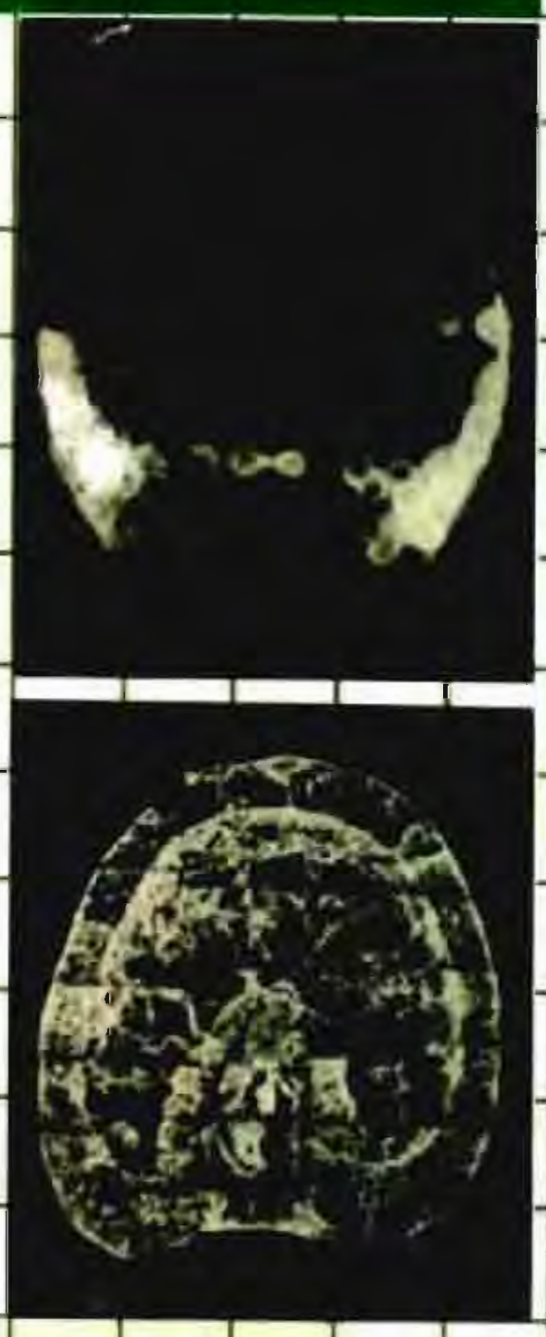
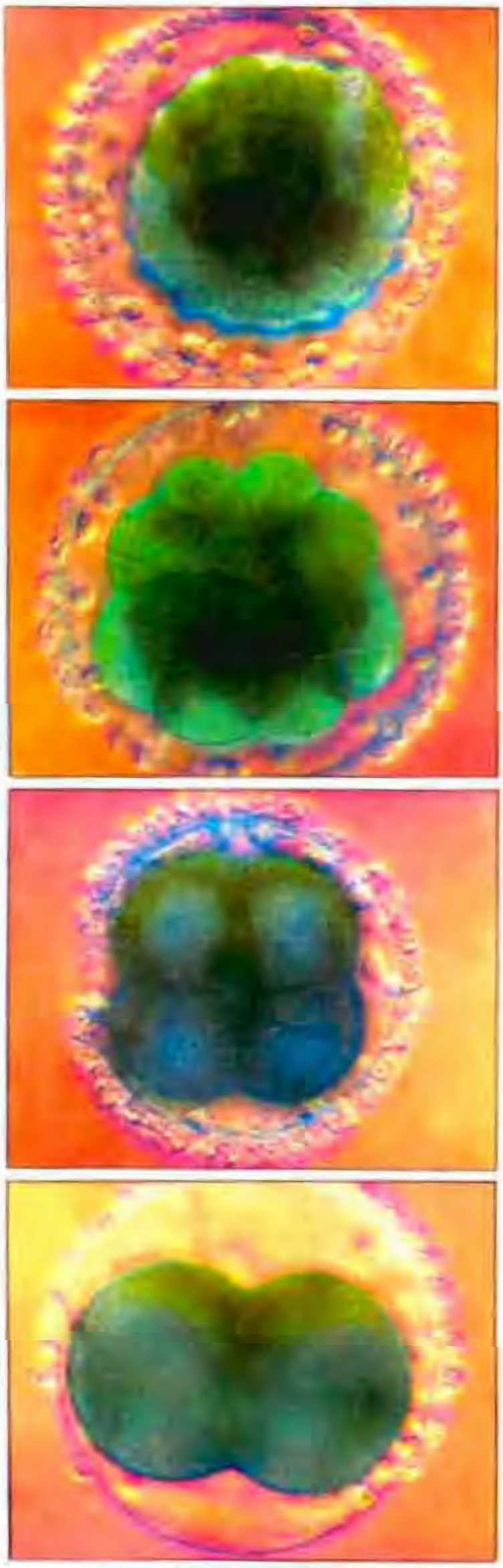
С. Гилберт

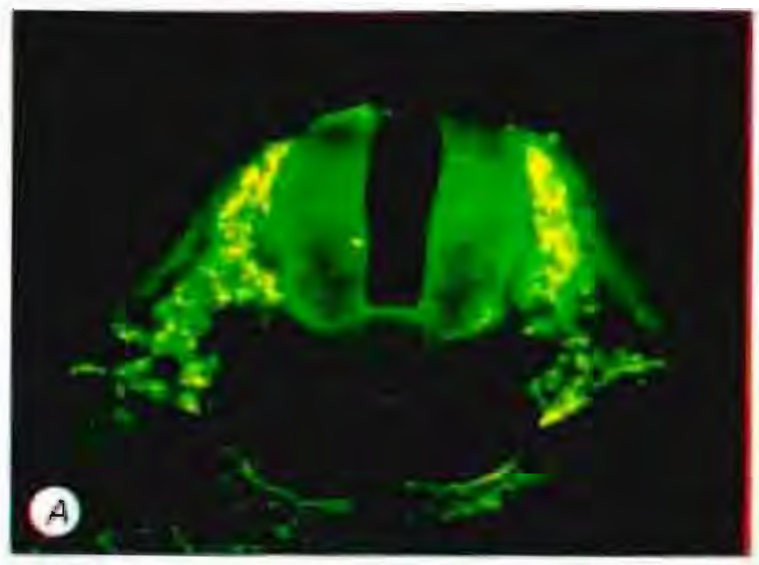
БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

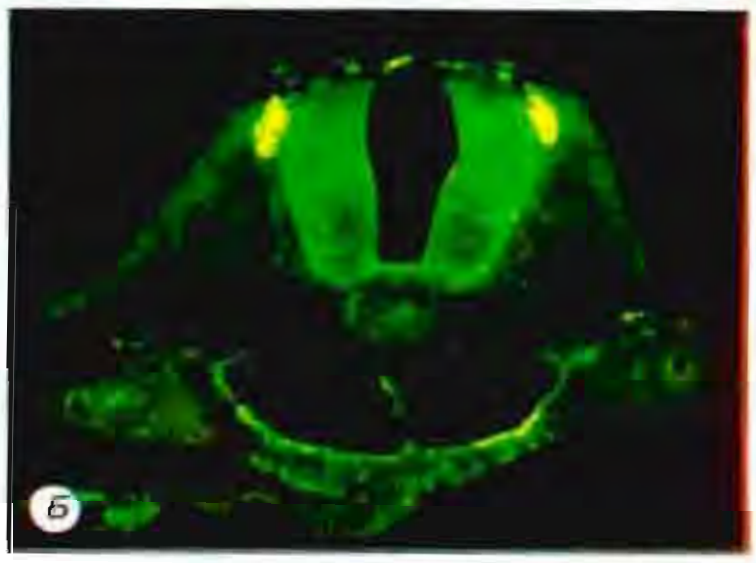
Издательство «Мир» Москва

1









Миграция клеток нервного гребня у куриного зародыша

Миграцию клеток нервного гребня у куриного зародыша можно проследить, окрашивая эти клетки флуоресцирующими антителами. Было обнаружено, что клетки нервного гребня (светло-зеленые) мигрируют через переднюю, а не через заднюю области сомитов. Такой особый характер миграции клеток нервного гребня играет какую-то роль в определении местоположения периферических нейронов. Глава 5. (Фотография любезно предоставлена M. Bronner-Fraser.)

Цитоплазматическая локализация у зародышей оболочников

В процессе дробления цитоплазма яйца разделяется на отдельные клетки. В области желтого серпа у зародышей *Styela* локализуется небольшая группа клеток, которая даст начало мускулатуре личинки. Глава 3. (Фотографии 2-, 4-, 16- и 64-клеточных зародышей любезно предоставлены J. R. Whittaker.)

Developmental Biology

Second Edition

SCOTT F. GILBERT
SWARTHMORE COLLEGE



Sinauer Associates, Inc. • Publishers
Sunderland, Massachusetts

С. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах

Перевод с английского
д-ра биол. наук А. С. Гинзбург,
д-ра биол. наук Г. М. Игнатьевой

под редакцией
д-ра биол. наук С. Г. Васецкого,
д-ра биол. наук Т. А. Детлаф

1

«Мир» Москва
1993

ББК 28.0
Г47
УДК 57

Гилберт С.
Г47 Биология развития: В 3-х т. Т. 1: Пер. с англ.— М.: Мир, 1993.— 228 с., ил.
ISBN 5-03-001831-X

Фундаментальное учебное и справочное пособие по относительно новой, быстро развивающейся дисциплине — биологии развития. На русском языке выходит в 3-х томах. В первом томе описаны оплодотворение, дробление, гаструляция и раннее развитие позвоночных.

Для эмбриологов, молекулярных биологов, генетиков, цитологов и др. специалистов-биологов, а также студентов биологических факультетов.

1907000000
Г 1909000000—264 подписное
041 (01)—93

ББК 28.0

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001831-X (русск.)
ISBN 5-03-001830-1
ISBN 0-87893-248-8 (англ.)

© 1988 by Sinauer Associates, Inc.

© перевод на русский язык, Гинзбург А. С., Игнатьева Г. М., 1993



Предисловие редакторов перевода

Биология развития — относительно молодая междисциплинарная наука, возникшая на основе достижений экспериментальной эмбриологии и цитологии, молекулярной биологии и молекулярной генетики, а также физиологии. Уже одно это показывает, сколь трудна и на первый взгляд неосуществима задача совместного анализа результатов перечисленных наук и осмысливания на их основе закономерностей индивидуального развития. Между тем такая синтетическая наука возникла, и объем доступных ее рассмотрению процессов развития все более расширяется, а число научных статей, журналов и книг по этим вопросам во всем мире лавинообразно увеличивается. В этих условиях написать учебник, в котором хотя бы выборочно были представлены достижения этой бурно развивающейся науки, не просто и в то же время очень важно. Скотт Ф. Гилберт успешно решил эту задачу.

Книга Гилберта во многих отношениях представляет собой уникальное руководство. Оно отличается широтой охвата явлений и комплексным подходом к их освещению. Рассматривая тот или иной процесс или период развития, автор использует данные, полученные при изучении развития зародыша разнообразными методами на всех уровнях его организации — от организменного до молекулярного. При этом пониманию приводимого в книге материала, во многом нового и трудного не только для студентов, которым автор адресует свою книгу, но и для специалистов, работающих в разных областях биологии развития, чрезвычайно способствуют ясность и логичность изложения, в частности принятое автором правило — разъяснять происхождение и значение любого малоизвестного или недавно введенного термина и кратко суммировать содержание отдельных глав, обосновывая переход от одной главы к следующей. Важную роль играют многочисленные иллюстрации, обстоятельные подписи к которым существенно дополняют текст.

Когда читаешь книгу Гилберта, то, несмотря на присущую ему строгость изложения научного материала, ощущаешь его взволнованность по поводу описываемых явлений, поразительного множества и сходства лежащих в их основе молекулярно-генетических процессов. Увлеченность автора не может оставить равнодушными и его читателей. Некоторые разделы книги будут с таким же увлечением читаться и начинающими, и опытными исследователями. Тот факт, что в книге изложены не только решенные вопросы, но и вопросы, требующие дальнейшего изучения, должен, как пишет автор, пробудить творческую инициативу читателя и привлечь молодых исследователей к участию в разработке проблем биологии развития.

Если заглянуть в предысторию современной биологии развития, то в нашей стране она связана с именами крупнейших ученых — Н. К. Кольцова, И. И. Шмальгаузена, И. А. Филипченко, Д. П. Филатова и М. М. Завадовского, труды которых заложили основы изучения причинных механизмов индивидуального развития уже в первые десятилетия XX века. В долысенковские и довоенные годы у нас возникли целые школы и большие коллективы научных сотрудников, разрабатывавших эти проблемы. Работы их пользовались мировой известностью. В военные и послевоенные годы, когда мировая наука сделала огромный скачок в область молекулярной биологии и молекулярной генетики, а позднее и в биологию развития, лишь немногим исследователям в нашей стране удавалось продуктивно работать в области экспериментальной зоологии, эмбриологии и генетики. К их числу принадлежит акад. Б. Л. Астауров, который при первой же возможности поставил вопрос о восстановлении исследований по проблемам индивидуального развития в нашей стране и в 1967 г. возглавил в системе Академии наук СССР Институт биологии развития, которому было присвоено имя Н. К. Кольцова. Институт издает журнал «Онтогенез» и серию обзорных монографий по разным проблемам биологии развития, а также отдельные статьи, книги и монографии в других отечественных и зарубежных изданиях.

В настоящее время биология развития как синтетическая наука изучается в разных научных учрежде-

ниях нашей страны и преподается в ряде университетов. Можно не сомневаться, что выход на русском языке прекрасно иллюстрированного и снабженного большими списками литературы учебника Гилберта окажется очень полезным не только для студентов и преподавателей, но и для широкого круга биологов и будет стимулировать дальнейший рост исследований в этой важной области знаний.

В заключение следует сказать, что на русском языке книга выходит в трех томах. Перевод сделан со второго издания. Однако ко времени редактирования нами третьего тома вышло уже третье переработанное и дополненное автором издание. С разрешения автора в третий том полностью включена новая 23-я глава, посвященная эволюционным аспектам эмбрионального развития; в остальные же главы третьего тома мы внесли авторские изменения и дополнения.

Детлаф Т. А., Васецкий С. Г.

Предисловие автора к русскому изданию

Биология развития — это, вероятно, наиболее широкая из всех биологических дисциплин. Исследователь, работающий в этой области, не ограничен каким-либо иерархическим уровнем организации: транскрипция глобиновых генов или возникновение жабер у аксолотля могут в равной степени привлекать его внимание. В своих исследованиях он не ограничен также какой-либо конкретной группой организмов или системой органов в организме. Можно сказать, что биология развития включает и интегрирует их все. Единственный путь возникновения всего лежит через развитие, и биология развития — ничто иное, как изучение каждой молекулы в клетке, клетки, ткани, органа и организма как функций времени. Теперь даже эволюцию рассматривают как функцию развития. Эволюция осуществляется путем наследственных изменений, происходящих в зародыше, и изменения, которые создали современную лошадь из ее пятипалого предка — это изменения, происходившие в зародыше. Таким образом, биология развития является наукой, охватывающей наибольший спектр биологических проблем.

Это также одна из самых своеобразных наук. Биология развития — наука о становлении, а не о существовании. Она свергает гегемонию взрослого организма. Взрослая особь — только конечная стадия длинного ряда взаимодействий, создавших ее. Для исследователя в области биологии развития процесс возникновения намного важнее и интереснее, чем процесс поддержания созданной формы. Биология развития является также областью (если можно назвать областью то, что объясняет все в живой природе), в которой постановка проблем имеет такое же большое значение, как и их решение. Нами исследована только незначительная часть процессов развития, и объяснять механизмы развития на основе этих знаний — примерно то же, что описывать жизнь океана, изучая оставшиеся после отлива лужи. Бóльшую часть процесса развития еще предстоит познать.

На протяжении последних сорока лет биология развития накапливала новые, все более утонченные методы исследования. В частности, объединение эмбриологии с молекулярной биологией и иммунологией дало в руки ученых могущественные орудия. Моноклональные антитела, меченные флуоресцентными соединениями, являются красителями, которые способны различать в пептиде индивидуальные аминокислоты. Радиоактивная рекомбинантная ДНК может обнаружить в популяции клеток одну единственную молекулу мРНК. Эти новые методы используются теперь для того, чтобы ответить на вопросы о процессах индукции и дифференцировки, которые эмбриологи-экспериментаторы задавали шестьдесят лет тому назад. Но это только начало революции, включающей соединение генетики развития с эволюционной биологией для создания новой теории эволюции, которая могла бы объяснить макроэволюционные изменения.

