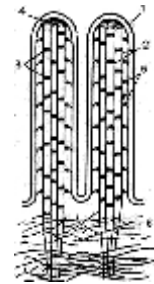


Рис. 7. Строение микроворсинки. 1 — плазматическая мембрана; 2 — актиновые микрофиламенты; 3 — белки, связывающие актин в пучки (фимбрин, фасцин); 4 — аморфная «шапочка»; 5 — латеральные ручки, минимиозин; 6 — спектриновая терминальная сеть; 7 — слой промежуточных филаментов

Актиновые компоненты неммышечных клеток

Фибриллярные структуры толщиной 7—9 нм с помощью электронного микроскопа наблюдаются практически в любых клетках. Как уже было сказано, микрофиламенты содержат актин и другие белки. Микрофиламенты во всех неммышечных клетках могут осуществлять по крайней мере два рода функций: быть частью сократимого аппарата, подобно тому, что наблюдается в мышечных клетках, и участвовать в формировании жестких скелетных структур или образовывать жесткую фибриллярную сеть.

Многие эпителиальные клетки, особенно выстилающие внутренние органы, на своей свободной поверхности, смотрящей в полость, покрыты выростами плазматической мембраны — **микроворсинками**, значительно увеличивающими площади для всасывания, например в кишечнике и почках. Микроворсинки представляют собой тонкие (0,1 мкм) и длинные (около 1 мкм) выросты, тесно расположенные друг около друга, наподобие густой щетки, покрывающей всю поверхность клетки, смотрящую в просвет кишечника. На каждой клетке кишечного эпителия насчитывается несколько тысяч микроворсинков, что позволяет увеличить всасывающую поверхность в десятки раз (рис. 7). Внутри каждой микроворсинки располагается плотный пучок из 20—30 актиновых микрофиламентов. Актиновые нити закреплены своими плюс-концами на вершине микроворсинки. Жесткость всего пучка определяется рядом белков, связывающих актин поперечными связками, **фимбрином и фасцином**. Нижняя часть актинового пучка вплетена в сеть из молекул **спектрина**, примембранного белка.

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.

Особенно много сведений о цитоскелете и о микрофиламент-тах получено при изучении фибробластов в культуре ткани, обладающих способностью к амeboидному 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. 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, который и обеспечивает движение фибробласта вперед (рис. 8, 9).

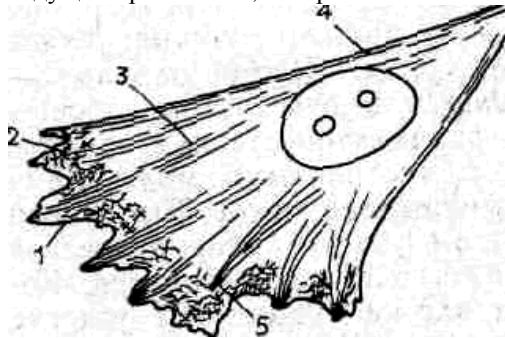


Рис. 8. Микрофиламенты поляризованного движущегося фибробласта. 1 — ламеллоподии движущегося края; 2 — сеть актиновых микрофиламентов ламеллы; 3 — пучки микрофиламентов; 4 — микрофиламенты кортикального слоя; 5 — фокальный контакт

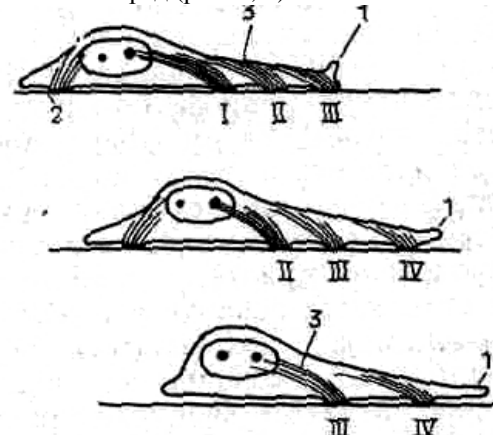


Рис. 9. Перемещение фибробласта по субстрату. 1 — ламеллоподии; 2 — фокальный контакт; 3 — пучок микрофиламентов

МИКРОТРУБОЧКИ

Одним из обычных компонентов цитоскелета эукариотов являются микротрубочки. Это нитчатые неветвящиеся структуры толщиной 25 нм, состоящие из белков-тубулинов и ассоциированных с ними белков. Тубулины микротрубочек при полимеризации образуют полые трубки, отсюда и их название. Длина микротрубочек может достигать нескольких микрометров; самые длинные микротрубочки встречаются в составе аксономы хвостов спермиев. Микротрубочки встречаются в цитоплазме интерфазных клеток, где они располагаются поодиночке или небольшими рыхлыми пучками либо в виде плотноупакованных микротрубочек в составе центриолей, базальных телец, в ресничках и жгутиках. При делении клеток большая часть микротрубочек входит в состав веретена деления.

В морфологическом отношении микротрубочки представляют собой длинные полые цилиндры с внешним диаметром 25 нм (рис. 10). Стенка микротрубочек состоит из полимеризованных молекул белка **тубулина**. При полимеризации молекулы тубулина образуют 13 продольных протофиламентов, которые скручиваются в полую трубку. Диаметр глобулы мономера тубулина составляет около 5 нм, что равно толщине стенки микротрубочки, в поперечном сечении которой видны 13 глобулярных молекул.

Молекула тубулина представляет собой гетеродимер, состоящий из двух разных субъединиц — из α - и β -тубулина, которые при ассоциации образуют собственно белок тубулин, изначально поляризованный. При полимеризации молекулы тубулина объединяются таким образом, что с α -субъединицей одного белка ассоциирует β -субъединица следующего белка и т. д. Следовательно, отдельные протофибриллы возникают как полярные нити; вся микротрубочка тоже является полярной структурой, имеющей растущий плюс-конец и медленно растущий минус-конец. При достаточной концентрации белка полимеризация происходит спонтанно, для чего не требуется АТФ, но при спонтанной полимеризации тубулинов гидролизуется одна молекула ГТФ, связанная с тубулином. Во время наращивания длины микротрубочки связывание тубулинов происходит с большей скоростью на растущем плюс-конце. При недостаточной концентрации тубулина микротрубочки могут разбираться с обоих концов. Разборке микротрубочек способствуют понижение температуры и наличие ионов Ca^{2+} .

Строение и движение ресничек

Многие клетки различных организмов имеют специальные органы движения — реснички и жгутики. Под световым микроскопом эти структуры видны как тонкие выросты клетки. Различий в тонкой организации ресничек и жгутиков нет, их толщина составляет около 300 нм (0,3 мкм). Эти структуры характерны для животных организмов, где они встречаются в клетках ресничного эпителия (эпителий трахеи, некоторые отделы половых трактов) и у мужских половых клеток, где сперматозоиды имеют один жгутик. Кроме того, реснички и жгутики встречаются у многих простейших (жгутиковых, инфузорий, корненожек), они обнаружены у подвижных зооспор водорослей, мхов, папоротников, низших грибов, миксо-мицетов.

При движении ресничек и жгутиков их длина не уменьшается, поэтому неправильно называть это движение сокращением. Траектория движения ресничек очень разнообразна (рис. 11, 12).

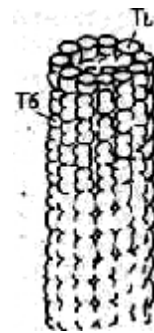


Рис. 10. Строение микротрубочки Тб — субъединица, димер тубулина

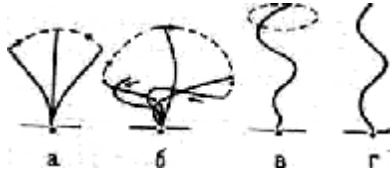


Рис. 11. Траектории движения ресничек: а — маятникообразное; б — крю-кообразное; в — воронкообразное; г — волнообразное

Общая архитектура реснички представлена на рис. 13. Ресничка представляет собой тонкий цилиндрический вырост цитоплазмы с постоянным диаметром 300 нм. Этот вырост от основания 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).

Дублеты микротрубочек слегка повернуты (около 10°) по отношению к радиусу аксонемы. Кроме периферических дублетов микротрубочек в центре аксонемы 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 дублета. От А-микротрубочки к центру аксонемы отходит радиальная связка, или **спица**, оканчивающаяся головкой, присоединяющейся к центральной **муфте**, диаметром около 70 нм, окружающей две центральные микротрубочки. Последние лежат отдельно друг от друга на расстоянии около 25 нм. Таким образом, в аксонеме располагается 20 продольных микротрубочек, в то время как в базальном тельце их 27 (рис. 14).

При движении ресничек их длина не изменяется; они не «сокращаются», а изгибаются, бьются. Оказалось, что механически отделенные реснички инфузории тетрахимены способны к биению в присутствии АТФ. При отделении ресничек базальные тельца остаются в теле клетки, это означает, что для механической работы ресничек базальное тельце не нужно, а в генерации движения участвует только аксонема. Удалось показать, что за движение ресничек отвечают «ручки», сидящие на А-микротрубочках.

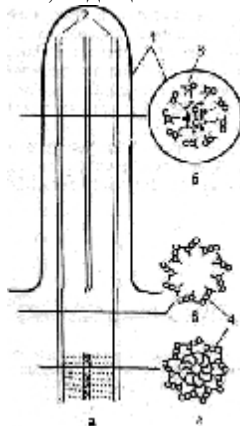


Рис. 13. Общее строение реснички. а — продольный срез; б — поперечный срез тела реснички; в, г — срезы базального тела. 1 — плазматическая мембрана; 2 — микротрубочки;



Рис. 12. Волны мерцательного эпителия, пробегающие по поверхности, покрытой ресничками

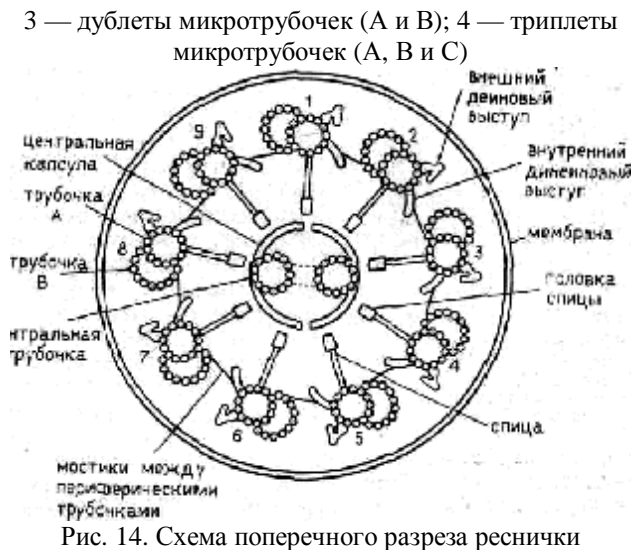


Рис. 14. Схема поперечного разреза реснички

При экстракции компонентов ручек реснички перестают биться в присутствии АТФ. В состав ручек входят белки **динеины**. Это большие белковые комплексы, состоящие из 9—12 полипептидных цепей, содержащие 2—3 глобулярные головки, связанные в общий корешок гибкими хвостами (рис. 223). В этом отношении динеины напоминают молекулы миозинов. Каждая головка динеина обладает АТФазной активностью, которая возрастает примерно в шесть раз при ассоциации с микротрубочками. В состав каждой ручки входит один белковый комплекс, одна молекула динеина. Так как при экстракции ручек биение ресничек прекращается, можно считать, что именно динеин несет ответственность за это движение, т. е. комплекс диненин+микротрубочка является мотором, или двигателем, при биении ресничек.

Микротрубочки цитоплазмы

В целом 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 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 движений. Микротрубочка цитоплазмы в ассоциации со специфическими ассоциированными белками (MAP) образуют АТФазные комплексы, способные приводить в движение клеточные компоненты.

Рост микротрубочек цитоплазмы происходит полярно: наращивается плюс-конец микротрубочки. Так как время жизни микротрубочек очень короткое, образование новых микротрубочек должно происходить постоянно. Полимеризация тубулинов, нуклеация, начинается в четко ограниченных участках клетки, в так называемых **центрах**

организации микротрубочек (**ЦОМТ**). В этих зонах закладываются короткие микротрубочки, обращенные своими минус-концами к ЦОМТ. Считается, что в зонах ЦОМТ минус-концы заблокированы специальными белками, предотвращающими или ограничивающими деполимеризацию тубулинов. Поэтому при достаточном количестве свободного тубулина длина микротрубочек, отходящих от ЦОМТ, будет наращаться. В качестве ЦОМТ в клетках животных участвуют главным образом клеточные центры, содержащие центриоли (см. ниже). Кроме того, в качестве ЦОМТ может служить околядерная зона.

Создавая внутриклеточный скелет, микротрубочки могут быть факторами ориентированного движения внутриклеточных компонентов, задавать своим расположением пространства для направленных потоков разных веществ и для перемещения крупных структур. Так, у меланофоров (клеток, содержащих пигмент меланин) рыб при росте клеточных отростков гранулы пигмента передвигаются вдоль пучков микротрубочек. При разрушении микротрубочек колхицином нарушается транспорт веществ в аксонах нервных клеток, прекращается экзоцитоз и блокируется секреция. При разрушении микротрубочек цитоплазмы компоненты аппарата Гольджи фрагментируются и разбегаются по цитоплазме, митохондриальный ретикулум разрушается.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ

Если микрофиламенты и микротрубочки являются полимерами глобулярных белков (актина и тубулина), то промежуточные филаменты строятся из фибриллярных мономеров. Поэтому основная конструкция промежуточных филаментов напоминает канат толщиной около 8—10 нм. Они локализируются главным образом в околядерной зоне и в пучках фибрилл, отходящих к периферии клеток. Встречаются промежуточные филаменты во всех типах клеток животных, но особенно они обильны в тех клетках, которые подвержены механическим воздействиям: клетки эпидермиса, нервные отростки, гладкие и исчерченные мышечные клетки.

В состав промежуточных филаментов входит большая группа изобелков (родственных белков), которые можно разделить на четыре типа. Первый тип составляют **кератины**. Второй тип белков промежуточных филаментов включает в себя три вида белка, имеющий 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 кислый белок** входит в состав промежуточных филаментов некоторых клеток нервной глии — в астроциты и некоторые шванновские клетки. Третий тип — **белки нейрофиламентов** (мол. вес от 60 до 130 тыс.), встречается в нервных клетках. И наконец, четвертый тип — **белки ядерной ламины**. Хотя эти последние имеют ядерную локализацию, они сходны по строению и свойствам со всеми белками промежуточных филаментов.

КЛЕТОЧНЫЙ ЦЕНТР

В клетках животных все цитоплазматические микротрубочки образуются и отрастают от «центров организации (или нуклеации)» микротрубочек. Источником роста микротрубочек является специальная структура цитоплазмы — **клеточный центр**, обычно имеющий в своем составе центриоль.

Центриоли 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. Они 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, от которой отходят радиально тонкие фибриллы (центросфера). Совокупность центриолей и центросферы носит название **клеточного центра**, или **центросомы**.

Основу центриолей составляют расположенные по окружности девять триплетов микротрубочек, образующих таким образом полый цилиндр (рис. 15). Ширина такого цилиндра около 0,15 мкм, а длина — 0,3—0,5 мкм (хотя встречаются центриоли, достигающие в длину нескольких микрон).

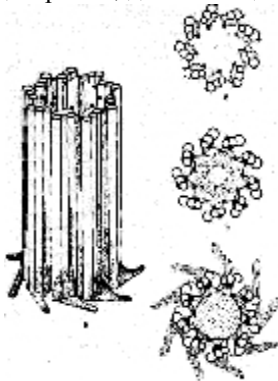


Рис. 15. Строение центриоли в клетках позвоночных.
а — трехмерная модель; б, в, г — поперечные сечения проксимального минус-конца, средней части и дистального плюс-конца

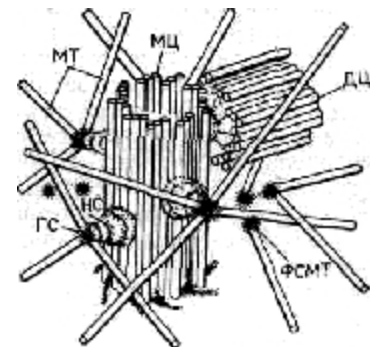


Рис. 16. Схема строения диплосомы лейкоцита аксолотля. МЦ — материнская центриоль; ДЦ — дочерние центриоли; НС — ножка сателлита; ГС — головка сателлита; ФСМТ — фокусы схождения микротрубочек; МТ — микротрубочки

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 микротрубочки (В и С) отличаются от А-микротрубочки тем, что они являются неполными, содержат 11 субъединиц и вплотную примыкают к своим соседям.

Каждый триплет располагается к радиусу такого цилиндра под углом около 40°. 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 диплосому центриолей, или **диплосому**. В диплосоме центриоли располагаются под прямым углом 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 на триплетах располагаются аморфный материал в виде выростов (шпор) — это придатки. Их нет на дочерней центриоли (рис. 16).

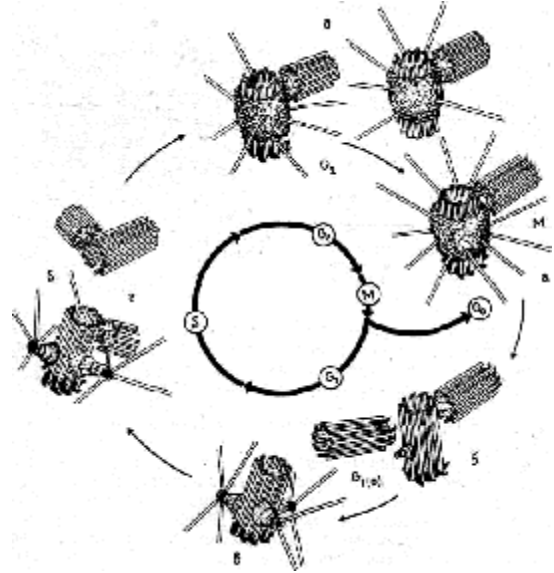


Рис. 17. Центросомный цикл. а — диплосома во время митоза; б — центриоль в начале G₁-периода; в — центриоль в G₁-периоде; г — центриоли в S-периоде, удвоение центриолен; д — центриоль в G₂-периоде

ДВИГАТЕЛЬНЫЙ АППАРАТ БАКТЕРИЙ

У прокариотических клеток не обнаружены в цитоплазме какие-либо фибриллярные образования, аналогичные элементам цитоскелета эукариотов. Вероятно, это связано, с одной стороны, с малыми размерами самих клеток, а также с тем, что они имеют внешний скелет в виде клеточных оболочек.