Зависимость между развитием и видообразованием привлекала к себе особенно большой интерес русских исследователей, начиная с К. Э. фон Бэра и А. Ковалевского. В самом деле, вопросы о связи зародышевого развития с эволюцией были поставлены А. Н. Северцовым и И. А. Филипченко в 1920-х годах как вызов эволюционной биологии. Как указал историк Марк Адамс, Филипченко был первым, кто ввел понятия «макроэволюция» и «микроэволюция». Генетик Филипченко полагал, что генетика может объяснить микроэволюционные изменения, однако объяснения причин макроэволюционных изменений следует искать в развитии. Морфолог Северцов также отмечал, что хотя генетика и достигла больших успехов, она не объяснила морфологических различий между высшими таксонами. Ученик Северцова И. И. Шмальгаузен увидел в пластичности развития решающий фактор дальнейших эволюционных изменений и постулировал механизмы возникновения различий в морфологии животных на основе изменений процессов развития. Однако, хотя еще Вильгельм Ру упоминал о необходимости «механики развития филогении», первые шаги в этом направлении были предприняты только Д. П. Филатовым (1876—1943), который перенес эволюционные поня-

тия из морфологии в экспериментальную эмбриологию. И если в других странах эти вопросы в значительной степени были преданы забвению, то в Советском Союзе они остались важнейшим компонентом эмбриологических программ. Эту важную традицию сохраняли, в частности, Т. А. Детлаф и А. С. Гинзбург, чьи работы по механике развития проводились в филогенетическом аспекте. Биология развития в ближайшем будущем будет стремиться найти молекулярные основы тех изменений в развитии, которые обусловливают морфологическую эволюцию. Поэтому я ожидаю, что советские биологи развития будут применять новые молекулярные и иммунологические методы, чтобы приблизиться к решению этих вопросов — вопросов, которые были частью их исследовательских программ с того времени, когда фон Бэр и А. Ковалевский связали изменения в развитии с возникновением новых таксонов. Поэтому мне особенно приятно, что эта книга переводится на русский язык.

В настоящем руководстве я сознательно стремился стереть некоторые традиционные границы, отделявшие биологию развития от эволюционной биологии и генетики. Я уверен, что в течение ближайшего десятилетия такие границы будут постепенно стираться. В книге также делается попытка с одинаковым вниманием рассмотреть морфологические и молекулярные подходы к биологии развития. В первой части книги особое внимание уделено морфологическим подходам и заложены основы для понимания результатов излагаемых исследований с помощью молекулярных методов. Вторая часть книги посвящена проблеме клеточной дифференцировки; в ней показано, как методы молекулярного анализа позволили по-новому взглянуть на механизмы возникновения различий между клетками. В третьей части рассматриваются вопросы, связанные с интеграцией молекулярного и морфологического подходов при изучении морфогенеза.

Я старался расположить материал в таком порядке, чтобы предшествующие главы могли служить основой для понимания последующих. В результате некоторые главы занимают необычное для них место. Так, книга начинается с оплодотворения и заканчивается гаметогенезом. Глава, посвященная оплодотворению, содержит большой раздел о строении гамет, рассмотрение же деталей процесса гаметогенеза отложено до конца книги, когда студенты смогут понять сложные вопросы, связанные с генной активностью и межклеточными взаимодействиями. Изложение проблем гаметогенеза в конце книги не только позволяет использовать его как наиболее яркий пример процессов развития, но и возвращает книгу к предмету, послужившему ее началом.

Книга не претендует на то, чтобы быть последним словом в рассматриваемой области. Ее цель — стимулировать дальнейшие исследования. Как полагал фон Бэр, «поощрение и направление самостоятельных исследований даст для научного воспитания зрелой молодежи гораздо больше, чем чрезмерное регламентирование. Любовь к предмету исследования — это та почва, на которой прорастает семя и растение приносит плоды».

Скотт Ф. Гилберт

Предисловие

В предисловии к первому изданию этой книги я уподобил процесс ее создания эмбриогенезу. Работу над вторым изданием можно сравнить с метаморфозом — периодом резких изменений в организме. При сопоставлении обоих изданий у читателей может сложиться впечатление, что за прошедшие четыре года либо чрезвычайно быстро возрос объем наших знаний, либо чрезвычайно быстро эволюировали животные.

Четыре года, прошедшие со времени публикации первого издания «Биологии развития»,— это период реализации возможностей молекулярной биологии. Она начала играть роль связующего звена между генетикой и эмбриологией, роль, которая ей и предназначалась. Многие нерешенные вопросы, забытые на долгие годы, были поставлены вновь, чтобы решить их с помощью новой стратегии и новых методов. Этот период знаменателен также и тем, что помимо давно известных и ключевых объектов биологии развития, таких, как морской еж, лягушка и курица, появились и заняли достойное место в исследованиях новые объекты, а именно дрозофила и нематода *Caenorhabditis elegans*. За эти четыре года, кроме того, были достигнуты огромные успехи в понимании процессов роста как на макроскопическом, так и на микроскопическом уровнях. Прогресс в аллометрических исследованиях и исследованиях по онкогенезу привел к трансформации (непреднамеренный каламбур) науки о закономерностях роста в одну из наиболее интересных и увлекательных. Благодаря расширению наших знаний о молекулярных аспектах развития возросла и наша оценка значения явлений развития в эволюции и экологии. Исследования в любой области биологии стали невозможными без знания основ биологии развития.

Сохраняя верность избранной метафоре, можно сказать, что текст книги подвергся метаморфозу. Значительные изменения внесены в несколько глав, они были реконструированы и дополнены. Главы о детерминации развития зародышей были пересмотрены в свете новых данных о существовании цитоплазматических детерминантов даже у животных с выраженным регуляционным типом развития. Коренным образом пересмотрен материал в главах, касающихся транскрипции генов у эукариот. Теперь эти главы отражают новое понимание механизмов активации генов, что позволит учащимся обсуждать (если у них возникнет такое желание) значение регуляции активности генов у зародышей на уровне транскрипции (гл. 11), не вдаваясь в детали механизмов этого процесса (гл. 12). Из разделов «Дополнительные сведения и гипотезы» выросли (подобно органам из клеток имагинальных дисков) две совершенно новые главы. Первая из них (гл. 18) посвящена генетике развития зародыша у дрозофилы, во второй (гл. 20) — обсуждаются механизмы, контролирующие пролиферацию клеток при нормальном развитии и в процессе онкогенеза.

Еще две новые черты характеризуют второе издание. Во-первых, на внутренних сторонах обложки книги помещены цветные макро- и микрофотографии. Они отражают современные данные, для получения которых решающими явились различия в окраске (или естественные, или индуцированные экспериментально). Во-вторых, эпилог, посвященный некоторым аспектам развития, оставшимся нерешенными, является попыткой преодолеть «синдром учебников», когда научные знания стремятся представить как нечто полностью завершенное.

В процессе метаморфоза меняется многое, но организм не теряет своей идентичности. Сходным образом многое от формы и содержания первого издания сохранилось и в этой новой версии книги. Как и прежде, в ней я стремился расположить главы в такой последовательности, чтобы студент мог получить концептуальную основу, облегчающую ему понимание материала каждой последующей главы. Делается также попытка представить биологию развития как результат непрерывных настойчивых усилий исследователей, основанный на данных многократных наблюдений и строго контролируемых экспериментов. Поскольку данные всегда субъективны, я привожу в книге многочисленные ссылки на оригинальные работы, так что каждый, кто хочет

подробнее ознакомиться с той или иной проблемой, сможет прочесть эти работы.

Некоторым концепциям, изложенным в первом издании, в новом издании уделено больше внимания. Более чем когда бы то ни было, я убежден, что современная биология развития требует того, чтобы в ней были достойно представлены (разумеется избирательно) как организменный, так и молекулярный подходы к ее изучению. Наиболее интересные области исследований лежат, вероятно, на пересечении эти двух подходов, и я старался в разной степени интегрировать их в каждой главе. Я попытался также сгладить некоторые границы, отделяющие биологию развития от эволюционной биологии и генетики, учитывая тот факт, что в течение прошедших четырех лет эти границы становились все менее и менее отчетливыми. Как и в первом издании, я увеличивал объем информации, включая разделы «Дополнительные сведения и гипотезы». Одни из этих разделов непосредственно относятся к материалу главы и связывают его с некоторыми сведениями из других областей биологии; другие же разделы содержат гипотезы и данные или слишком новые и неожиданные для биологов развития, или слишком противоречивые, чтобы включать их в основной текст.

Наконец, я бы хотел предостеречь студентов. В Лаборатории биологии моря в Вуде-Холе (шт. Массачусетс), где проводятся некоторые из наиболее важных эмбриологических исследований в США, можно увидеть написанный от руки плакат: «Изучай природу, не книги!». Этот призыв висит над главным входом в *библиотеку*, как напоминание о том, что мы пришли сюда, чтобы изучать развитие организмов, а не историю эмбриологических исследований. Этот призыв выдержан в том духе, что и афоризм Тзена, звучащий примерно так: если палец указывает на Луну, то только дурак может принять этот палец за Луну. Эту книгу и можно уподобить такому пальцу. Степень ее успеха будет оцениваться *по* тому, пробудит ли она у кого-нибудь желание отложить книгу в сторону и заняться изучением организмов.

Благодарности

Эта книга существенно выиграла от того, что многие исследователи нашли время внимательно прочитать черновую рукопись и сделать ценные замечания. К числу этих стойких и мужественных людей я отношу: P. Alberch, R. Auerbach, B. Baker, S. Black, H. и P. Bode, M. Bronner-Fraser, C. Buck, S. Carroll, B. Clark, J. Copeland, K. Crawford, C. Croce, K. Edwards, J. Fallon, G. Gilbert, M. Groudine, G. Grunwald, G. Guild, M. Hollyday, L. A. Jaffe, R. Keller, J. Lash, J. Lilien, A. Lopo, G. Loring, B. Migeon, S. Murphy, J. Newport, M. Oster-Granite, G. Phillips, R. Raff, U. Rutishauser, R. Schultz, B. Shur, R. Tuan, W. Wood.

Кроме того, я не смог бы закончить книгу, если бы огромное число исследователей не согласились любезно предоставить мне фотографии, опубликованные на ее страницах.

Это издание, подобно предшествующему, в большой степени обязано своим появлением многочисленным предложениям и замечаниям студентов, слушавших мои лекции по биологии развития и генетике развития. Поддержка, оказанная мне сотрудниками Свартморского колледжа, также сыграла большую роль в появлении этой книги. Я должен поблагодарить E. Horikawa и M. Spenser, ученых-библиотекарей, доставлявших и хранивших для меня некоторые недавние издания, которые они должны были бы отдать в переплет. G. Flickinger помогал мне в проявлении фотографий, когда это требовалось. D. Stasiunas и L. Lee записали мою рукопись на магнитные диски, а T. Blackburn — сотрудник кафедры английской литературы — находил способы перехитрить неизбежные импульсные помехи.

Это издание — раритет среди современных учебников. Оно подготовлено тем же коллективом, который работал над первым изданием. Как и четыре года назад, Andy Sinauer сумел собрать тех же самых замечательных людей, работать с которыми было для меня большой честью. Мне хотелось бы выразить ему и C. Wigg, J. Vesely, J. Simpson, J. и B. Woolsey и R. Albrecht благодарность за проявленные ими мудрость и творческий подход.

Я благодарю также членов моей семьи и друзей за их терпимость, которую они проявляли по отношению ко мне все время, пока писалась эта книга. Теперь труд завершен!

Скотт Ф. Гилберт

Часть I

Как происходит развитие

Глава 1

Введение в изучение развития животных

Я прекрасно помню то острое чувство удовлетворения и восторга, с которым я часами слушал фуги Баха... и мне часто приходило в голову, что наслаждение, получаемое от музыкальных произведений такого рода... созвучно с тем, что я получаю при изучении очень многих морфологических проблем: перед вами проходит тема из произведения старого мастера, которая прослеживается во всех своих бесконечных вариациях, появляется вновь и вновь и напоминает о том, что в многообразии есть единство.

ТОМАС ХАКСЛИ (1895)

Счастлив человек, способный распознать причины явлений.

ВЕРГИЛИЙ (37 до Р.Х.)

Введение

Аристотель, первый из известных нам эмбриологов, писал, что наука начинается с того момента, когда вы испытываете чувство изумления. «Именно это чувство побудило человека заняться философией, и именно оно лежит в основе познания». На протяжении всей истории своего существования человек не переставал изумляться, наблюдая события, которые происходят в процессе развития животных; эти события, столь удивительные и в то же время такие обычные, неизменно побуждали искать их причины. Простая процедура — вскрывание куриных яиц день за днем на протяжении 3-недельного периода инкубации — позволяет увидеть, как тонкий валик клеток постепенно превращается в сложный организм птицы. Аристотель проделал этот опыт и проследил за формированием основных органов. Это явление может поражать воображение практически любого человека, но только ученый пытается ответить на вопрос, как именно протекает развитие. Более углубленное понимание этого процесса не рассеивает ощущения чуда, но лишь усиливает его.

Многоклеточные организмы не возникают полностью сформированными. Напротив, они формируются в результате сравнительно медленного процесса прогрессивных изменений, который мы называем **развитием**. Почти во всех случаях развитие многоклеточного организма начинается с одной клетки — оплодотворенного яйца, или **зиготы**, которая митотически делится и дает начало всем клеткам организма. Наука, изучающая развитие животных, по традиции называется **эмбриологией**, поскольку развивающийся организм на стадиях от оплодотворенного яйца до рождения носит название **эмбриона** или **зародыша**. Однако развитие не останавливается в момент рождения, не останавливается оно даже по достижении взрослого состояния. У большинства организмов развитие не прекращается на протяжении всей их жизни. У человека каждый день происходит замена более одного грамма клеток кожи (более старые клетки слущиваются) и ежеминутно в течение жизни в костном мозге образуются миллионы новых эритроцитов. Поэтому в последние годы о биологии развития принято говорить как о науке, включающей изучение не только эмбриогенеза, но и других процессов развития.

В настоящее время биология развития представляет собой одну из наиболее захватывающих и быстро прогрессирующих областей биологической науки. Привлекательность биологии развития связана отчасти с ее проблематикой, поскольку именно теперь мы приближаемся к пониманию молекулярных механизмов развития животных. Другой причиной является объединяющая роль в отношении разных биологических наук, которую биология развития на-

чинает принимать на себя. Она создает основу для интеграции молекулярной биологии, физиологии, биологии клетки, анатомии, онкологии, иммунологии и даже эволюционных и экологических исследований. Изучение эмбрионального развития организмов стало необходимым для понимания любой другой области биологии.

Основные особенности развития

Развитие выполняет две основные функции. Во-первых, в процессе развития создается разнообразие клеток и определяется последовательность событий в пределах каждого поколения и, во-вторых, обеспечивается непрерывность жизни при переходе от одного поколения к другому. Первая функция включает образование в организме всех разнообразных типов клеток и их организацию. Одна-единственная клетка — оплодотворенное яйцо — дает начало мышечным клеткам, клеткам кожи, нейронам, лимфоцитам, клеткам крови и клеткам всех других типов. Возникновение клеточного разнообразия называют **дифференцировкой**; процессы организации дифференцированных клеток в ткани и органы называют **морфогенезом** (создание формы и структуры) и **ростом** (увеличение размеров). Вторая основная функция развития — это **размножение**: последовательное воспроизведение новых особей данного вида.

Основные стадии развития животных иллюстрирует рис. 1.1. Новый организм возникает в результате слияния генетического материала двух **гамет** — спермия и яйца. Это слияние, называемое **оплодотворением**, побуждает яйцо к развитию. Совокупность стадий, последовательно наступающих вслед за оплодотворением, носит название **эмбриогенеза**. В животном царстве существует удивительное разнообразие типов эмбриогенеза, однако бóльшая их часть представляет собой те или иные вариации четырех основных типов.