Многие бактерии способны к быстрому движению с помощью своеобразных бактериальных жгутиков, или флагелл.

Жгутики бактерий принципиально отличны от жгутиков и ресничек эукариотических клеток. Жгутики бактерий имеют очень сложное строение. Они состоят из трех основных частей: внешняя длинная волнистая нить (собственно жгутик), крючок, базальное тельце (рис. 18).

Жгутиковая нить построена из белка-флагеллина. Глобулярные субъединицы флагеллина полимеризуются в спирально закрученные нити так, что образуется трубчатая структура (не путать с микротрубочками эукариотов) с диаметром 12—25 нм, полая изнутри. Флагеллины не способны к движению. Они могут спонтанно полимеризоваться в нити с постоянным шагом воллы, характерным для каждого вида.

Вблизи клеточной поверхности жгутиковая нить, флагелла, переходит к более широкому участку, называемому крючком. Он имеет длину около 45 нм и образован другими белками.

Бактериальное базальное тельце не имеет ничего общего с базальным тельцем эукариотической клетки. Оно состоит из стержня, связанного с крючком, и четырех колец-дисков. Два верхних кольца-диска, имеющих у грамотрицательных бактерий, локализованы в клеточной стенке: одно кольцо (P) погружено в липополисахаридную мембрану, а второе (L) — в муреиновый слой. Два других кольца, S — «статор» и M — «ротор», локализованы в плазматической мембране. В базальных тельцах грамположительных бактерий имеются только два нижних кольца, связанных с плазматической мембраной.

Принцип движения бактериальных жгутиков совершенно иной, чем у эукариотов. Если у последних жгутики движутся за счет продольного скольжения дуплетов микротрубочек, то у бактерий — за счет вращения базального тельца (а именно S- и M-дисков) вокруг своей оси в плоскости плазматической мембраны.

Движение бактериальных жгутиков не зависит от АТФ, а осуществляется благодаря трансмембранному градиенту ионов водорода на поверхности плазматической мембраны. При этом происходит вращение M-диска.

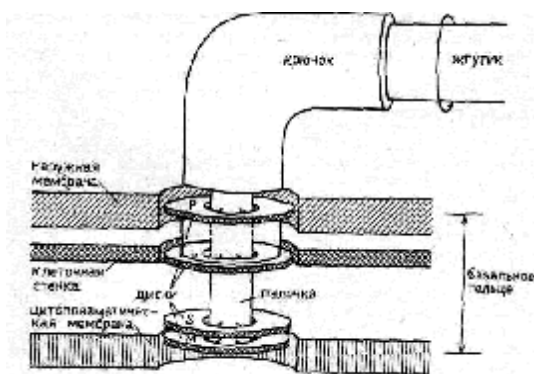


Рис. 18. Схема строения бактериального жгутика грамотрицательной бактерии

Занятие 12. 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. Воспроизведение себе подобного — главное событие жизни клетки. Вся «интерфазная» жизнь клеток направлена на полное осуществление клеточного цикла, заканчивающегося клеточным делением. Само же деление клетки — процесс не случайный, строго генетически детерминированный, где в последовательный ряд выстроена целая цепочка событий.

Как уже говорилось, деление прокариотических клеток протекает без образования специальных структур в цитоплазме и без конденсации хромосом, хотя должен существовать ряд метаболических процессов, в первую очередь синтез ряда специфических белков, участвующих в «простом» делении бактериальной клетки надвое.

Деление всех эукариотических клеток связано с конденсацией реплицированных хромосом, которые приобретают вид плотных нитчатых структур. Нитчатые хромосомы переносятся в дочерние клетки специальной структурой — веретеном деления. Такой тип деления эукариотических клеток — **митоз** (от греч. «mitos» — нити), или **кариокинез**, или **непрямое деление** — является единственным полноценным типом 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 эукариотов, как и при делении прокариотических клеток, происходят два события: расхождение реплицированных хромосом и разделение клеточного тела, цитотомия. Первая часть события у эукариотов осуществляется с помощью веретена деления, состоящего из микротрубочек, а вторая часть — за счет актомиозиновых комплексов, вызывающих образование перетяжки у клеток животного происхождения, или за счет участия микротрубочек и актиновых микрофиламентов в образовании фрагмопласта, первичной клеточной перегородки у клеток растений.

В образовании веретена деления у всех эукариотических клеток принимают участие два рода структур: полярные тельца, или зоны, веретена и кинетохоры хромосом. Полярные тельца, или centrosомы, являются центрами организации (или нуклеации) микротрубочек. От них своими плюс-концами отрастают микротрубочки, образующие пучки, тянущиеся к хромосомам. Как было показано выше, у клеток животных в состав centrosомы включаются и центриолы. Однако у многих эукариотов центриолей нет, хотя центры организации микротрубочек присутствуют в виде бесструктурных аморфных зон (полярные зоны у высших растений), от которых отходят многочисленные микротрубочки. Как правило, в 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 хромосомами, являются кинетохоры, специальные белковые структуры, располагающиеся в центромерных участках хромосом. Именно кинетохоры, взаимодействующие 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, начиная с дрожжей, кончая млекопитающими, и обеспечивают сложный процесс расхождения реплицированных хромосом.

Морфология митотической фигуры

Митотический аппарат наиболее подробно изучен у клеток высших растений и животных. Особенно хорошо он бывает выражен на стадии метафазы митоза (рис. 1). В живых или фиксированных клетках в метафазе в экваториальной плоскости располагаются хромосомы, от которых в противоположных направлениях тянутся нити веретена, сходящиеся на двух разных полюсах митотической фигуры. Таким образом, митотическое веретено — это совокупность хромосом, полюсов и волокон. Волокна веретена представляют собой одиночные микротрубочки или их пучки. Начинаются микротрубочки от полюсов веретена, и часть их направляется к кинетохорам хромосом (кинетохорные микротрубочки), другая часть проходит дальше по направлению к противоположному полюсу, но до него не доходит — это «межполюсные» микротрубочки. Кроме того, от полюсов отходит группа радиальных микротрубочек, образуя вокруг них как бы «лучистое сияние», — это астральные микротрубочки.

Кинетохор

Кинетохоры — специальные белковые структуры, большей частью располагающиеся в зонах центромер хромосом (рис. 2). Это сложные комплексы, состоящие из многих белков. Морфологически они очень сходны, имеют одинаковое строение, начиная от диатомовых водорослей, кончая человеком. В кинетохорах различают три слоя (рис. 3): внутренний плотный слой, примыкающий к телу хромосомы, средний рыхлый и внешний плотный слой. От внешнего слоя отходит множество нитчатых отростков, образуя **корону кинетохора**. В общей форме кинетохоры имеют вид пластинок, или дисков, лежащих в зоне первичной перетяжки хромосом, в центромере. На каждую

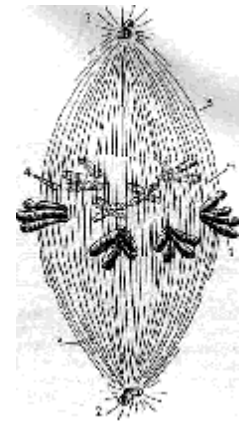


Рис. 1. Схема строения веретена деления.

1 — хромосомы; 2 — полюса веретена, centrosомы; 3 — межполюсные микротрубочки; 4 — кинетохорные микротрубочки; 5 — астральные микротрубочки

хроматиду (хромосому) обычно приходится по одному кинетохору. До анафазы кинетохоры на каждой сестринской хроматиде располагаются оппозитно, связываясь каждый со своим пучком микротрубочек.

У некоторых растений кинетохор имеет вид не пластинок, а полусферы. У круглых червей прямокрылых насекомых и однодольных растений встречаются голоцентрические хромосомы. Они имеют диффузные кинетохоры, располагающиеся по всей длине хромосом. У дрожжевых клеток кинетохоры морфологически не выявляются; одиночная микротрубочка подходит прямо к хромосоме. Мы уже отмечали особенности строения центромерных районов, где локализована ДНК с часто повторяющимися последовательностями нуклеотидов. С этими участками ДНК специфически взаимодействуют белки внешнего плотного слоя, часть которых входит в состав нуклеосом.

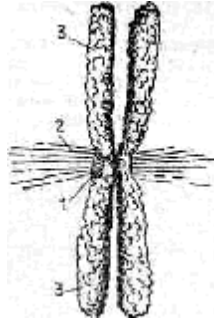


Рис. 2. Кинетохоры располагаются в центромерном районе хромосом.

1 — кинетохор; 2 — пучок кинетохорных микротрубочек; 3 — хроматида

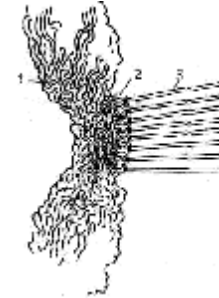


Рис. 3. Ультраструктура кинетохора.

1 — анафазная хроматида; 2 — трехслойный кинетохор; 3 — кинетохорные микротрубочки

Белки внутреннего слоя кинетохоров участвуют в спаривании сестринских хроматид и в их расхождении в начале анафазы. В состав кинетохоров входят также белки, связывающиеся с микротрубочками, и белки-моторы, участвующие в движении хромосом. Один из этих белков — цитоплазматический динеин — обнаружен в зоне короны кинетохоров.

К кинетохорам подходят **микротрубочки**, растущие от полюсов. Минимальное их число у дрожжей: одна микротрубочка на каждую хромосому. У высших организмов это число достигает 20—40. В последнее время удалось показать, что сложные кинетохоры высших организмов состоят из повторяющихся субъединиц и каждая способна образовывать связи с микротрубочками (рис. 4).

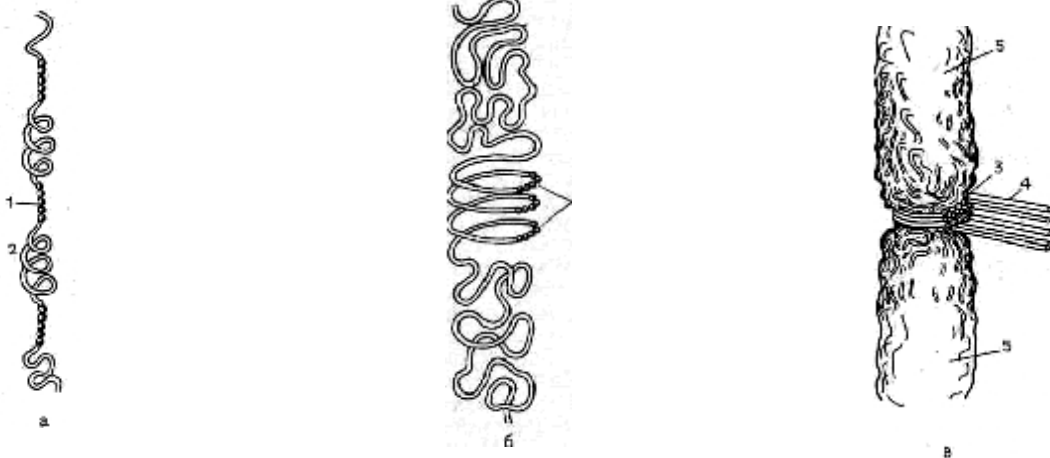


Рис. 4. Модель строения кинетохора.

а — деконденсированная центромера; б — частично конденсированная центромера; в — полностью конденсированная центромера; 1 — участок ДНК с белковыми сегментами, связывающими микротрубочки; 2 — линкерный участок ДНК; 3 — сформированный кинетохор; 4 — микротрубочки; 5 — плечи хромосомы

Динамика митоза

У клеток, вступивших в цикл деления, фаза собственно митоза, непрямого деления, занимает относительно короткое время, всего около 0,1 времени клеточного цикла. Так, у делящихся клеток меристемы корней интерфаза может составлять 16—30 ч, а митоз занимать всего 1—3 ч. 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.

Процесс митотического деления клеток принято подразделять на несколько основных фаз: **профазу, прометафазу, метафазу, анафазу, телофазу**. Установить точные границы между этими фазами очень трудно, потому что сам митоз представляет собой непрерывный процесс, и смена фаз идет постепенно, так что одна из них незаметно переходит в другую.

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).

Время отдельных фаз митоза лучше всего определяется 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.

Профаза. Уже в конце G_2 -периода в клетке начинаются значительные перестройки. Точно определить наступление профазы невозможно. Лучшим критерием для этой фазы митоза может служить появление в ядрах нитчатых структур — митотических хромосом. Этому событию предшествует повышение активности фосфорилаз, модифицирующих гистоны, и в первую очередь гистон H1. В профазных хромосомах уже можно наблюдать зрелые кинетохоры, которые не имеют никаких связей с микротрубочками, т. е. кинетохоры не нуклеируют образование микротрубочек. Конденсация хромосом в профазном ядре совпадает с резким уменьшением транскрипционной активности хроматина, которая полностью исчезает к середине профазы. В связи с падением синтеза РНК и конденсацией хроматина происходит инактивация и ядрышковых генов. При этом отдельные фибриллярные центры сливаются, превращаясь в ядрышкообразующие участки хромосом, ядрышковые организаторы. Большая часть ядрышковых белков диссоциирует и в свободном виде встречается в плазме клетки или связывается с поверхностью хромосом.

Одновременно происходит фосфорилирование белков ламины, ядерной оболочки, при этом теряется ее связь с хромосомами. Затем ядерная оболочка фрагментируется на мелкие вакуоли, а поровые комплексы исчезают.

Параллельно этим процессам активируются клеточные центры. 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 2 раза выше скорости 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 плюс-концами.

Активированные centrosомы — будущие полюса веретена деления — начинают расходиться друг от друга на некоторое расстояние. Механизм профазного расхождения полюсов пока не ясен: возможно, идущие навстречу друг другу антипараллельные микротрубочки как-то взаимодействуют между собой, что приводит к их большей стабилизации и расталкиванию полюсов (рис. 5).

В профазе одновременно с разборкой цитоплазматических микротрубочек можно видеть дезорганизацию эндоплазматического ретикулума (он распадается на мелкие вакуоли, лежащие по периферии клетки) и аппарата Гольджи, который теряет свою околядерную локализацию, распадается на отдельные диктиосомы, беспорядочно разбросанные в цитоплазме.

Прометафаза. После разрушения ядерной оболочки митотические хромосомы лежат в зоне бывшего ядра без особого порядка. В прометафазе начинается их 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.

В начале прометафазы хромосомы, лежащие ближе к одному из полюсов образующегося веретена, быстро, но не одно-моментно к нему приближаются. Такой первичный асинхронный дрейф хромосом к разным полюсам происходит с помощью микротрубочек. Во время движения хромосомы микротрубочки не разбираются. Вероятнее всего, что за такое быстрое перемещение хромосом отвечает моторный белок, аналогичный цитоплазматическому динеину, обнаруженному в короне кинетохоров.

Колебательные движения хромосом то в одном направлении, то в другом приводят к тому, что они в конце концов оказываются в экваторе веретена и выстраиваются в метафазную пластинку.

Метафаза. В метафазе, как и в других фазах митоза, не смотря на некоторую стабилизацию, пучки микротрубочек продолжают постоянно обновляться 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.

Таблица 15 Длительность фаз митоза в различных клетках

	Продолжительность (в мин)			
	профаза	метафаз	анафаз	телофа
Саркомы Иосида	14	31	4	21
Культура селезенки	20—35	6—15	8—14	9-26
Эндосперм гороха	40	20	12	110
Эндосперм ириса	40—65	10—30	12—22	40—75

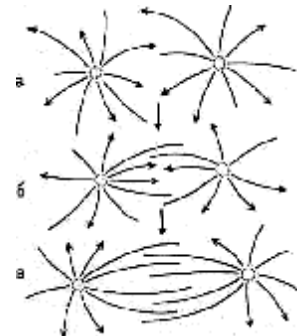


Рис. 5. Механизм расталкивания полюсов за счет стабилизации антипараллельных микротрубочек, отходящих от разных полюсов. а — ранняя; б — средняя; в — поздняя профазы. Стрелки указывают направления роста микротрубочек, их плюс-концы

К концу метафазы завершается процесс обособления друг от друга сестринских хроматид. Их плечи лежат параллельно друг другу, между ними хорошо видна разделяющая их щель. Последним местом, где контакт между хроматидами сохраняется, является центромера; вплоть до самого конца метафазы хроматиды во всех хромосомах остаются связанными в центромерных участках.

Анафаза начинается внезапно, что хорошо можно видеть при витальном исследовании. Все хромосомы вдруг теряют центромерные связки и синхронно начинают удаляться друг от друга по направлению к противоположным полюсам клетки. Скорость движения хромосом равномерная, она может достигать 0,5—2 мкм/мин. Анафаза — самая короткая стадия митоза (несколько процентов 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. Точно такую же фигуру можно получить, если взять кусок веревки и потянуть ее за центральную часть: возникает V-образная фигура. 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 каким-то образом за движение хромосомы. Создается впечатление, что за центромеру хромосома оттягивается к полюсу. У некоторых высших растений, например у ожики, нет выраженной центромерной перетяжки, и волокна веретена контактируют со многими точками на поверхности хромосом (полицентрические или голоцентрические хромосомы). В этом случае хромосомы располагаются поперек волокон веретена. Анафаза начинается с разъединения сразу всех хромосом в центромерных участках. Вероятнее всего, в это время происходит одновременная модификация центромерных белков, которые связывали до этого времени сестринские хроматиды. Такое одновременное отделение хроматид позволяет начать их синхронное расхождение. Собственно расхождение хромосом складывается из двух процессов: 1) расхождение за счет кинетохорных пучков микротрубочек, 2) расхождение вместе с полюсами за счет удлинения межполюсных микротрубочек. Первый из процессов носит название «анафаза А», второй — «анафаза В» (рис. 6). Во время анафазы А, когда группы хромосом начинают двигаться по направлению к полюсам, кинетохорные пучки микро трубочек укорачиваются.