1. Непосредственно после оплодотворения происходит дробление. **Дробление** — это ряд чрезвычайно быстро протекающих митотических делений, в результате которых огромный объем цитоплазмы зиготы разделяется на многочисленные более мелкие клетки. Эти клетки называют **бластомерами**, и к концу дробления они обычно образуют шар, носящий название **бластулы**.

2. После уменьшения скорости митотических делений бластомеры совершают энергичные перемещения, в результате которых их положение относительно друг друга изменяется. Эту серию клеточных перемещений называют **гаструляцией**. В результате гаструляции у типичного зародыша обычно образуются три клеточных пласта, называемые **зародышевыми листками**. Из наружного листка — **эктодермы** — возникают эпидермис и нервная система; внутренний листок — **энтодерма** — образует выстилку пищеварительной трубки и принимает участие в образовании связанных с ней органов (поджелудочной железы, печени и др.), и органов дыхания; средний листок — **мезодерма** — дает начало нескольким органам (сердцу, почкам, гонадам), соединительной ткани (костям, мышцам, сухожилиям и форменным элементам крови).

3. После возникновения трех зародышевых листков клетки, взаимодействуя между собой и перемещаясь, образуют органы. Этот процесс носит название **органогенеза**. (У позвоночных органогенез инициируется взаимодействием эктодермы с подстилающими ее в определенной области мезодермальными клетками: в результате этого взаимодействия эктодерма образует нервную трубку, в дальнейшем преобразующуюся в головной и спинной мозг.) Во многих органах содержатся клетки, происходящие от разных зародышевых листков, и нередко наружную часть органа образуют клетки одного зародышевого листка, а внутреннюю — другого. Кроме того, при органогенезе некоторые клетки совершают длительные миграции от места, где они возникли, до места окончательной локализации. К таким мигрирующим клеткам относятся предшественники форменных элементов крови и лимфы, пигментные клетки и гаметы.

4. Как видно на рис. 1.1, часть цитоплазмы яйца дает начало клеткам-предшественникам гамет. Эти клетки называют **первичными половыми клетками**, и они обособляются для осуществления репродуктивной функции. Все остальные клетки тела называют **соматическими**. Это разделение на соматические клетки (дающие начало индивидуальному организму) и половые (обеспечивающие возникновение нового поколения организмов), как правило, представляет собой один из первых этапов дифференцировки, которая происходит при развитии животных. Первичные половые клетки в дальнейшем мигрируют в гонады, где они дифференцируются в **гаметы** — клетки, способные участвовать в оплодотворении, которое приводит к возникновению новой особи. Развитие гамет, называемое **гаметогенезом**, обычно завершается к моменту достижения организмом половой зрелости. В зрелом организме гаметы высвобождаются и после оплодотворения дают начало новой жизни. Тем временем взрослый организм постепенно стареет и умирает.

Наше эукариотическое наследие

Организмы разделяются на две основные группы по признаку наличия или отсутствия в их клетках ядерной оболочки. По одну сторону разделительной линии в этой классификации находятся **прокариоты** (от греч. karyon — ядро), включающие бактерий

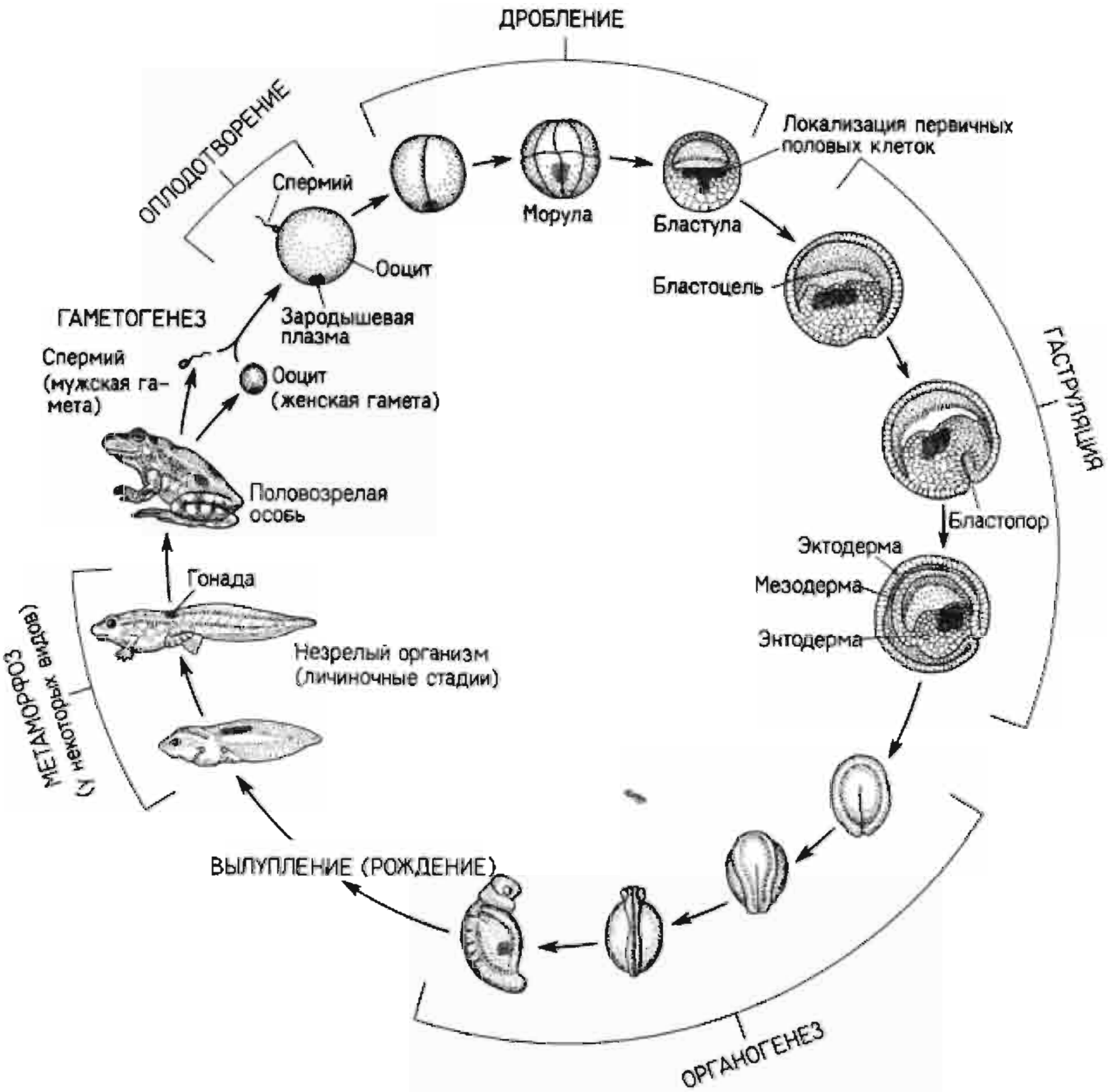


Рис. 1.1. Индивидуальное развитие животного на примере лягушки. Совокупность стадий от оплодотворения до вылупления (или рождения) называют эмбриогенезом. Область зародыша, из которой образуются половые клетки, выделена более темным цветом. Гаметогенез, завершающийся у половозрелого взрослого организма, у разных видов начинается на разных стадиях развития.

и сине-зеленые водоросли. Эти одноклеточные организмы лишены истинного ядра. По другую сторону находятся **эукариоты**, к которым относятся простейшие, животные, растения и грибы. Клетки эукариот имеют оформленное ядро, окруженное ядерной оболочкой и содержащее хромосомы. Это фундаментальное различие между эукариотами и прокариотами влияет на организацию и использование ими генетической информации. В обеих группах информация, необходимая для развития и осуществления обмена веществ, закодирована в последовательности нуклеотидов дезоксирибонуклеиновой кислоты хромосом (ДНК). Хромосома прокариот обычно представлена двойной спиралью ДНК кольцевой формы и небольшого размера — она содержит около миллиона пар оснований. В клетках эукариот обычно

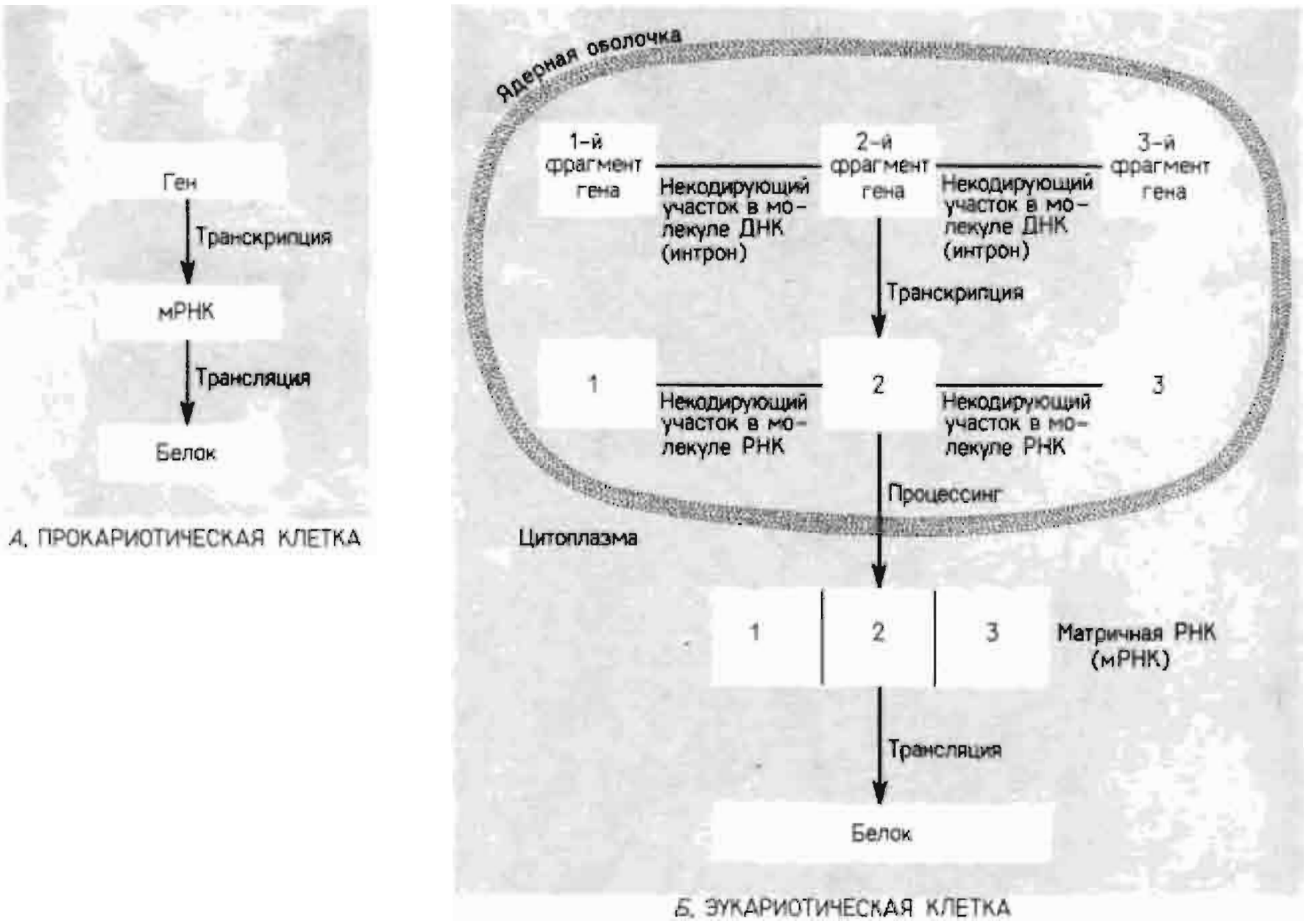


Рис. 1.2. Схема последовательных этапов синтеза белков. *А*. Экспрессия прокариотического (бактериального) гена: любой синтезируемый белковый продукт колинеарен кодирующим этот белок областям ДНК. *Б*. Экспрессия эукариотического гена: гены дискретны, ядерная оболочка отделяет ДНК от цитоплазмы.

имеется несколько хромосом, и количество ДНК даже у самых примитивных эукариотических простейших более чем в 10 раз превышает количество ДНК, имеющееся у наиболее сложно организованных прокариот. Кроме того, гены эукариот имеют более сложную структуру, чем гены прокариот. Последовательность аминокислот в белках у прокариот является прямым отражением нуклеотидной последовательности в молекуле их ДНК. В отличие от этого у эукариот кодирующая белок ДНК часто бывает разделена таким образом, что полная последовательность аминокислот в белке кодируется разобщенными ее участками (рис. 1.2). Принято считать, что вставочные некодирующие участки ДНК (интроны) необходимы для того, чтобы информационная рибонуклеиновая кислота (матричная РНК, или мРНК), кодирующая белок, могла пройти через ядерную оболочку (этот вопрос будет обсуждаться в гл. 13).

Эукариотические хромосомы также сильно отличаются от прокариотических. ДНК эукариот окружена специфическими белками, называемыми **гистонами**, благодаря которым она приобретает компактную структуру; у бактерий гистонов нет. Кроме того, в клетках эукариот в процессе митоза ядерная оболочка разрушается и два набора реплицированных хромосом равномерно распределяются между дочерними клетками (рис. 1.3). У прокариот клеточное деление происходит не по типу митоза; во-первых, не возникает митотического веретена, и, во-вторых, отсутствует ядерная оболочка, которая должна разрушаться при делении клетки. Дочерние хромосомы остаются прикрепленными к соседним участкам на клеточной мембране. Расстояние между этими участками увеличивается в результате роста клеточной мембраны между ними, так что хромосомы в конечном счете оказываются в разных дочерних клетках.

Механизмы генной регуляции у прокариот и эукариот различны. У обоих — и прокариот, и эукариот — РНК синтезируется путем транскрипции ДНК при участии ферментов, называемых РНК-

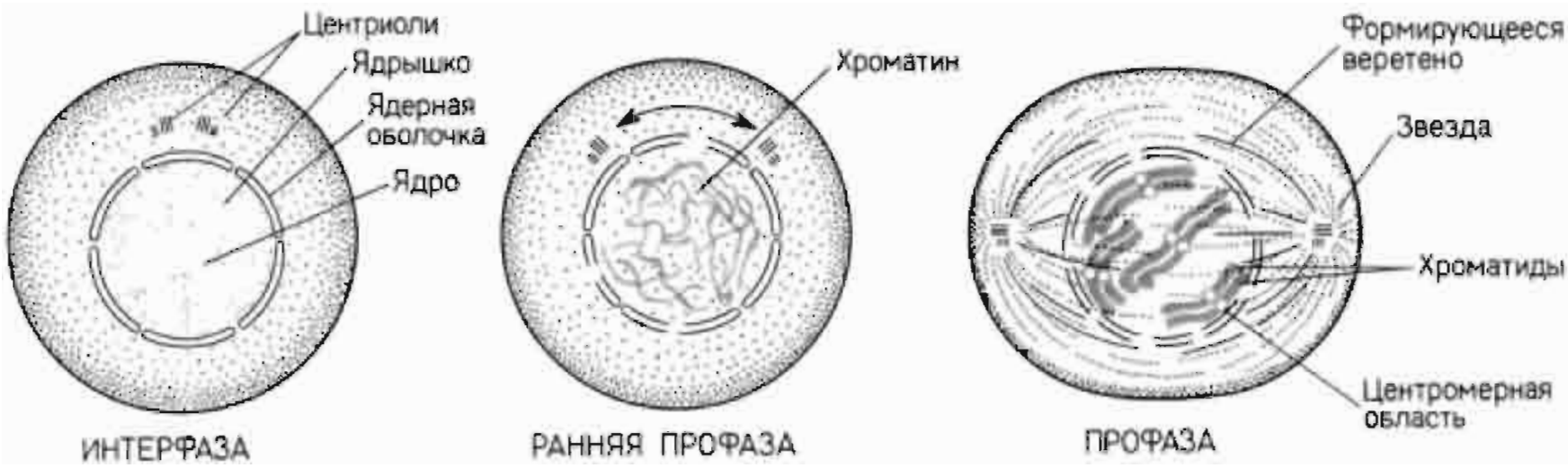


Рис. 1.3. Схематическое изображение митоза в животных клетках. Во время интерфазы при подготовке клетки к делению происходит репликация ДНК. Во время профазы ядерная оболочка разрушается и между двумя центриолями формируется веретено. На стадии метафазы хромосомы располагаются в экваториальной плоскости клетки. Когда наступает анафаза, удвоившиеся хромосомы (называемые хроматидами) расходятся. На стадии телофазы хромосомы достигают полюсов веретена, клетка начинает разделяться на две дочерние клетки. По числу и типу хромосом дочерние клетки идентичны материнской.

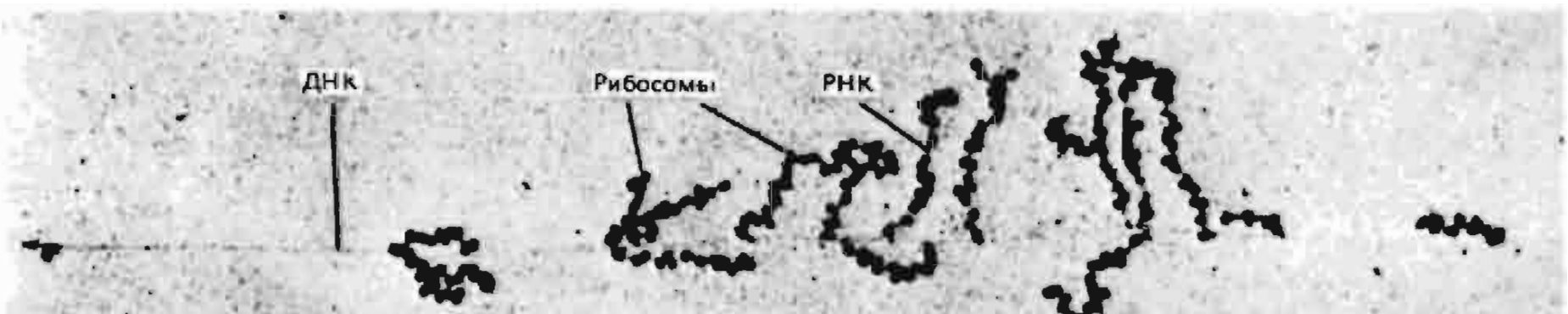


Рис. 1.4. Одновременность транскрипции и трансляции у прокариот. Участок ДНК *Escherichia coli* пересекает электронную микрофотографию по горизонтали. Транскрипты мРНК видны по обе стороны от нити ДНК. Рибосомы прикрепились к мРНК и синтезируют белки (которые не видны). Следует отметить, что длина синтезируемых мРНК увеличивается слева направо; это указывает на направление транскрипции. (С любезного разрешения O. L. Miller, Jr.)

полимеразами. У прокариот новосинтезированная мРНК немедленно начинает трансдироваться с образованием белка, в то время как другой конец молекулы еще продолжает транскрибироваться с ДНК (рис. 1.4). Таким образом, транскрипция и трансляция у прокариот осуществляются одновременно и координированно. Существование ядерной оболочки у эукариот делает возможным совершенно новый тип клеточной регуляции. Рибосомы, ответственные за трансляцию, находятся по одну сторону ядерной оболочки, тогда как ДНК, а также РНК-полимераза, необходимые для трансляции,— по другую ее сторону. В период между транскрипцией и трансляцией транскрибированная РНК должна претерпеть такие изменения, которые позволили бы ей пройти через ядерную оболочку. Регулируя выход мРНК в цитоплазму, клетка способна отобрать те из вновь синтезированных носителей информации, которые должны транслироваться. Таким образом, сложность организации достигает нового уровня, который, как мы увидим, чрезвычайно важен для развивающегося организма.

Развитие одноклеточных эукариот

Все многоклеточные эукариотические организмы произошли в процессе эволюции от одноклеточных простейших. У этих простейших впервые появились основные особенности, присущие развитию эукариот. Примитивные эукариоты дают первые примеры морфогенеза, контролируемого ядром, использования клеточной поверхности как посредника для кооперации отдельных клеток, появления полового размножения.

Регуляция морфогенеза при развитии ацетабулярии

В конце XIX в. еще не было доказано, что в ядре содержится информация, определяющая наследственность и направляющая развитие. Одним из лучших свидетельств в пользу такого представления были результаты опытов по разделению одноклеточных организмов на фрагменты, содержащие ядро, и безъядерные (Wilson, 1896). Когда различных простейших разрезали на множество частей, почти все эти части погибали. Однако фрагменты, содержащие ядро, оказывались жизнеспособными и регенерировали все сложные клеточные структуры (рис. 1.5).

Ядерный контроль клеточного морфогенеза и взаимодействие между ядром и цитоплазмой прекрасно иллюстрируют опыты на ацетабулярии (*Acetabularia*). Эта гигантская одиночная клетка (длиной в 2,5—5 см) состоит из трех частей: шляпки, стебелька и ризоида (рис. 1.6). Ризоид находится в основании клетки и прикрепляет ее к субстрату. Единственное клеточное ядро располагается в ризоиде. Большие размеры ацетабулярии и положение ее ядра позволяют исследователям удалить из клетки ядро и заменить его ядром другой клетки. В 30-х годах нашего века Геммерлинг (J. Hämmerling) воспользовался этими уникальными свойствами ацетабулярии и пересадил ядро одного вида (*Acetabularia mediterranea*) в энуклеированный ризоид другого (*A. crenulata*). Как видно из рис. 1.6, шляпки у этих видов очень сильно отличаются друг от друга. Геммерлинг обнаружил, что после того, как ядро одного вида трансплантировали в стебелек другого, новообразующаяся шляпка приобретала строение, свойственное

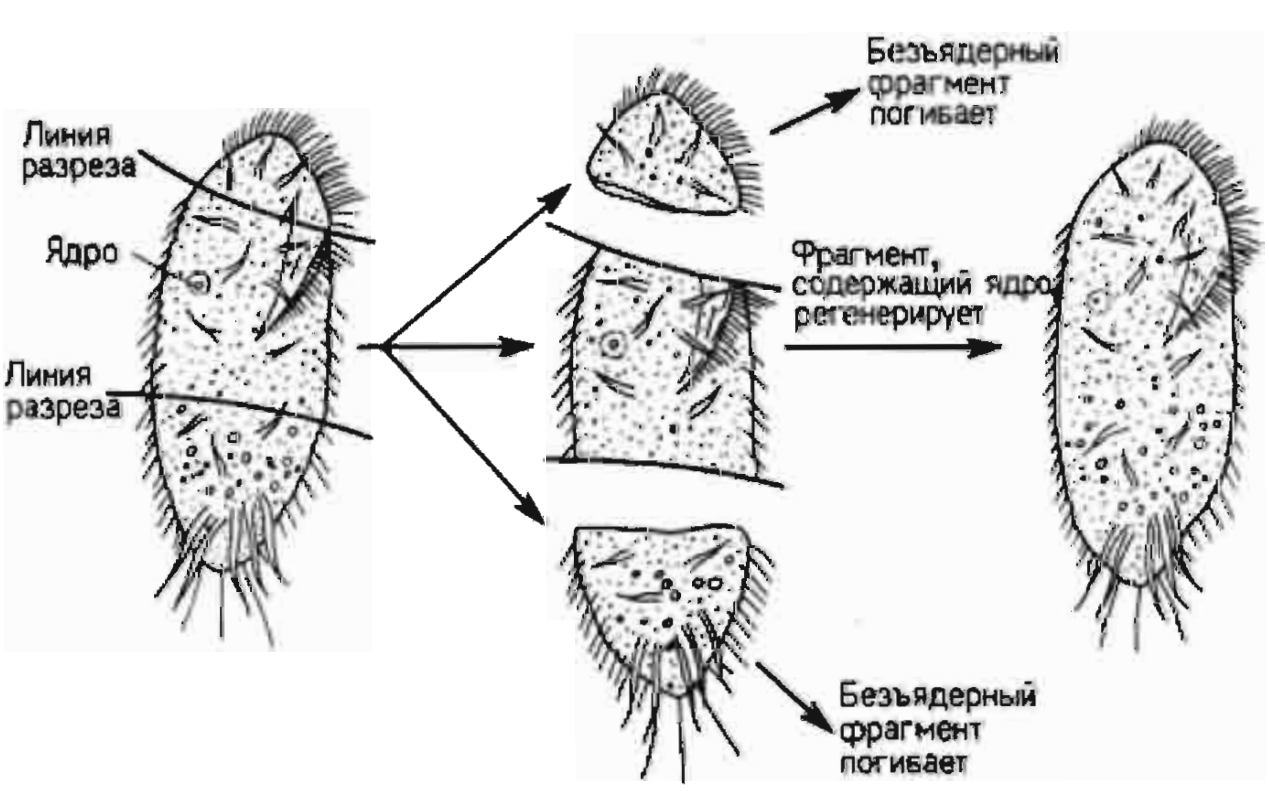


Рис. 1.5. Регенерация содержащего ядро фрагмента одноклеточного простейшего *Stylonychia*. Безъядерные фрагменты сохраняются в течение некоторого времени, но в конце концов погибают.

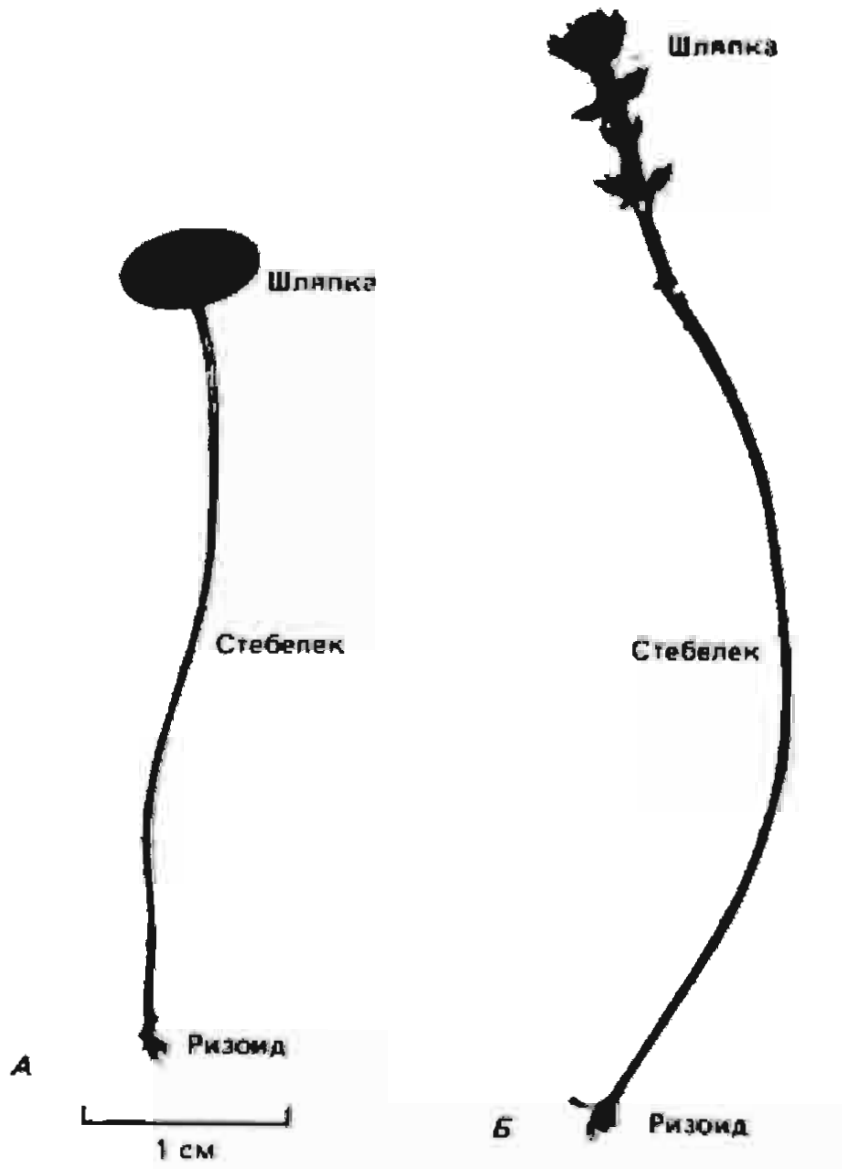


Рис. 1.6. Гигантская одноклеточная водоросль ацетабулярия. *А. Acetabularia mediterranea. Б. A. crenulata.* Ядро у этой водоросли располагается в ризоиде. (С любезного разрешения. H. Harris.)

виду-донору ядра (рис. 1.7). Таким образом было показано, что развитие ацетабулярии контролируется ядром.

Образование шляпки представляет собой сложный морфогенетический процесс, включающий синтез различных белков, которые должны распределиться между определенными частями клетки. Пересаженное ядро и в самом деле определяет образование видоспецифической шляпки, но для этого требуется несколько недель. Кроме того, если на ранней стадии развития ацетабулярии, до образования шляпки, удалить ядро, то через несколько недель образуется шляпка нормального строения, хотя организм в конце концов и погибнет. Это свидетельствует о том, что 1) ядро содержит информацию, определяющую тип образующейся шляпки (т. е. содержит генетическую информацию, которая обеспечивает синтез белков, ответственных за образование шляпки определенного типа), и 2) информация поступает в цитоплазму задолго до образования шляпки. Информация, поступившая в цитоплазму, не используется на протяжении нескольких недель.

Одна из гипотез, предложенных для объяснения этих наблюдений, заключалась в том, что ядро синтезирует стабильную мРНК, которая остается в цитоплазме в неактивном состоянии, пока не наступит время образования шляпки. Более поздние данные, опирающиеся на наблюдение Геммерлинга (опубликованное в 1934 г.), подтверждают эту гипотезу. Геммерлинг разрезал молодую ацетабулярию на несколько частей (рис. 1.8). Шляпка развивалась не только на том фрагменте, в котором содержалось ядро (как этого и ожидали), но, кроме того, на апикальном конце стебелька. На средней части стебелька шляпка не развивалась. Исходя из этого, Геммерлинг постулировал (примерно за 30 лет до того, как узнали о существовании мРНК), что инструкции для образования шляпки каким-то образом сохраняются в концевой части стебелька. Результаты более новых исследований (Kloppstech, Schweiger, 1975) показали, что мРНК ядерного происхождения накапливаются именно в этой области. Прибавление к морской воде, в которой растет ацетабулярия, рибонуклеазы (фермента, расщепляющего РНК) полностью подавляет образование шляпки. В случае энуклеированных клеток это — окончательный результат: коль скоро РНК разрушена, образования шляпки не происходит. Однако если в клетках ядро имеется, то после отмывания рибонуклеазы шляпка может обра-

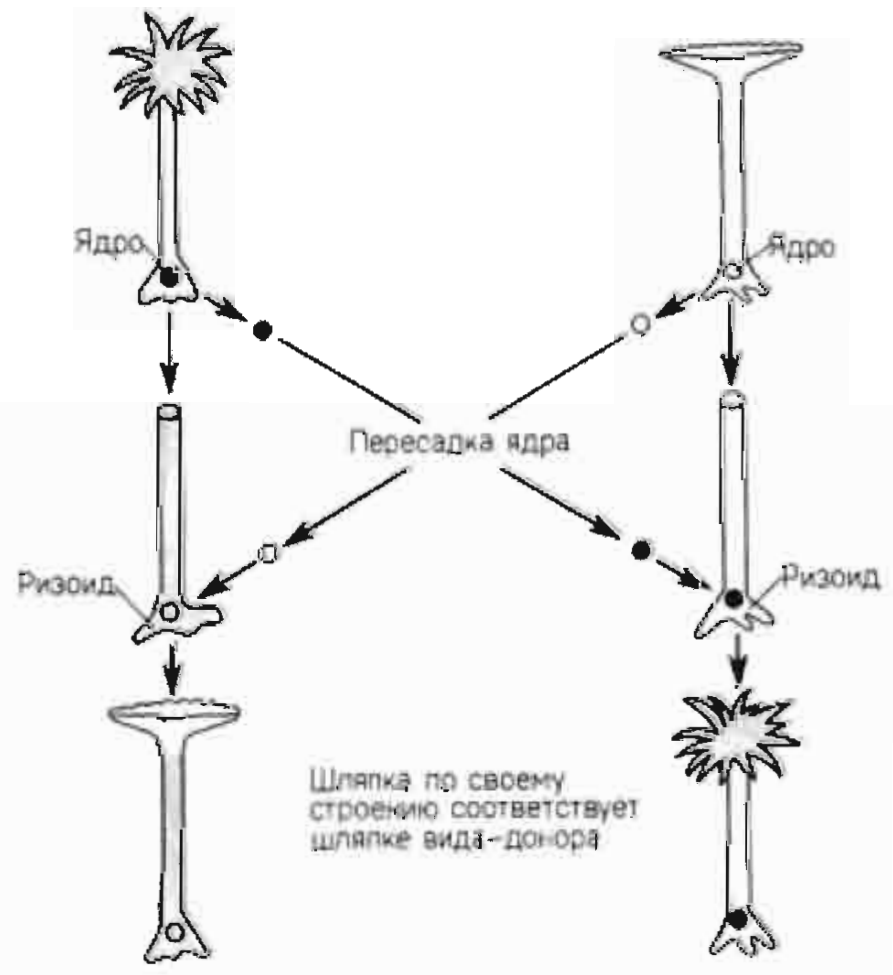


Рис. 1.7. Результат обмена ядрами между двумя видами ацетабулярии; шляпка удалена, ядра пересажены в энуклеированные ризоиды. Структуры, принадлежащие *A. crenulata*, выделены серым цветом.