Можно было ожидать, что в этом случае деполимеризация микротрубочек должна происходить на их минус-концах — концах, ближайших к полюсу. Однако было доказано, что микротрубочки действительно разбираются, но только с плюс-концов, прилежащих к кинетохорам. Оказалось, что такое движение хромосом зависит от присутствия АТФ и от наличия достаточной концентрации ионов Ca^{2+} . То, что в составе короны кинетохоров, в которую вмонтированы плюс-концы микротрубочек, обнаружен динеин, позволило считать, что именно этот белок является мотором, который подтягивает хромосому к полюсу. Одновременно с этим происходит деполимеризация кинетохорных микротрубочек на плюс-конце. Это сопровождается локальным повышением ионов кальция, выходящих из мелких пузырьков эндоплазматического ретикулула.

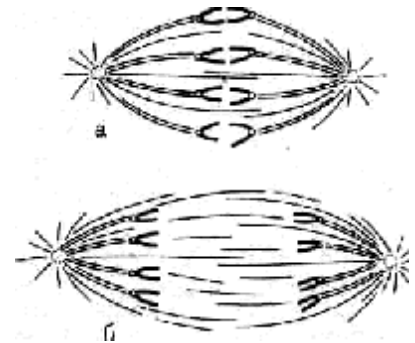


Рис. 6. Анафазное расхождение хромосом.
а — анафаза А; б — анафаза В

После остановки хромосом у полюсов происходит их дополнительное расхождение за счет удаления полюсов друг от друга (анафаза В). Показано, что при этом наращиваются плюс-концы межполюсных микротрубочек, которые могут значительно увеличиться в длину. Взаимодействие между антипараллельными микротрубочками, приводящее к их скольжению относительно друг друга, определяется кинезинпо-добными белками.

Последовательность анафаз А и В и их вклад в процесс расхождения хромосом может быть различным у разных объектов. Так, у млекопитающих стадия А и В протекает практически одновременно. У простейших анафаза В может приводить к 15-кратному увеличению длины веретена. В растительных клетках стадия В отсутствует.

Телофаза начинается с остановки хромосом (ранняя телофаза, поздняя анафаза) и кончается началом реконструкции нового интерфазного ядра (ранний G_1 -период) и разделением исходной клетки на две дочерние (цитокinesis).

В ранней телофазе хромосомы, не меняя 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.

В телофазе начинается и заканчивается процесс разрушения митотического аппарата. Он идет от полюсов к экватору бывшей клетки: именно в средней части веретена микротрубочки сохраняются дольше всего (остаточное тельце).

Главное событие телофазы — разделение клеточного тела — **цитотомия**, или цитокinesis. Ранее уже говорилось, что у растений деление клетки происходит путем внутриклеточного образования клеточной перегородки, а у клеток животных — путем перетяжки, впячивания плазматической мембраны внутрь клетки.

Митоз не всегда заканчивается разделением тела клетки. Так, в эндосперме многих растений могут некоторое время идти множественные процессы митотического деления ядер без деления цитоплазмы: образуется гигантский многоядерный симпласт. Так же без цитотомии синхронно делятся многочисленные ядра плазмодиев миксомицетов.

Неоднократное деление ядер без деления цитоплазмы происходит и на ранних этапах развития зародышей некоторых насекомых.

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 начинают отрастать цитоплазматические микрфтрубочки и восстанавливается интерфазный цитоскелет.

Различные типы митоза эукариотов

Описанное выше деление клеток (митоз) высших животных и растений — не единственная форма непрямого деления клеток. Наиболее простой тип митоза — **плевромитоз**.

Он в какой-то степени напоминает бинарное деление прокариотических клеток, у которых нуклеиды- хромосомы после репликации остаются связанными с плазматической мембраной, начинающей расти между точками связывания ДНК, тем самым хромосомы как бы разносятся в разные участки клетки. После этого при образовании клеточной перегородки каждая из молекул ДНК окажется в новой отдельной клетке.

Как уже говорилось, для деления эукариотических клеток характерно образование веретена, построенного из микротрубочек. При закрытом **плевромитозе** (закрытым он называется потому, что расхождение хромосомы происходит без нарушения ядерной оболочки) в качестве центров организации микротрубочек (ЦОМТ) участвуют не центриоли, а другие структуры, находящиеся на внутренней стороне ядерной мембраны. Это так называемые полярные пластинки неопределенной морфологии, от которых отходят микротрубочки. Таких пластинок две. Они расходятся друг от друга, не теряя связи с ядерной оболочкой, в результате чего образуются два полуверетена, связанные с хромосомами. Весь процесс образования митотического аппарата и расхождения хромосом происходит в этом случае под ядерной оболочкой. Такой тип митоза встречается среди простейших. Он также широко распространен среди грибов (хитридиевых, зигомизетов, дрожжей, оомицетов, аскомицетов, миксомицетов и др.). Встречаются формы полузакрытого плевромитоза, когда на полюсах сформированного веретена ядерная оболочка разрушается.

Другой формой митоза является **ортомитоз**. В этом случае ЦОМТ располагается в цитоплазме, с самого начала идет формирование не полуверетен, а двухполюсного веретена. Существуют три формы ортомитоза: открытый (обычный митоз), полузакрытый и закрытый. При полузакрытом ортомитозе образуется бисимметричное веретено с полюсным расположением в цитоплазме ЦОМТ, ядерная оболочка сохраняется в течение всего митоза, за исключением полярных зон. В качестве ЦОМТ здесь могут обнаруживаться массы гранулярного материала даже центриоли. Эта форма митоза встречается у зеленых водорослей, грегариин, бурых, красных водорослей, у некоторых низших грибов. При закрытом ортомитозе полностью сохраняется ядерная оболочка, под которой образуется настоящее веретено. Микротрубочки формируются в кариоплазме, реже отрастают от внутриядерного ЦОМТ, не связанного (в отличие от плевромитоза) с ядерной оболочкой. Такого типа митозы характерны для деления микронуклеусов инфузорий, но встречаются и у других простейших. Из этого краткого рассмотрения видно, что главная особенность митоза в целом — возникновение структур веретена деления, образующегося в связи с разнообразными по своему строению ЦОМТ.

Занятие 13. Мейоз.

При оплодотворении ядра родительских клеток (гамет) сливаются, что должно обеспечить увеличение вдвое количества ДНК и хромосом в зиготе и, соответственно, во всех клетках развивающегося организма. Следовательно, при образовании половых клеток должен существовать механизм уменьшения числа хромосом, который бы компенсировал удвоение их набора при оплодотворении. Это достигается при специальном делении созревающих половых клеток — редукционном делении в процессе мейоза — который в противоположность оплодотворению приводит к уменьшению в клетке числа хромосом вдвое. Этот процесс состоит из **двух** следующих друг за другом делений ядра, сопровождающихся лишь одним удвоением количества ДНК. При мейозе кроме редукции числа хромосом происходит еще целый ряд процессов, отличающих этот тип деления от митоза. В первую очередь это рекомбинации генетического материала, обмен участками между гомологичными хромосомами (**кроссинговер**). Кроме того, для мейоза характерны активация транскрипции в профазе первого деления и отсутствие S-фазы между первым и вторым делениями.

Во время мейоза обнаруживаются некоторые особенности строения хромосом, которые недостаточно выявляются во время их митотической конденсации. В профазе мейотического деления особенно хорошо выявляются участки плотноупакованного хроматина — хромомеры, а также общий принцип петельной укладки ДНК в составе хромосом, как митотических, так и интерфазных.

Для мейоза характерны специальная перестройка и аранжировка хромосом в ядрах созревающих половых клеток в течение профазы первого деления (рис. 1). В связи с этим профазу первого (I) мейотического деления принято подразделять на пять стадий: **лептотена** — стадия тонких нитей, **зиготена** — стадия сливающихся нитей, **пахитена** — стадия толстых нитей, **диplotена** — стадия двойных нитей, **диакинез** — стадия обособления двойных нитей. Затем следуют метафаза I деления и последующие фазы деления клетки, наступает следующий, II цикл, в конечном результате приводящий к появлению зрелых половых клеток. Так как мейоз есть совокупность изменений хромосомного набора клетки в течение двух циклов клеточного деления, то целесообразно рассмотреть клеточные события при этих делениях по порядку.

Клетки, входящие в мейоз, имеют обычное диплоидное ($2n$) число хромосом и соответствующее этому числу количество ДНК ($2c$). В составе диплоидных ядер, как результат оплодотворения, находятся два родительских набора хромосом, тем самым каждая хромосома имеет своего гомолога.

В первом цикле мейотического деления происходит нормальная S-фаза, приводящая к удвоению ДНК. Следовательно, как и при обычном, митотическом делении, клетки приобретают $4c$ количество ДНК и содержат уже $4n$ количество хромосом. Затем клетки переходят к подготовке деления — к профазе. Из стадий профазы мейоза самой длительной является пахитенная стадия.

Так, у человека при спермиогенезе стадии лептотены с зиготеной занимают 6,5 суток, пахитена — 15, диплотена и диакинез — 0,8; у тритона лептотена занимает 5 суток, зиготена — 8, пахитена — 4—5, диплотена — 2 суток; у домашнего сверчка лептотена и зиготена занимают 2—3 суток, пахитена — 6—9, диплотена — 2 суток. 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 оставаться в развитии на несколько месяцев и даже лет в стадии диплотены профазы I мейотического деления.

У растений длительность мейоза также намного превышает длительность митоза. Так, у традесканции весь мейоз занимает около 5 суток, из которых на профазу I деления приходится 4 суток, но встречаются виды, у которых мейоз идет со скоростью, соизмеримой с митозом.