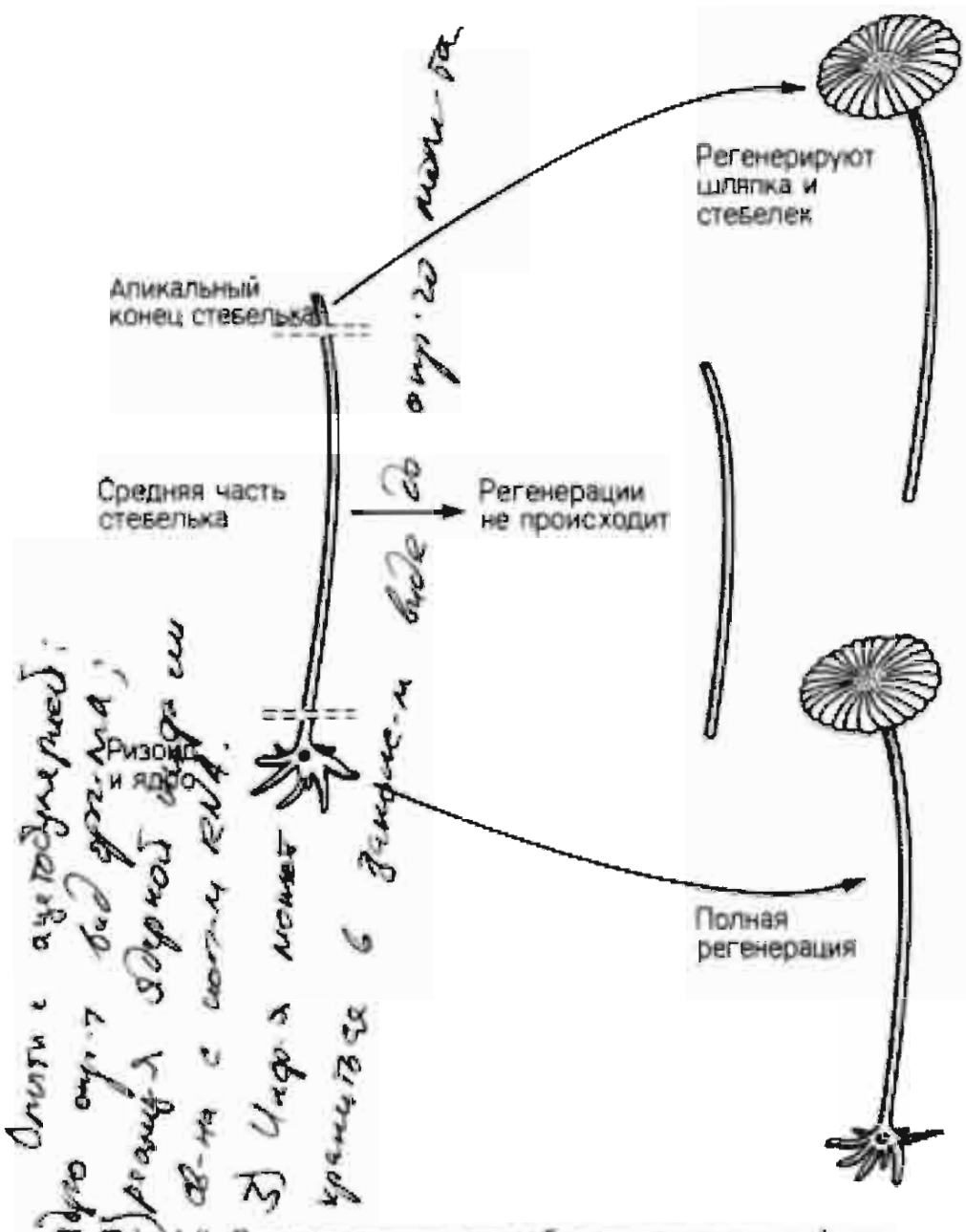


Рис. 1.8. Регенеративная способность различных фрагментов *Acetabularia mediterranea*.

зоваться; происходит это, по-видимому, в результате синтеза в ядре новой мРНК. Показано также (Garcia, Dazy, 1986), что синтез белка происходит особенно интенсивно в вершинной части клеток.

Из предыдущего обсуждения очевидно, что в формировании шляпки у ацетабулярии ядерная транскрипция играет важную роль. Следует отметить, однако, что цитоплазма также играет существенную роль в этом процессе. Хотя мРНК и находятся в цитоплазме, они не транслируются на протяжении недель. Что-то в цитоплазме регулирует использование поступившей информации. Следовательно, экспрессия шляпки контролируется не только транскрипцией ДНК в ядре, но также и цитоплазматическими факторами, влияющими на трансляцию.

Таким образом, у этого одноклеточного организма «развитие» контролируется как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях.

Дифференцировка у амебофлагелляты *Naegleria*

Одним из наиболее замечательных случаев «дифференцировки» у простейших является развитие *Naegleria gruberi*. Этот организм занимает особое место в систематике простейших, так как он имеет строение то амебы, то жгутиконосца (рис. 1.9). На протяжении большей части своего жизненного цикла *N. gruberi* представляет собой типичную амебу, питающуюся почвенными бактериями и размножающуюся путем простого деления. Однако, когда суспензия бактерий оказывается разбавленной (будь то дождевой водой или водой, добавленной экспериментатором), каждая особь *N. gruberi* быстро приобретает обтекаемую форму, и на переднем конце ее развиваются два длинных жгутика. Таким образом, вместо того чтобы иметь в одном организме несколько дифференцированных клеточных типов, одна эта клетка обладает разными клеточными структурами и биохимическими особенностями в разные периоды своей жизни.

Превращение амебы в жгутиконосца осуществляется за один час (рис. 1.10). За это время в амебе должны возникнуть как кинетический аппарат, который служил бы базальными тельцами для жгутиков, так и сами жгутики. Жгутики построены из многих белков, среди которых преобладает **тубулин**. Молекулы тубулина организованы в виде микротрубочек, которые объединены в структуру, способную обеспечивать движение жгутиков (рис. 1.11). Фултон и Уолш (Fulton, Walsh, 1980) обнаружили, что на стадии амебы тубулин для жгутиков у *Naegleria* отсутствует. Он образуется de novo после начала транскрипции ДНК в ядре. Чтобы показать это, исследователи воздействовали на транскрипцию на разных стадиях **актиномицином D** — антибиотиком, который избирательно подавляет синтез РНК. Если добавлять этот антибиотик до разбавления пищи, то он предотвращает синтез тубулина. Однако если актиномицин D добавить через 20 мин после разбавления, то тубулин все же синтезируется. Следовательно, можно предположить что мРНК для тубулина образуется в первые 20 мин после разбавления пищи и используется вскоре после этого. Такое предположение подтвердилось, когда было показано, что в суммарной мРНК, выделенной из амебоидной формы, не содержится определяемых количеств мРНК для тубулина жгутиков, а в препарате из дифференцированных клеток ее содержится много (Walsh, 1984).

В этом случае мы имеем прекрасный пример контроля развития на уровне транскрипции: ядро *Naegleria* отвечает на изменения окружающей среды, синтезируя мРНК для тубулина жгутиков. Мы здесь встречаемся с еще одним процессом, который играет

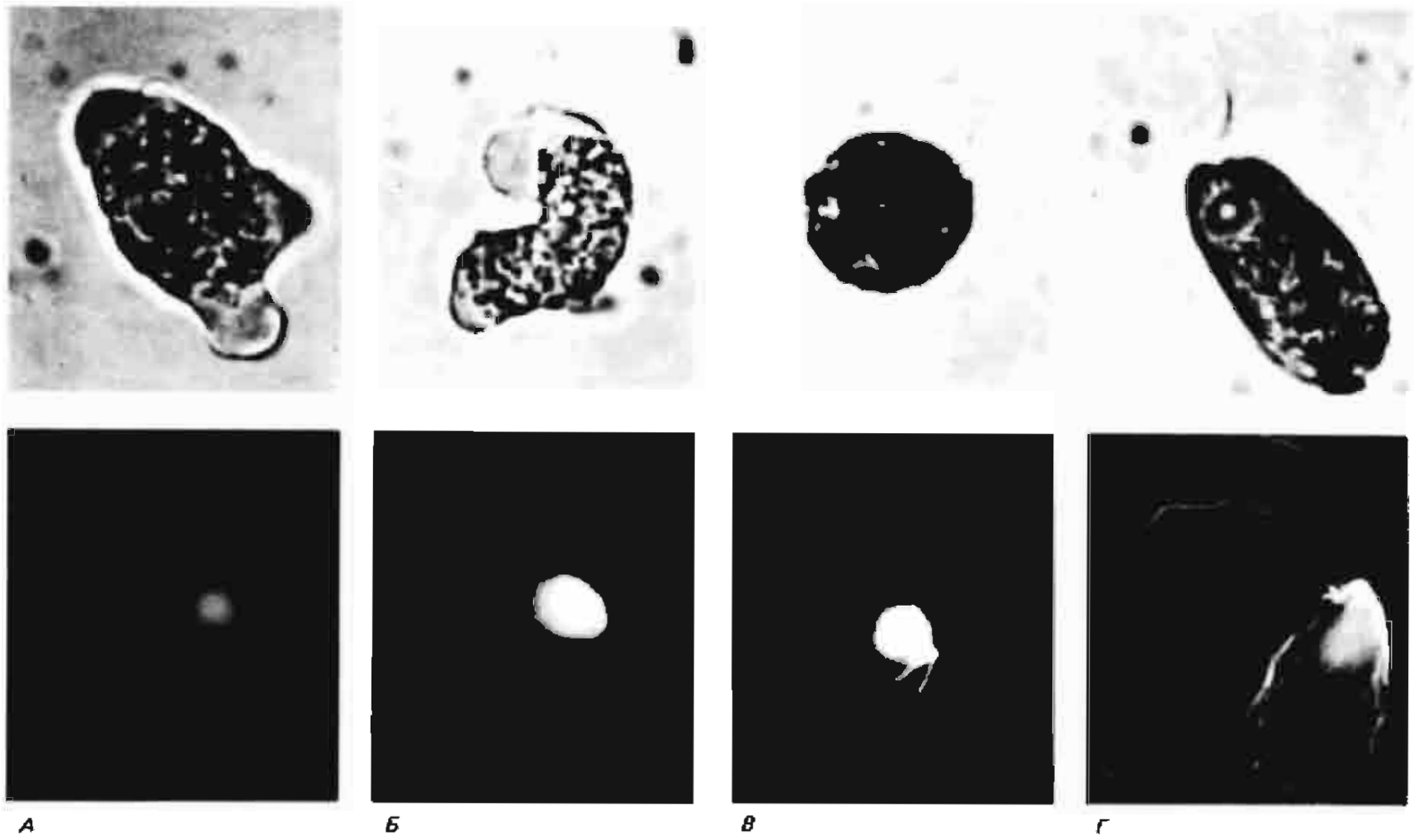
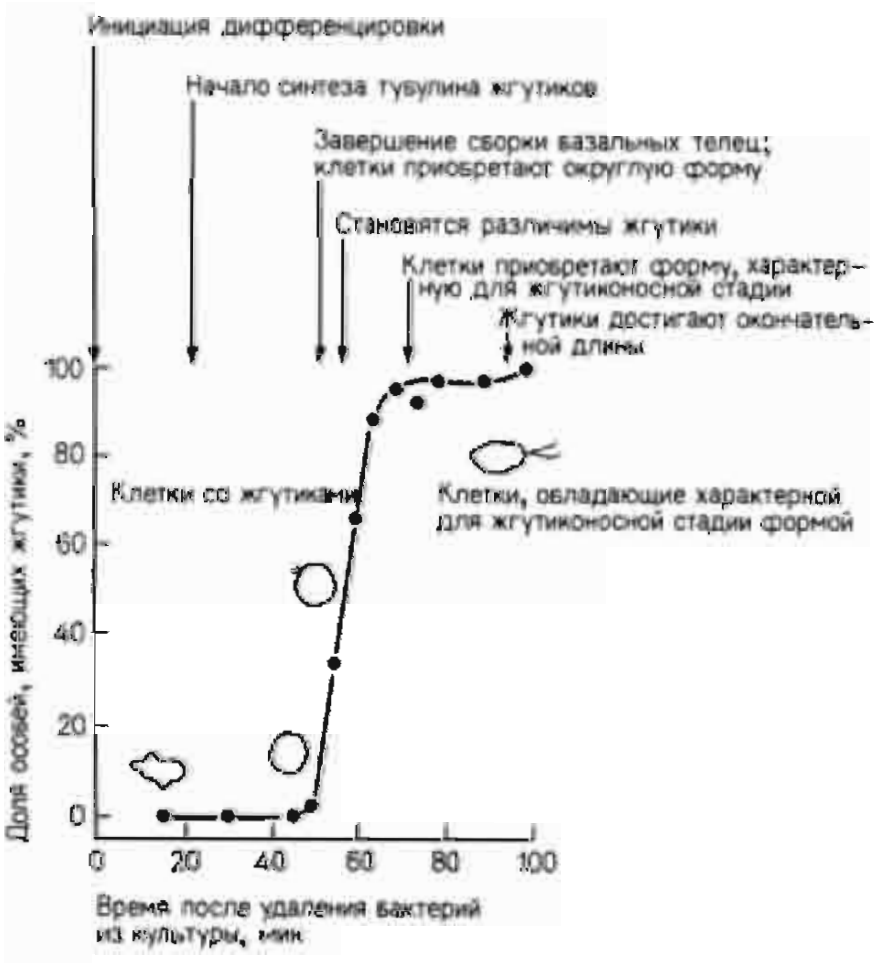


Рис. 1.9. Превращение амебоидной формы *Naegleria* в жгутиконосную. *Верхний ряд*: окрашивание раствором Люголя; *нижний ряд*: окрашивание флуоресцирующими антителами к тубулину микротрубочек. *А*. 0 мин. *Б*. Через 25 мин; начинается синтез нового тубулина. *В*. Через 70 мин; возникают различимые жгутики. *Г*. Через 120 мин; жгутики полностью сформированы; организм приобретает обтекаемую форму. (Из Walsh, 1984; с любезного разрешения C. Walsh.)



важную роль при развитии других животных и растений, а именно со сборкой молекул тубулина для образования жгутика. Этот процесс, при котором тубулин полимеризуется в микротрубочки, а микротрубочки собираются в упорядоченную структуру, встречается в природе повсеместно. У млекопитающих он наблюдается при образовании жгутика спермия и ресничек в клетках спинного мозга и дыхательного тракта. Контроль на **посттрансляционном уровне**, когда белки взаимодействуют между собой, создавая в клетке организованные структуры, будет более подробно рассмотрен позднее. Итак, мы видим, что развитие одноклеточных эукариот регулируется на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях.

Рис. 1.10. Дифференцировка фенотипа жгутиконосца у *Naegleria*. Амеб, выращенных в обогащенной бактериями среде, в момент 0 отмывали от бактерий. Через 80 мин почти у всех особей популяции развились жгутики.

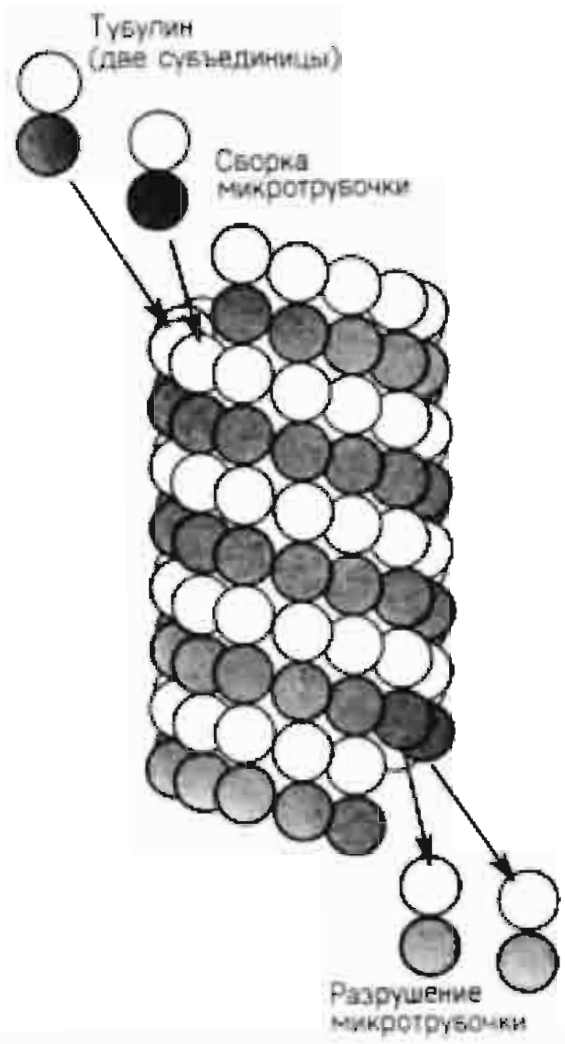


Рис. 1.11. Сборка и разрушение микротрубочек путем полимеризации и деполимеризации димеров тубулина.



Рис. 1.12. Пол у бактерий. Некоторые бактериальные клетки покрыты многочисленными ворсинками, или пилями; с помощью специальных половых пилей, или фимбрий, они могут передавать свой генетический материал клетке-реципиенту, лишенной этих образований. На этом рисунке половая ворсинка визуализирована вирусными частицами, которые специфическим образом связываются с ней. (С любезного разрешения C. C. Brinton, Jr. и J. Carnahan.)

Происхождение полового размножения

Половое размножение — это еще одно изобретение простейших, которое оказало глубокое воздействие на более сложные организмы. Необходимо отметить, что половой процесс и размножение — суть два различных явления, которые могут существовать отдельно друг от друга. Размножение — это возникновение новых особей, половой процесс — это создание новых комбинаций генов, происходящих от двух разных особей. Размножение при отсутствии полового процесса свойственно тем организмам, которые размножаются простым делением; когда происходит деление амебы или отпочковывание новых особей гидры, никакого перераспределения генов не наблюдается. У одноклеточных организмов нередко



встречается также половой процесс без размножения. Бактерии могут передавать гены от одной особи другой с помощью особых половых ворсинок, называемых **половыми пилями**, или **фимбриями** (рис. 1.12). Эта передача осуществляется независимо от размножения. Простейшие также способны перераспределять гены независимо от размножения. Так, например, у парамеций размножение происходит путем простого деления надвое, а половой процесс — путем **конъюгации** (рис. 1.13). Две парамеции соединяются своими ротовыми аппаратами, и между ними возникает цитоплазматический мостик. У обеих парамеций макронуклеус (осуществляющий регуляцию метаболических процессов) разрушается, тогда как микронуклеус подвергается мейозу, за которым следует митоз; возникает восемь гаплоидных микронуклеусов, из которых все, за исключением одного, разрушаются. Оставшийся микронуклеус делится снова и образует два микронуклеуса — стационарный и мигрирующий. Каждый мигрирующий микронуклеус перемещается по цитоплазматическому мостику в соседний конъюгант и сливается с его стационарным микронуклеусом («оплодотворяет» его), благодаря чему в обеих клетках возникает новое диплоидное ядро. Когда конъюгирующие партнеры расходятся, это диплоидное ядро делится, давая начало новому микронуклеусу и новому макронуклеусу. При этом парамеции не размножаются, происходит только половой процесс.

У одноклеточных эукариот наблюдается и объединение этих двух независимых явлений, полового процесса и размножения; в этом случае говорят о **половом размножении**. На рис. 1.14 представлен жизненный цикл хламидомонады (*Chlamydomonas*). Этот организм обычно существует в виде гаплоидной формы подобно гаметам млекопитающих, т. е. каждая хромосома у хламидомонады имеется в единственном числе. Однако особи каждого вида по поведению при спаривании подразделяются на две группы — *плюс* и *минус*. Когда особи разных групп встречаются, происходит объединение их цитоплазмы и слияние ядер с образованием диплоидной зиготы. Эта зигота является единственной диплоидной клеткой в жизненном цикле хламидомонады; осуществляя в конечном счете мейоз, она образует четыре новые клетки. Здесь мы имеем дело с половым размножением, поскольку в процессе мейоза происходит перераспределение хромосом, и вместе с тем возникает большее число особей. Обратите внимание, что при таком типе полового размножения простейших гаметы морфологически идентичны — различия между спермием и яйцом еще не возникло.

При возникновении в эволюции полового размножения прогресс был достигнут в двух отношениях. Во-первых, возник механизм мейоза (рис. 1.15), с помощью которого диплоидный набор хромосом редуцируется до гаплоидного состояния (этот процесс будет подробно обсуждаться в гл. 22). Во-вторых, возник механизм, благодаря которому особи двух типов, различающиеся по полу, узнают друг друга. Узнавание происходит первоначально на уровне мембран жгутиков (рис. 1.16.; Goodenough, Weiss, 1975; Bergman et al., 1975). Агглютинация жгутиков делает возможным установление контакта между особыми участками на клеточных мембранах. Эти специализированные участки содержат специфические для особей разного типа компоненты, благодаря которым осуществляется слияние цитоплазмы этих особей. После агглютинации жгутиков *плюс*-особи инициируют слияние, образуя «трубку оплодотворения», сходную с той, которую мы встретим у спермиев. Эта трубка контактирует и сливается со специализированным участком на поверхности *минус*-особи. Интересно, что тот же механизм, который используется для выдвижения этой трубки,

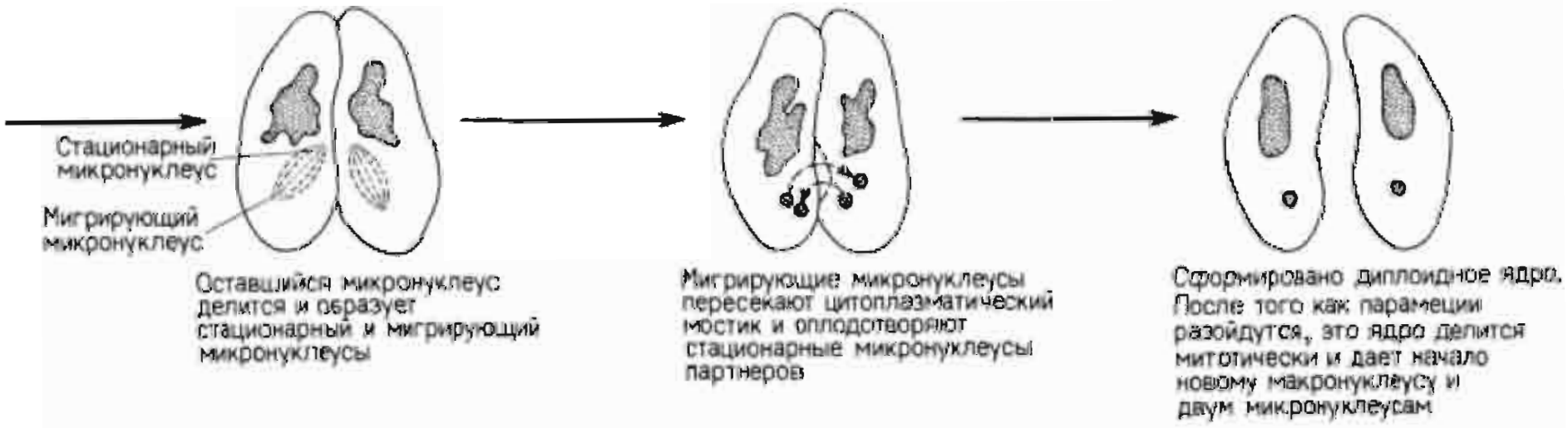


Рис. 1.13. Конъюгация у парамеций. Две парамеции могут обмениваться генетическим материалом; в результате у каждой из них набор генов становится отличным от того, с которым они приступили к конъюгации. (По Strickberger, 1985.)

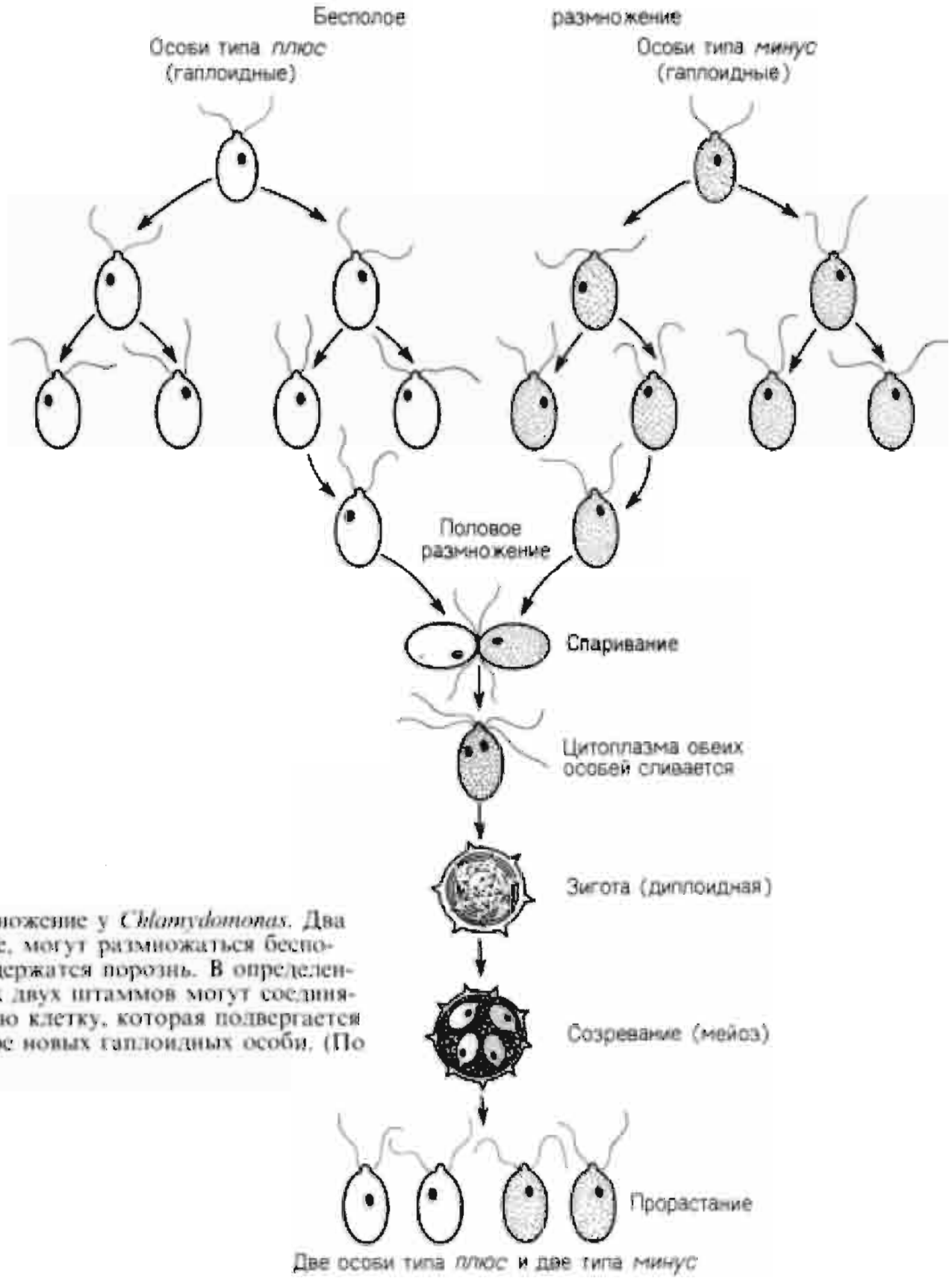


Рис. 1.14. Половое размножение у *Chlamydomonas*. Два штамма, оба гаплоидные, могут размножаться бесполым путем, если они содержатся порознь. В определенных условиях особи этих двух штаммов могут соединяться, образуя диплоидную клетку, которая подвергается мейозу и образует четыре новых гаплоидных особи. (По Strickberger, 1985.)

полимеризация белка актина — действует и при формировании выростов у спермиев и яиц морского ежа. В следующей главе мы увидим, что узнавание и слияние спермия с яйцом поразительно сходны с процессами, описанными у хламидомонад.

Для одноклеточных эукариот, по-видимому, характерны основные элементы процессов развития, которые свойственны более сложным организмам, относящимся к другим типам животных: 1) процессы синтеза в клетке контролируются на транскрипционном, трансляционном и посттрансляционном уровнях; 2) существует механизм, обеспечивающий выход РНК через ядерную оболочку; 3) присущее одноклеточным эукариотам строение отдельных генов и хромосом сохраняется на протяжении всей эволюции эукариот; 4) митоз и мейоз в процессе эволюции становятся более совершенными; 5) половое размножение включает кооперацию между отдельными клетками, которая у многоклеточных организмов приобретает даже большее значение.

Колониальные эукариоты: эволюция дифференцировки

Одним из наиболее важных экспериментов эволюции было создание многоклеточных организмов.

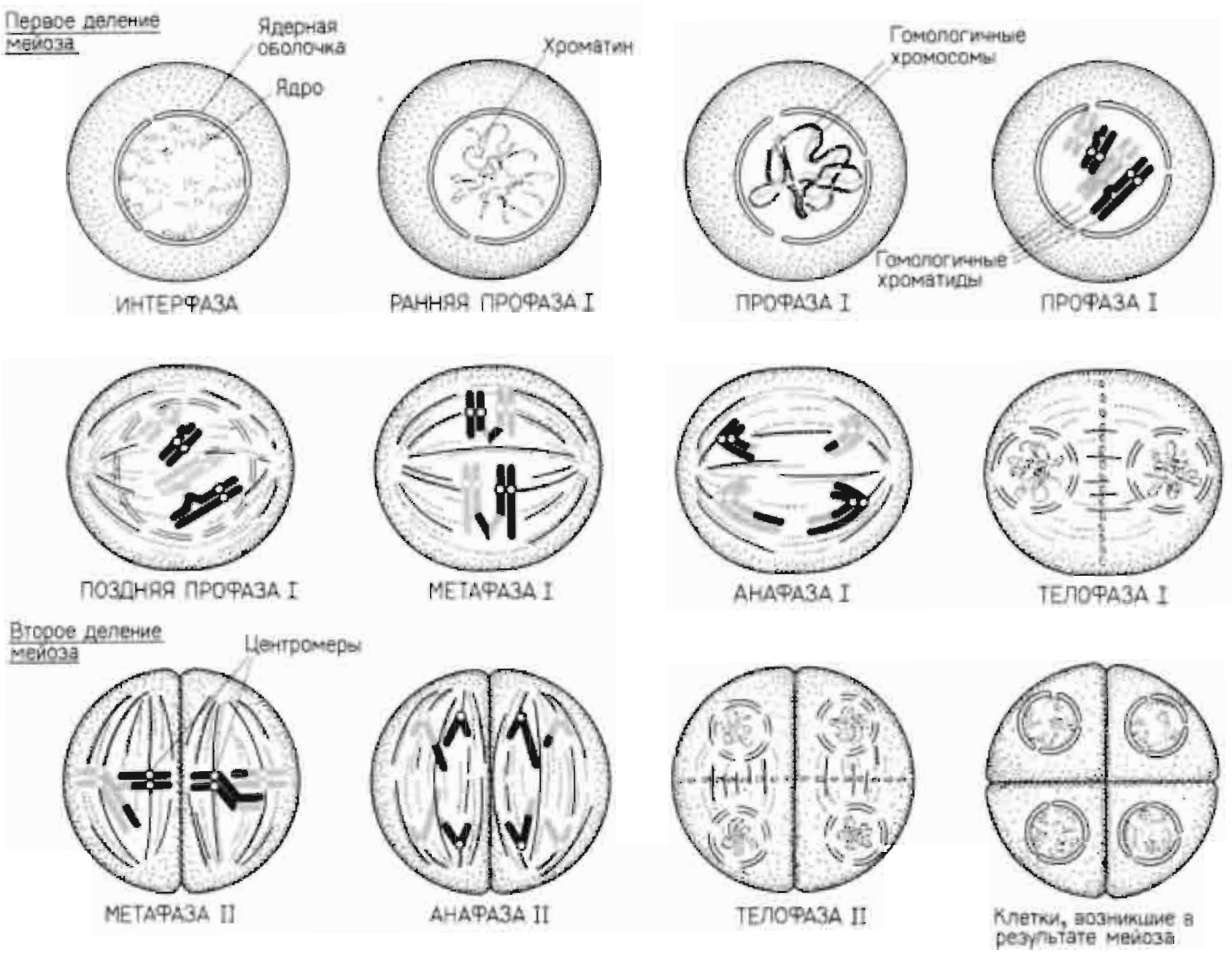


Рис. 1.15. Итоговая схема мейоза. ДНК и связанные с ней белки реплицируются во время интерфазы. Во время профазы ядерная оболочка разрушается и гомологичные хромосомы (каждая из которых состоит из двух хроматид, соединенных центромерой) располагаются попарно. В это время между четырьмя гомологичными хроматидами может происходить обмен участками. После метафазы I две исходно гомологичные хромосомы расходятся в разные клетки. При втором делении центромера расщепляется, и в результате в каждой новой клетке оказывается одна копия каждой хромосомы.