Лептотена, или стадия тонких нитей, морфологически напоминают 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 (рис. 1, а).

Длина каждой мейотической хромосомы на ранних стадиях мейоза может быть в 10—100 раз больше длины соответствующих митотических хромосом. 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 ($2n$) удвоенных сестринских хроматид, общее количество последних, как и при 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. У некоторых растений в конце лептотены хромосомы собираются в клубок (синезис).

Характерным для лептотены является 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 специфичны для каждой хромосомы. Число хромомеров различно у разных объектов: всего у тритона на 12 хромосомах их 2,5 тыс., у сверчка — около 200, у риса на 24 хромосомы — 645.

В лептотене начинается следующий, чрезвычайно важный и характерный для мейоза процесс конъюгации гомологичных хромосом. На этой стадии каждая (двойная) хромосома вдоль своей поверхности связана со специальной структурой — тяжем белковой природы, которой позднее, в зиготе примет участие в образовании синаптонемного комплекса (СК).

Зиготена — стадия прохождения конъюгации (соединение) гомологичных хромосом (синапсис). 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. 2).

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, и на стадии зиготены он только начинается, и, видимо, именно эта стадия как-то определяет течение данного процесса, во многом еще непонятного.

Специфические по своему строению участки ДНК на гомологичных хромосомах «узнают» друг друга и на некоторое время образуют стабильные связи, необходимые для закрепления хромосом одна вдоль другой. Позднее эта

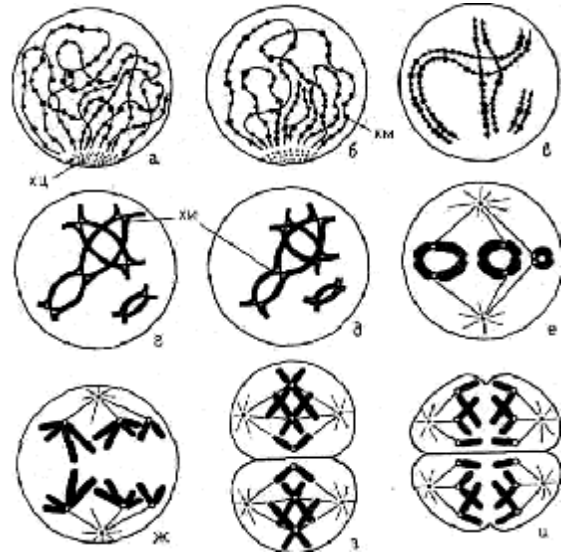


Рис. 1. Схематическое изображение мейоза при $2n=6$ числе хромосом. а — лептотена; б — зиготена; в — пахитена с тремя бивалентами; г — диплотена; д — диакинез; е — метафаза I; ж — анафаза I; з — метафаза II; и — анафаза II; ХЦ — локализация теломерных участков хромосом в «букете»; ХМ — хромомеры; ХИ — хиазма

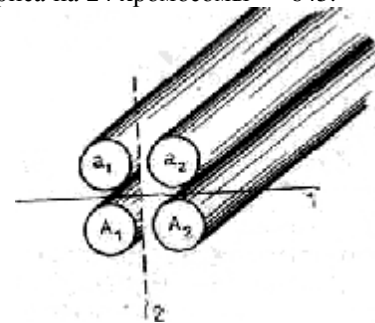


Рис. 2. Строение бивалента. a_1 — a_2 и A_1 — A_2 — сестринские хроматиды. 1 — плоскости расхождения хроматид в I делении; 2 — то же во II делении.

связь осуществляется уже с помощью иной структуры, а именно с помощью **синаптонемного** комплекса (рис. 3). Объединение гомологов чаще всего начинается в теломерах в связи с ядерной оболочкой и в центромерах. В этих местах, а позднее и в других по длине соединяющихся хромосом белковые тяжи сближаются на расстояние около 100 нм; между ними образуются связки и формируется полная структура 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.

Синаптонемный комплекс встречается практически у всех представителей эукариотов, у которых есть половой процесс. Этот комплекс имеет вид трехслойной ленты, состоящий из двух боковых (латеральных) белковых компонентов — тяжей (толщиной 30—60 нм), центрального 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. В таком полностью сформированном виде синаптонемный комплекс существует в течение следующей стадии, пахитены.

Пахитена — стадия толстых нитей — называется так потому, что благодаря полной конъюгации гомологов профазные хромосомы как бы увеличились по толщине. Число таких толстых пахитенных хромосом гаплоидно ($1n$), но они состоят из двух объединившихся гомологов, а каждый в свою очередь — из двух сестринских хроматид. Следовательно, и здесь количество ДНК равно $4c$, а число хроматид — $4n$.

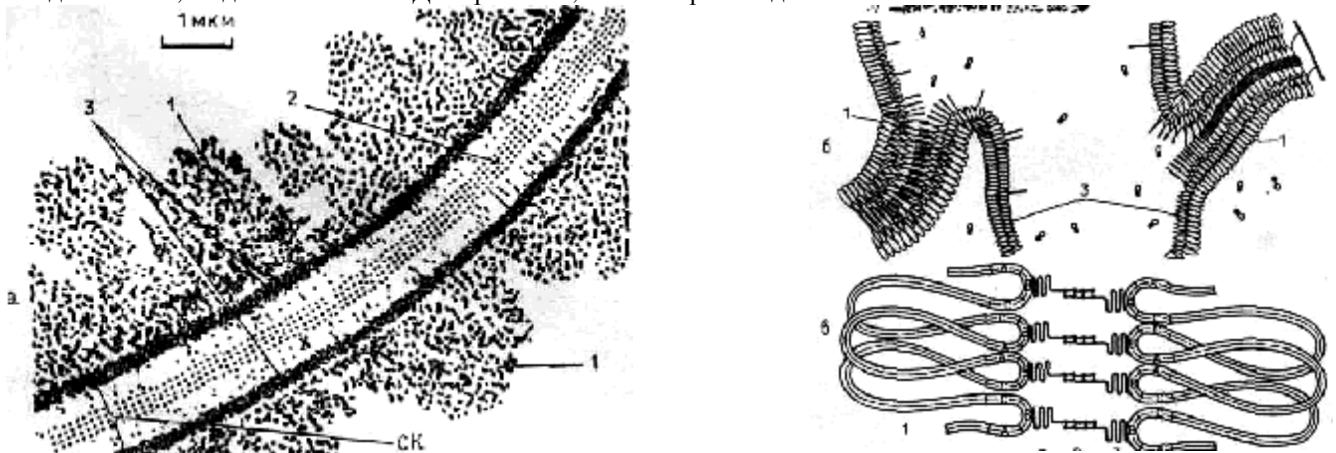


Рис. 3. Синаптонемный комплекс (СК). а — вид под электронным микроскопом; б — схема; в — модель; 1 — хроматин сестринских хромосом; 2 — осевой элемент; 3 — боковые элементы.

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.

По мере отталкивания хромосом в бивалентах хорошо видны **хиазмы** — места перекреста и сцепления хромосом. Только в этих участках сохраняется структура синаптонемного 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. Если имеется одна точка контакта, то бивалент приобретает вид креста, если две — то вид петли или ряда петель, если хиазм больше двух.

В диплотенной стадии хромосомы несколько укорачиваются и конденсируются, 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.

На этой стадии хромосомы приобретают вид «ламповых щеток». На выделенных хромосомах в это время видно, что каждый гомолог в биваленте окружен как бы войлоком, состоящим из петлистых нитчатых структур. При этом петли парносимметричны, и каждая пара отходит от хромомера, расположенного на хромосомной оси. Эта ось представляет собой две спаренные сестринские хроматиды, а хромомеры — это двойные участки конденсированного хроматина, петли же — деконденсированные участки активного, функционирующего хроматина. Характерным является то, что они содержат большие количества РНК, которая здесь же и синтезируется. По своим характеристикам эта РНК относится к информационной.

Наличие активных хромосом в диплотене резко отличает мейоз от митоза, где, начиная с профазы, полностью прекращается синтез РНК. Активизация 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 синтезируется огромное количество рибосом на амплифицированных ядрышках и информационной РНК на боковых петлях хромосом.

Диакнез характеризуется уменьшением числа хиазм, укорочением бивалентов, потерей ядрышек. Биваленты приобретают более компактную форму. 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 гомологические хромосомы, состоящие из двух сестринских хроматид (рис. 4). 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 хромосомы из разных пар смешиваются, происходит их рекомбинация. Если оценивать образовавшиеся хромосомные наборы, то оба они содержат по $2c$ количества ДНК и по $2n$ числа хроматид, ибо каждая расходящаяся хромосома в паре гомологов состоит из двух хроматид. В этом отношении редукции числа хромосом (хроматид) еще не произошло, но в два раза уменьшилась генетическая разнородность, так как теперь в каждом хромосомном наборе нет аллельных генов.

Вслед за телофазой I деления следует короткая интерфаза, в которой ДНК не синтезируется, и клетки приступают 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 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. В результате всего процесса мейоза после двух делений из одной клетки образуются четыре гаплоидных, отличающихся друг от друга по своей генетической конструкции.

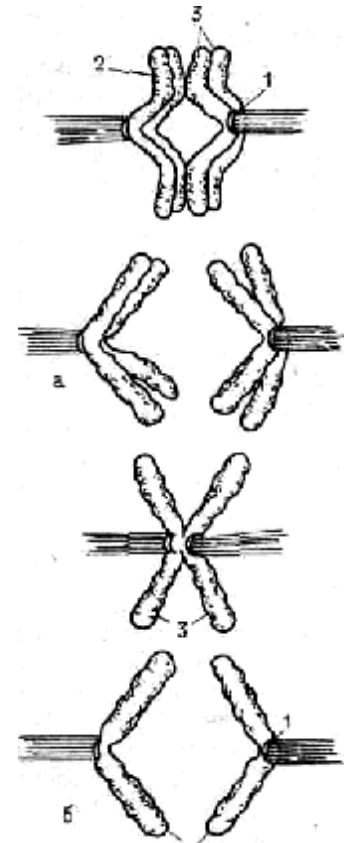


Рис. 4. Расхождение хромосом в I делении мейоза (а) и во II делении мейоза (б). 1 — кинетохор и его микротрубочки; 2 — хиазма; 3 — сестринские хроматиды

Занятие 14. Передача сигналов внутри клетки и между клетками.

В англоязычной литературе существует понятие "cell signaling" ("клеточная сигнализация"), подразумевающее весь комплекс событий, сопряженный с передачей сигналов как между клетками, так и внутри клетки. Клеточную сигнализацию можно разделить на внешние и внутриклеточные сигналы. В процессе передачи сигналом может происходить их усиление (или амплификация), ослабление (или аттенуация) или подавление (или выключение).

Согласованность биохимических процессов внутри клетки или целого организма дополняется адекватностью их реакций по отношению к внешней среде, к тем потокам информации, энергии и материи, которые поступают в них извне. Каждая клетка нуждается в получении множественных сигналов извне для:

- поддержания жизни
- деления
- дифференцировки
- апоптоза

Сигнальные молекулы, включая большинство гормонов, как правило, не проникают внутрь клетки, а специфически взаимодействуют с ее наружной поверхностью, точнее, с рецепторами, локализованными во внешней стороне клеточной мембраны. Рецепторы представляют собой мембранные белки, полипептидная цепь которых пронизывает толщу мембраны как минимум один раз. Стероидные и тиреоидные гормоны, будучи гидрофобными по своей природе, способны проникать через плазматическую мембрану внутрь клетки, где они взаимодействуют с растворимыми рецепторными белками, локализованными в цито- и (или) нуклеоплазме. Далее, однако, речь будет идти только о трансмембранной передаче сигналов при участии интегрированных в мембрану рецепторов.

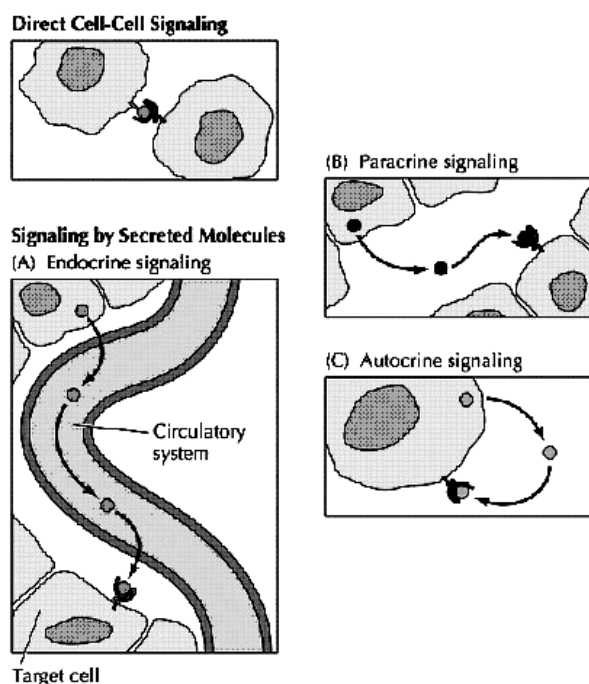


Рис1. Типы внешних сигналов

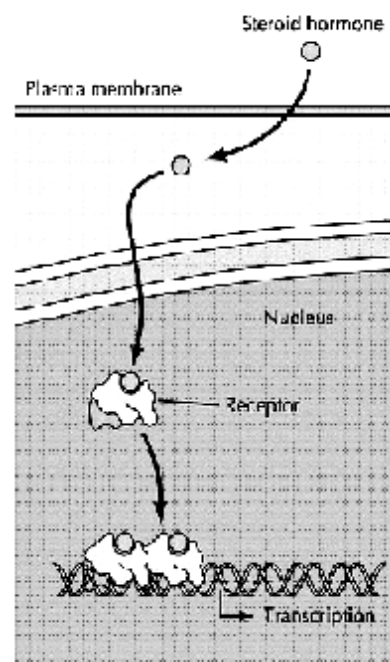


Рис 2. Действие стероидного гормона

Разнообразные молекулы, инициирующие трансмембранную передачу сигналов, активируют рецепторы, действуя на них обычно при очень низких концентрациях, порядка 10^{-8} М и ниже. Активированный рецептор тем или иным способом передает сигнал к внутриклеточным мишеням. Если мишень, или эффекторный белок, представлена ферментом, то сигнал модулирует (увеличивает или уменьшает) его каталитическую активность; если эффекторным белком служит ионный канал, то модулируется проводимость этого канала. В обоих случаях результатом будет изменение активности какой-то метаболической стадии (стадий) либо цитоплазматической концентрации того или иного иона и как следствие возникновение клеточного ответа.

Молекулярные машины, обеспечивающие передачу сигнала от рецепторов к внутриклеточным мишеням, состоят, как правило, из нескольких белковых компонентов, совокупность которых обычно именуют каскадом передачи сигнала или просто каскадом. Помимо белковых посредников в передачу сигнала внутри клетки во многих случаях вовлекаются и относительно небольшие молекулы, служащие вторичными сигналами, - это вторичные посредники, или мессенджеры (от англ. messenger - посыльный). Нам кажется, что для обозначения сигнальных молекул лучше использовать термин "мессенджер", а не "посредник". Дело в том, что в цитоплазме в передачу сигнала вовлечены как разнообразные белки, так и малые молекулы (собственно вторичные сигналы), причем функционально все они являются посредниками между рецептором, на который подействовал внешний стимул, и клеточным ответом.

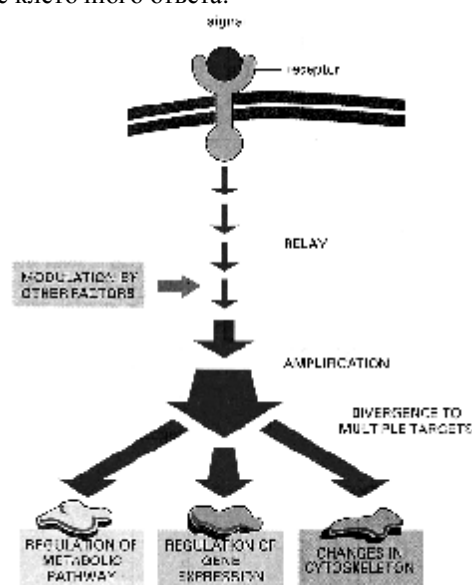


Рис 3. Передача сигнала внутри клетки

Однако между ними есть и принципиальное различие: белки образуют своеобразную молекулярную машину, которая, с одной стороны, чувствует внешний сигнал, а с другой - обладает ферментативной или иной активностью, модулируемой этим сигналом, в то время как малые молекулы действительно служат посыльными (мессенджерами) между различными белками, полиферментными комплексами или даже клеточными структурами. Самый известный пример такого посыльного - это уже упоминавшийся выше cAMP, среди других наиболее важных вторичных мессенджеров следует упомянуть циклический гуанозин-3',5'-монофосфат (cGMP), инозит-1,4,5-трифосфат (обозначаемый как IP3), диацилглицерин (ДАГ), катион кальция.

Наиболее характерные свойства вторичного мессенджера, во-первых, его относительно небольшая по сравнению с биополимерами молекулярная масса (понятно, что посыльный должен с высокой скоростью диффундировать в цитоплазме), во-вторых, он обязан быстро (при сопоставлении со временем передачи сигнала) расщепляться, а в случае Ca^{2+} откачиваться. В противном случае сигнальная система останется во

включенном состоянии и после того, как действие внешнего сигнала уже прекратилось. Подобные ошибки могут оказаться в прямом смысле фатальными. Так, например, форболовые эфиры, которые представляют собой структурные аналоги диацилглицерина, но в отличие от него в организме не расщепляемые, способствуют развитию злокачественных опухолей. Это происходит потому, что форболовые эфиры вовлекаются в работу некоторых сигнальных систем, которые регулируют клеточное деление с помощью диацилглицерина как вторичного мессенджера. Однако, имитируя действие диацилглицерина и обеспечивая передачу пролиферативного сигнала, они вовремя не расщепляются. В результате сигнальная система перестает чувствовать внешний сигнал и оказывается в перманентно включенном состоянии, а значит, пролиферация клеток перестает быть контролируемой. Приведем еще два термина, часто используемые в литературе на английском языке по клеточной сигнализации, но не имеющие аналогов в нашей литературе, - это "downstream" и "upstream". Первый из них переводится "вниз по течению" и подразумевает направление от первичного сигнала - через рецептор - ко вторичному мессенджеру и далее к внутриклеточной мишени, второй означает "вверх по течению" и указывает на противоположное направление.