Рис. 1.16. Двухступенчатое узнавание при копуляции у *Chlamydomonas*. *А*. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа (× 7000), на которой видна копулирующая пара. Взаимодействующие жгутики обвиваются один вокруг другого, слипаясь концами (*стрелки*). *Б*. Микрофотография цитоплазматического мостика, соединяющего две особи, в просвечивающем электронном микроскопе (× 20 000). Микрофиламенты простираются от клетки-донора (*внизу*) к клетке-реципиенту (*наверху*). (Из Goodenough, Weiss, 1975; Bergman et al., 1975; с любезного разрешения U. Goodenough.)

Возникновение многоклеточности шло, по-видимому, несколькими путями; здесь мы рассмотрим только два из них. Первый путь заключается в упорядоченных делениях репродуктивной клетки и последующей дифференцировке новообразованных клеток. Этот путь возникновения многоклеточности можно проследить на замечательной серии организмов, относящихся к порядку Volvocales.

Volvocales

Наиболее просто устроенные организмы среди Volvocales представляют собой совокупность большого числа клеток, по строению напоминающих хламидомонад, однако у более высокоорганизованных членов этого порядка появились клетки совершенно иного типа. У единственного представителя наиболее примитивного рода вольвоксовых *Oltmannsiella* — четыре клетки, сходные с *Chlamydomonas*, расположены в ряд и заключены в студенистый матрикс. У другого рода (*Gonium*; рис. 1.17) в результате деления одной клетки образуется плоская пластинка, состоящая из 4—16 клеток, каждая из которых имеет собственный жгутик; все жгутики находятся на одной и той же стороне пластинки. У близкого рода *Pandorina* 16 клеток образуют шар, а у *Eudorina* подобный шар содержит 32 или 64 клетки, расположенные строго закономерно. Следовательно, у этих организмов выработалась очень важная особенность развития: упорядоченное деление одной клетки дает начало многим клеткам, расположение которых предсказуемо. Эта особенность развития является предвестником процесса дробления яйца у более высокоорганизованных животных.

Для следующих двух родов порядка Volvocales характерна другая важная особенность развития — дифференцировка клеток разных типов в пределах

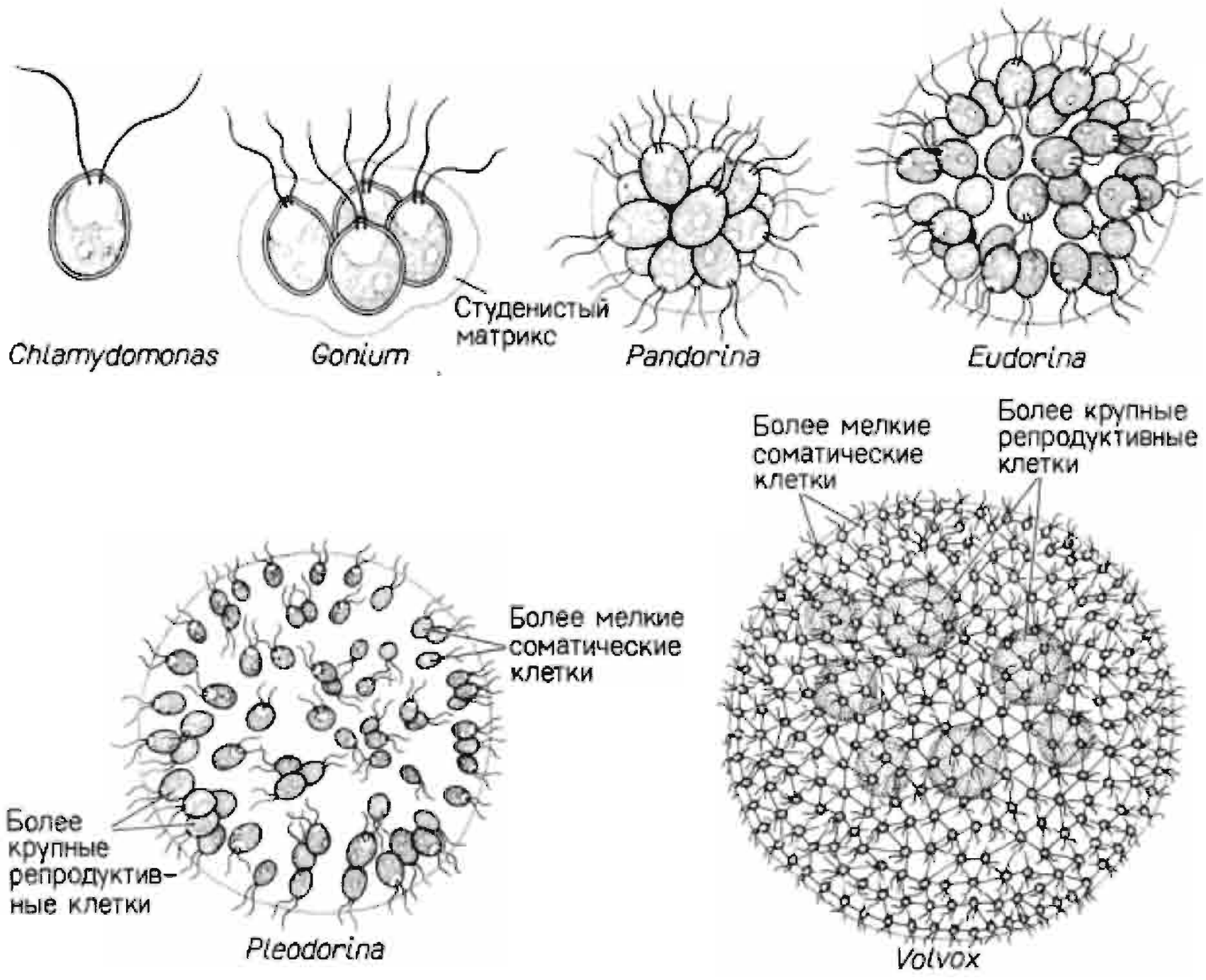


Рис. 1.17. Представители порядка Volvocales. Сложность организации возрастает от одноклеточной хламидомонады до многоклеточного вольвокса (*Volvox*).

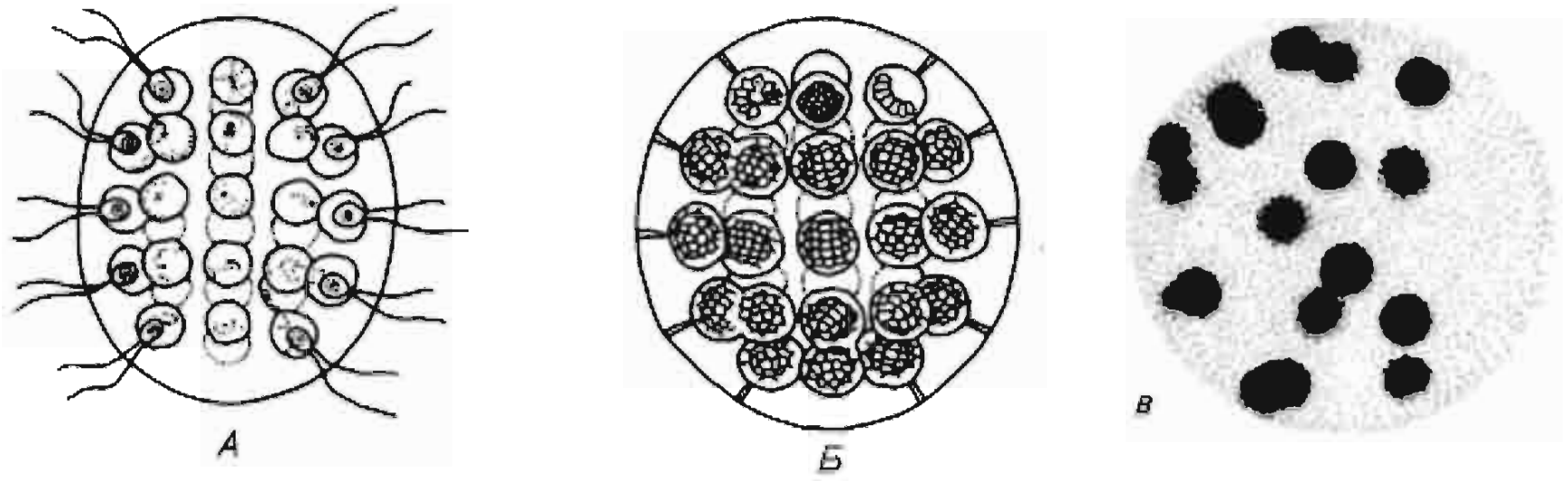


Рис. 1.18. Бесполое размножение у Volvocales. *А*. Зрелая колония *Eudorina elegans*. *Б*. Каждая из клеток *E. elegans* делится и образует новую колонию. *В*. Зрелый *Volvox carteri*. Большая часть клеток неспособна к размножению. Половые клетки (гонидии) начали делиться для образования нового организма. (*А* и *Б* — по Hartmann, 1921; *В* — из Kirk et al.; с любезного разрешения D. Kirk.)

одного организма, причем репродуктивные клетки дифференцируются из соматических. У *Eudorina*, например, каждая клетка способна образовать путем митоза (и в норме образует) полноценный новый организм (рис. 1.18, *А*, *Б*). Однако у представителей родов *Pleodorina* и *Volvox* лишь относительно небольшое число клеток обладает такой способностью. У *Pleodorina californica* клетки передней области выполняют только соматические функции и лишь клетки задней части участвуют и размножении. У *P. californica* колония обычно состоит из 128 или 64 (редко 32) клеток и отношение соматических и репродуктивных клеток, как правило, равно 3:5. Так, 128-клеточная колония имеет 48 соматических клеток, а 64-клеточная — 24.

У *Volvox* почти все клетки соматические и лишь очень немногие способны давать начало новым особям. У более примитивных видов рода *Volvox* репродуктивные клетки, так же как у *Pleodorina*, происходят от клеток, которые первоначально выглядят и функционируют как соматические; затем размеры этих клеток увеличиваются, и они делятся, образуя новые колонии. Однако у более сложно организованных представителей этого рода, как, например, у *V. carteri*, имеется полное разделение функций. Репродуктивные клетки, из которых позднее возникает новая генерация, обособляются во время деления клеток, формирующих новый организм. У репродуктивных клеток никогда не образуются функциональные жгутики и они не участвуют в движении или других соматических функциях индивидуума; они полностью специализированы для размножения. Таким образом, если более примитивных вольвоксовых можно рассматривать как колониальные организмы (поскольку каждая клетка в них способна к независимому существованию и воспроизведению вида), то в случае *V. carteri* мы имеем истинный многоклеточный организм с двумя четко обособленными и независимыми типами клеток (соматическими и репродуктивными), которые необходимы для того, чтобы поддерживать существование вида (рис. 1.18, *В*). Важно отметить, что обособление линии репродуктивных клеток от соматических произошло в эволюции рано. Это разделение на соматический и репродуктивный клеточный материал — одно из первых проявлений дифференцировки в процессе нормального развития. Даже у ресничных простейших часто имеются два ядра: соматическое (макронуклеус), осуществляющее регуляцию метаболизма, и генеративное (микронуклеус) — для размножения. В гл. 7 будет показано, что особенность развития *V. carteri* — обособление отдельной линии репродуктивных клеток на очень ранней стадии развития — присуща также зародышам большинства животных.

Как было описано ранее, многоклеточные вольвоксовые размножаются преимущественно бесполым путем (простым делением), однако они способны также к половому размножению, включающему образование гаплоидных гамет и их слияние (рис. 1.19). Отметим, что у Volvocales имеются гаметы двух различных типов: крупные яйца и мелкие подвижные сперми. Этот тип полового размножения носит название **гетерогамии** в отличие от **изогамии** *Chlamydomonas*. Здесь мы встречаемся с еще одним важным процессом в развитии — гаметогенезом. Преобразование клеток в сперми и яйца осуществляется строго определенным образом (см. разд. «Дополнительные сведения и гипотезы»). Оплодотворение у вольвокса сходно с оплодотворением у хламидомонады и завершается образованием диплоидной зиготы, которая подвергается мейозу и образует новую гаплоидную особь, отделяющуюся от родительского организма.