УРОВНИ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА

В самом общем виде можно выделить три основных уровня регуляции клеточного ответа. Во-первых, это уровень транскрипции, здесь может регулироваться как собственно транскрипция, так и последующий процессинг предшественника информационной РНК, а также деградация предшественника и самой РНК. Во-вторых, уровень трансляции; регуляции может подвергаться собственно синтез белка, его последующий процессинг либо деградация предшественника или самого белка после завершения процессинга. В-третьих, это регуляция на уровне собственно зрелых белков, реализуемая следующими способами.

Molecular Switches

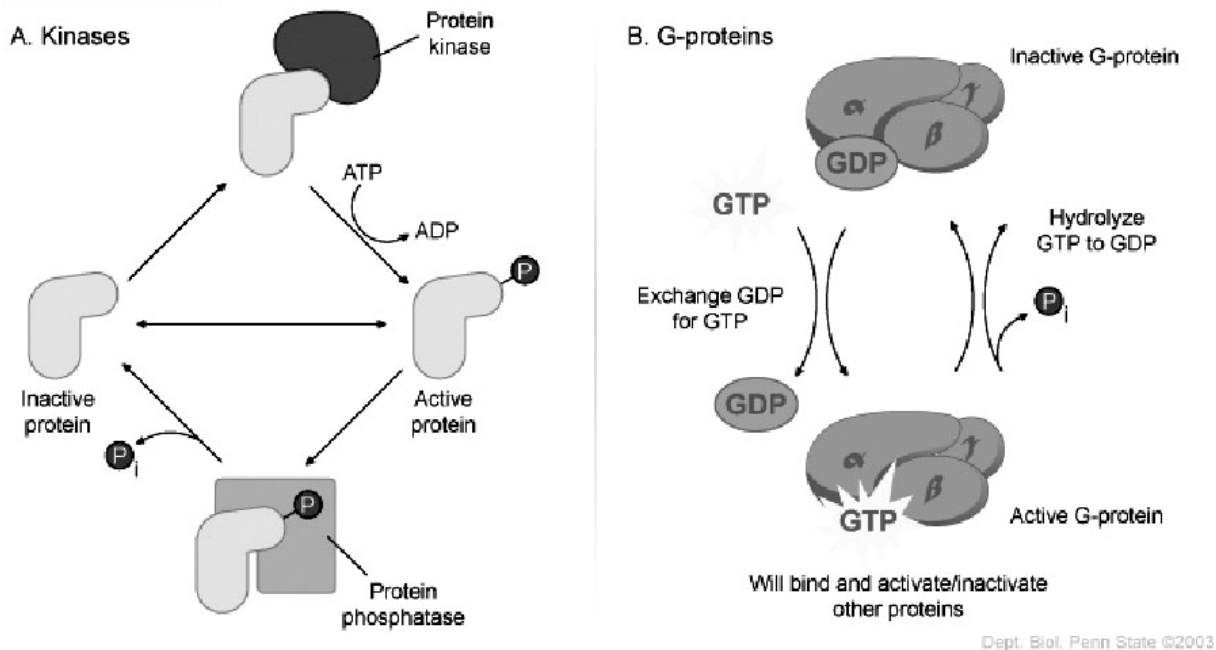


Рис 4. Регуляция на уровне зрелых белков

Обратимая ковалентная модификация белков. Примером может служить фосфорилирование гликогенфосфорилазы, катализируемое специальной протеинкиназой. Напомним, что протеинкиназы - это ферменты, включающие фосфатный остаток (остатки) в белки АТР-зависимым образом. Здесь же следует упомянуть и обратный процесс дефосфорилирования белков, катализируемый протеинфосфатазами. Оба этих разнонаправленных (фосфорилирование / дефосфорилирование) процесса - широко используемый клетками прием для изменения свойств самых разнообразных белков путем их ковалентной модификации. Другой важный способ состоит в ковалентном присоединении к полипептидам гидрофобных групп - метильных и некоторых ацильных, например остатков пальмитиновой кислоты.

Изменение каталитической активности и других свойств белков под действием лигандов. Число подобных лигандов велико, но для сигнальных систем наиболее важны вторичные мессенджеры: сАМР, сGMP, ДАГ, IP₃, ионы кальция. Кстати, каждый из них может регулировать активность некоторых протеинкиназ, а значит, и уровень фосфорилирования соответствующих белков-мишеней.

Модуляция свойств белков путем белок-белковых взаимодействий. В качестве примера можно привести сАМР-зависимую протеинкиназу. Молекула этого фермента, состоящая из двух каталитических и двух регуляторных субъединиц, неактивна потому, что каждая из регуляторных субъединиц в составе тетрамера служит ингибитором протеинкиназной активности каталитических компонентов. Однако в присутствии сАМР тетрамер диссоциирует на составные части, каталитические субъединицы освобождаются от ингибирования и фосфорилируют белки-мишени.

Изменение компартиментализации. Изменение компартиментализации (или, иначе, изменение местонахождения) белковой молекулы, например при ее переходе из цитоплазмы (один компартимент) на мембрану (другой компартимент), может быть причиной драматических изменений свойств белков, существенных для их сигнальных функций. Наверное, один из самых ярких примеров такого рода - широко распространенный белок p21ras, который имеет прямое отношение к злокачественной трансформации клеток человека и животных. Точнее, это относится к мутантным формам p21ras, тогда как нормальная его форма участвует в работе некоторых сигнальных систем, у которых первичным мессенджером служат ростовые факторы, регулирующие деление и дифференцировку клеток. Совсем недавно установлено, что p21ras, приняв сигнал от соответствующего рецептора, переходит в активированное состояние, и все, что он затем должен сделать, - это перевести специальную протеинкиназу, именуемую Raf, из цитоплазмы на мембрану. Добавим, что регуляция на уровне зрелых белков может происходить также и другими путями, например при их секреции, экзоцитозе и эндоцитозе.

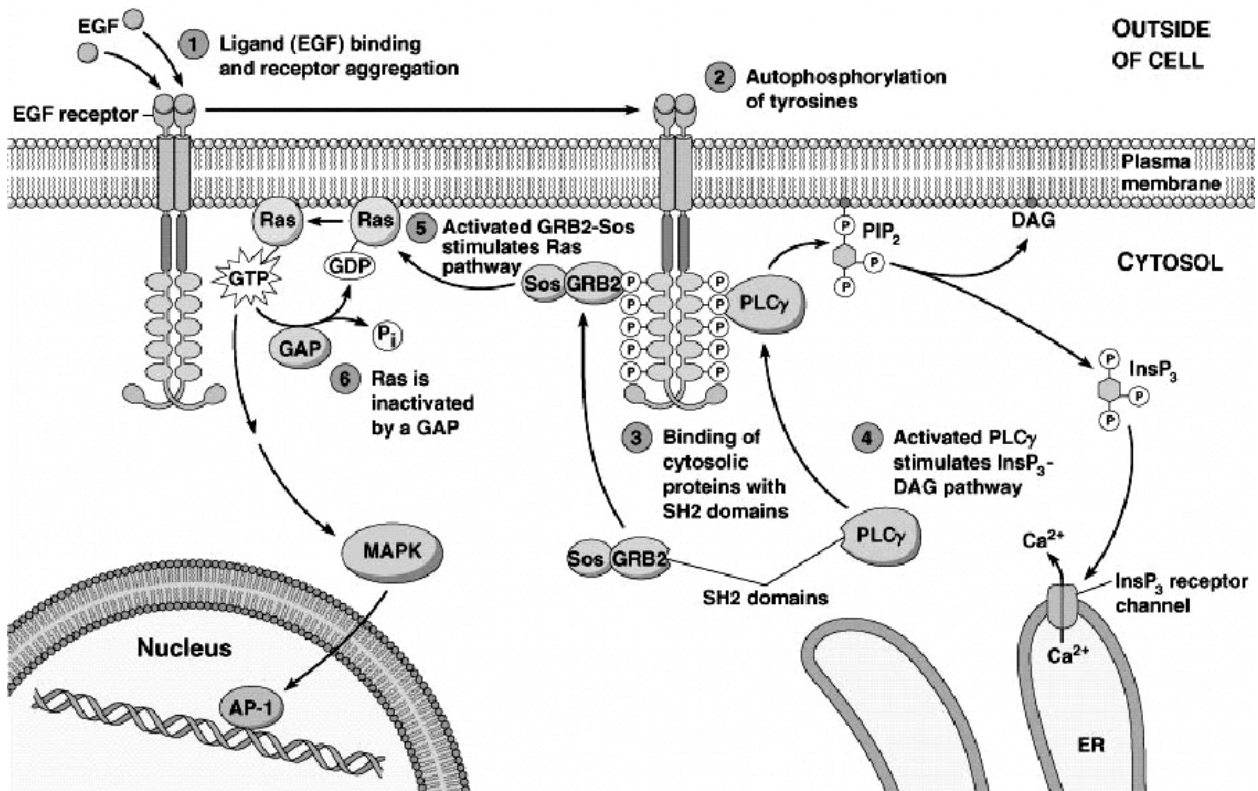


Рис 5. Пример внутриклеточного сигнального каскада.