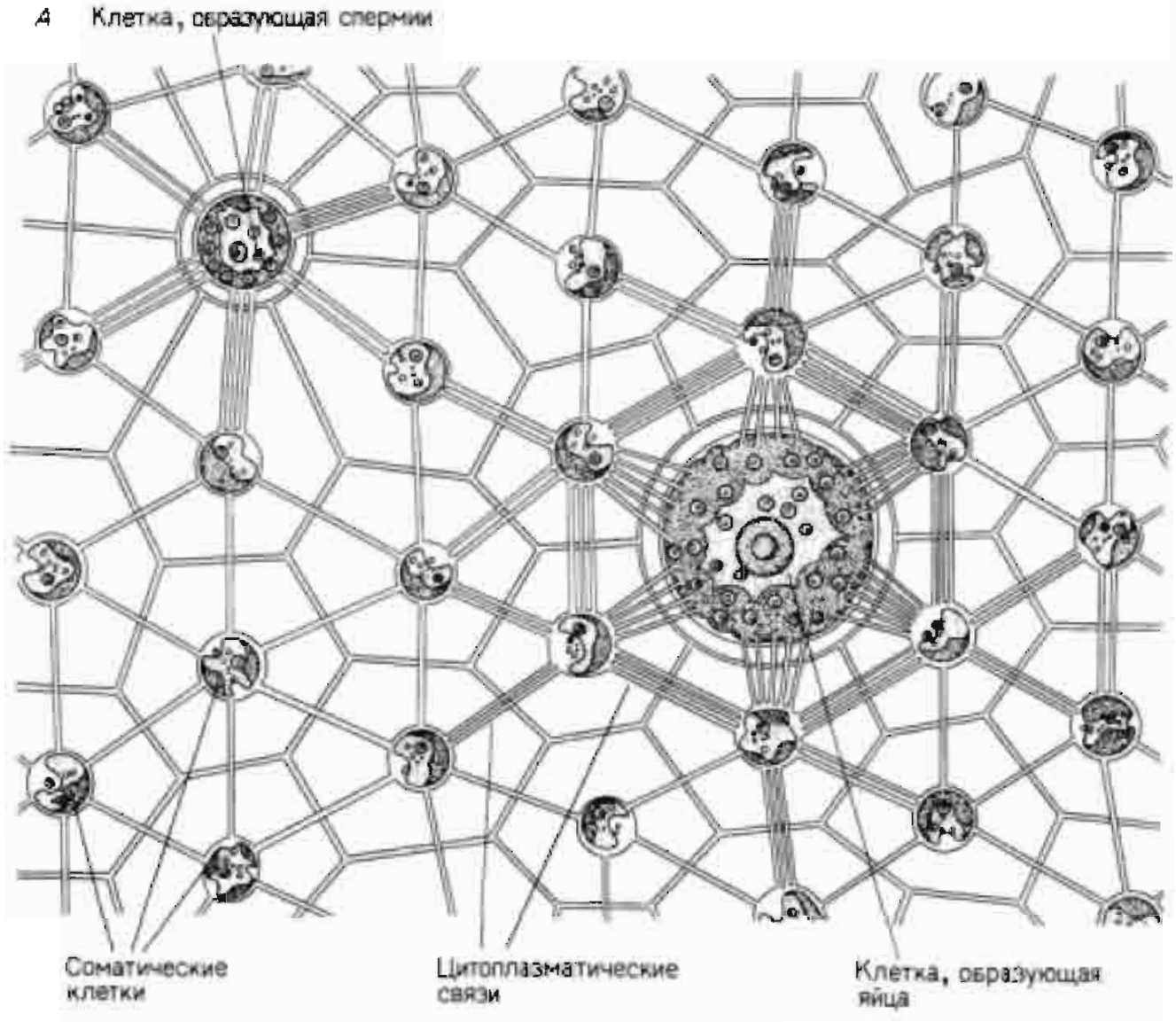


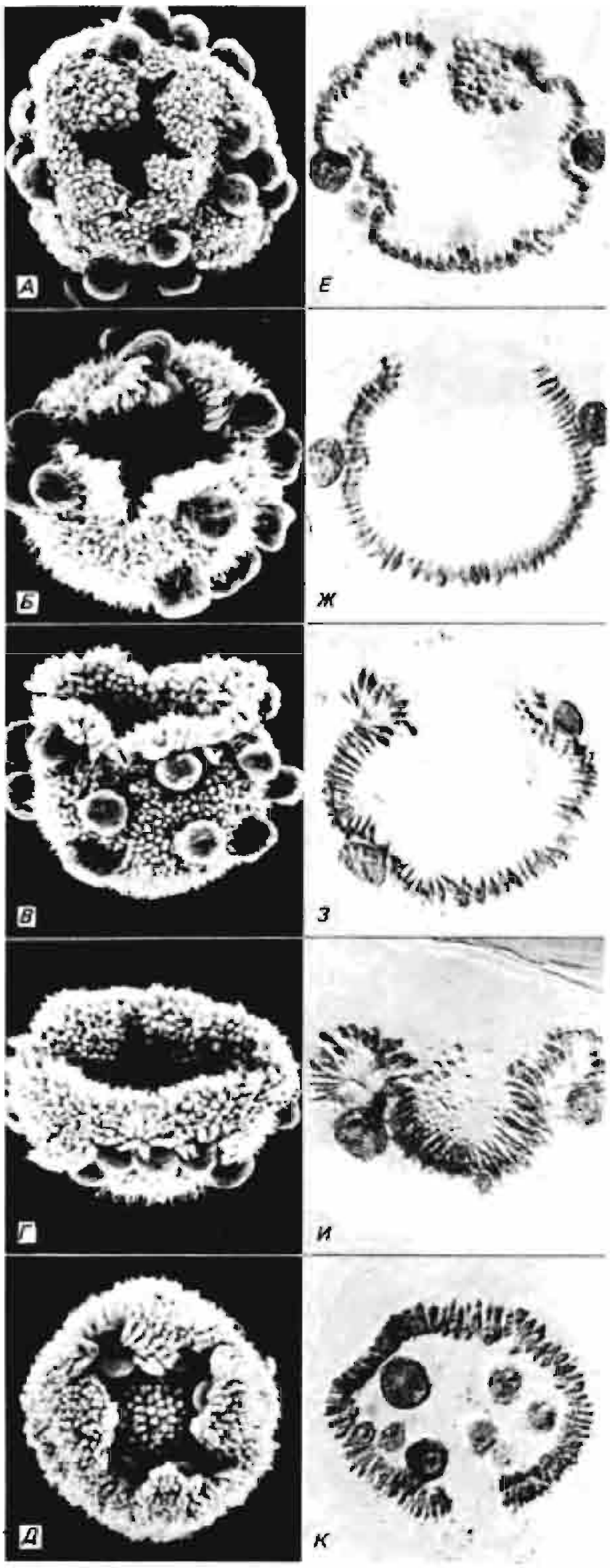
Рис. 1.19. Половое размножение у *Volvox*. *А*. Вид бисексуальной колонии вольвокса с поверхности; видны цитоплазматические связи между клетками. Показаны клетки, образующие спермии и яйца. *Б*. Образование гаплоидных половых клеток, при слиянии которых возникает зигота. Как и у хламидомонады, мейоз у вольвокса происходит после оплодотворения. (*А* — из Bertill, 1961.)

Дополнительные сведения и гипотезы

Пол и смерть у Volvocales

Представителей порядка Volvocales считают потомками некоторых из первых организмов, имевших мужские (продуцирующие спермии) и женские (продуцирующие яйца) особи. Считается также, что они являются одними из первых организмов, которые смертны. Если животные, размножающиеся исключительно путем митоза, потенциально бессмертны, то *Volvox* претерпевает изменения, характерные для процесса старения, которые приводят к гибели особи (Hagen, Ochert, 1980). Натуралист Джозеф Вуд Крач (Krutch, 1956) выразил это в более поэтической форме:

«Амеба и парамеция потенциально бессмертны... Но для вольвокса смерть является столь же неиз-



бежной, как для мыши или человека. Как умирает вольвокс, наблюдал еще Левенгук: произведя потомков, вольвокс должен умереть, поскольку сам он более уже не нужен. Когда приходит его время, он спокойно опускается на дно, присоединяясь к своим предкам. Хегнер, зоолог из Университета Джона Хопкинса, написал однажды: «Царство животных приобрело очередное новшество — пол; цена этого приобретения — неминуемая естественная гибель». И далее он спрашивает: «А не велика ли эта цена?»

Для вольвокса, несомненно, не велика. Недавние исследования (Kirk, Kirk, 1986), проведенные на *Volvox carteri*, пролили свет на связь между наличием пола и гибелью у этого вида. Особи *V. carteri* обычно бесполые. Каждая особь образована приблизительно двумя тысячами мелких соматических клеток, несущих по два жгутика; эти клетки располагаются по периферии шаровидного тела вольвокса; в центре его находятся 16 крупных репродуктивных клеток, называемых **гонидиями**. Когда вольвокс достигает зрелости, каждая гонидия делится 11—12 раз (включая одно неравное деление для образования гонидий следующего поколения) и образует миниатюрное животное, сходное со взрослым (рис. 1.18, *В*). Однако в отличие от взрослых эти юные особи как бы «вывернуты наизнанку» — гонидии у них располагаются на поверхности шара, тогда как жгутики соматических клеток обращены внутрь. Молодой вольвокс исправляет эту несообразность: на вершине шара появляется отверстие (фиалопор), и шар выворачивается, как это показано на рис. 1.20. Этот процесс называют **инверсией**; он происходит путем изменения формы клеток, которое осуществляется с помощью цитоскелетных элементов и напоминает изменения, наблюдаемые у гаструлирующих зародышей. В молодых колониях возникают группы бокаловидных клеток. Суженные концы этих клеток соединяются между собой цитоплазматическими мостиками (рис. 1.21). Группы таких бокаловидных клеток создают натяжение, которое может быть ослаблено изгибанием клеточного пласта (Kirk et al., 1982). Когда процесс инверсии завершается, моло-

Рис. 1.20. Инверсия зародышей *Volvox carteri*, возникших при бесполом размножении. *А* — *Д*. Фотографии целых зародышей, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. *Е* — *К*. Фотографии центральных сагиттальных срезов зародыша, полученные методом дифференциальной интерференционной микроскопии. До инверсии зародыш представляет собой полый шар, образованный связанными между собой клетками. Когда клетки изменяют свою форму, на вершине шара открывается фиалопор (*А*, *Б*, *Е*, *Ж*). Затем края клеточного пласта загибаются и смыкаются внизу (*В* — *Д*, *З* — *К*). (Из Kirk et al., 1982; фотографии с любезного разрешения D. Kirk.)



Рис. 1.21. «Бокаловидные клетки» вблизи отверстия фиалопора. Эти клетки остаются тесно связанными между собой цитоплазматическими мостиками поблизости от удлиненных апикальных концов; тем самым создается натяжение, вызывающее изгибание пласта связанных между собой клеток. (Из Kirk et al., 1982; фотография с любезного разрешения D. Kirk.)

дые колонии высвобождаются из родительской колонии, которая стареет и погибает.

Такой тип бесполого размножения характерен для данного вида. В течении большей части года в прудах и озерах трудно найти мужские или женские особи *Volvox carteri*. Однако «под ослепительным сиянием солнечных лучей Небраски в лужах дождевой воды не более чем через две недели появляются вольвоксы; число их быстро увеличивается, и они бурно предаются половому размножению» (Powers, 1908). Кирк и Кирк показали, что кратковременное воздействие на вольвоксов высоких температур (подобных тем, под воздействием которых эти организмы оказываются в прогреваемых солнцем лужах) приводит к синтезу и секреции соматическими клетками белка, являющегося **индуктором полового процесса.** Этот белок с молекулярной массой 30 000 дальтон является одним из наиболее сильнодействующих среди известных биологических молекул. Под воздействием этого белка даже в таких низких концентрациях, как $6 \cdot 10^{-17}$ М, бесполые организмы производят особей, продуцирующих гаметы: женская особь, размножавшаяся бесполым путем,— дочерей, производящих яйца, и мужская особь, размножавшаяся бесполым путем,— сыновей, производящих спермии. Возникшие в результате оплодотворения зиготы могут долго оставаться в анабиотическом состоянии, переживая длительный период высыхания. Так вольвокс нашел способ существовать во временных водоемах, образуемых весенними дождями и пересыхающих в жаркую погоду летом: под влиянием высоких температур появляются особи с половыми продуктами — гаметами; сливаясь, гаметы образуют зиготы, которые выживают в условиях, гибельных для взрослого организма. В этом случае мы видим также, что развитие жестко связано с экосистемой, к которой приспособился организм, чтобы выжить.

Слизевик Dictyostelium

Другой тип многоклеточной организации, ведущей свое начало от одноклеточных организмов, мы находим у слизевика *Dictyostelium discoideum*. Жизненный цикл этого необычного и вызывающего удивление организма приведен на рис. 1.22. Вегетативная стадия развития предетавлена одиночными гаплоидными амебами (называемыми миксамебами, чтобы отличать их от истинных амеб), которые живут на гниющих древесных остатках, питаются бактериями и размножаются простым делением. Когда источник питания истощается, десятки тысяч таких амеб образуют потоки клеток, устремляющихся к некой центральной точке. Здесь они сливаются в конический бугорок, который в конечном счете поглощает все мигрирующие клетки и изгибается, превращаясь в мигрирующего слизевика. Этот слизевик (которому часто присваивают более благозвучное название — **псевдоплазмодий**) обычно имеет в длину 2—4 мм и заключен в слизистый чехол. Псевдоплазмодий начинает мигрировать (во влажной среде и в темноте), слегка приподняв передний конец. Когда миграция заканчивается, расположенные впереди клетки, составляющие 15—20% всей клеточной популяции, сползают вниз, образуя ножку спороношения, тогда как клетки, ранее располагавшиеся сзади, перемещаются вверх. Клетки ножки погибают, а находившиеся сзади клетки, которые поднялись выше ножки, образуют споры. Споры рассеиваются, и каждая из них превращается в новую миксамебу. Помимо бесполого размножения у *Dictyostelium* может осуществляться и половой процесс. При этом две клетки сливаются в одну гигантскую клетку, которая переваривает все остальные клетки агрегата. Поглотив всех своих соседей, она преобразуется в цисту с толстой стенкой, и затем в ней происходят мейотические и митотические деления; в конце концов из цисты выходят новые миксамебы.

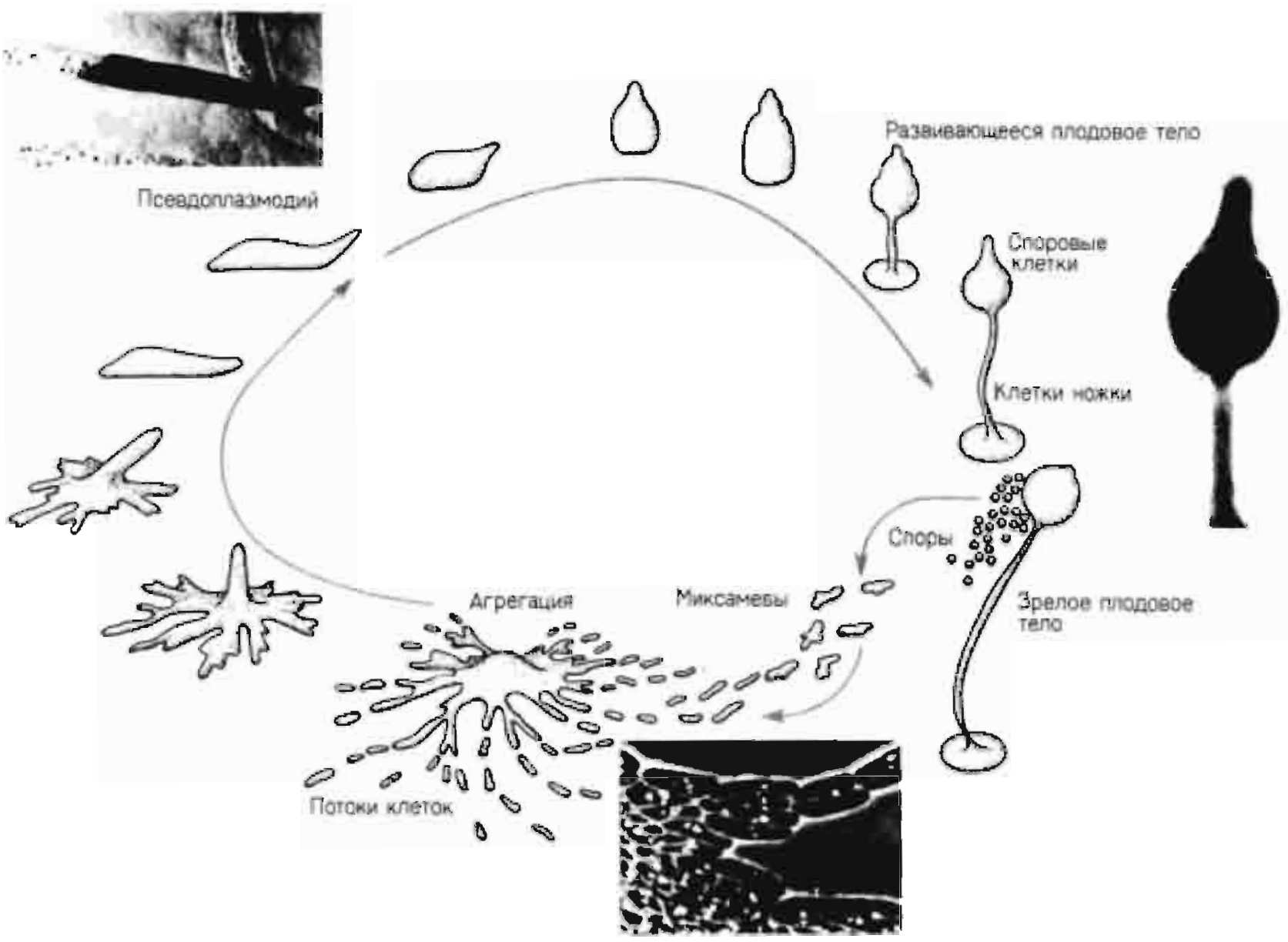


Рис. 1.22. Жизненный цикл слизевика *Dictyostelium discoideum*. Гаплоидные споры дают начало миксамебам, которые могут размножаться бесполым путем, увеличивая число гаплоидных особей. Когда запасы пищи уменьшаются, возникают центры агрегации миксамеб и формируется мигрирующий псевдоплазмодий. В конце концов он перестает перемещаться и образует спороношения, из которых высвобождается большое число спор. (Фотографии с любезного разрешения K. Raper.)

Dictyostelium представляет собой прекрасный экспериментальный объект для исследований в области биологии развития, поскольку в этом организме исходно идентичные клетки дифференцируются в один из двух альтернативных клеточных типов — споры или клетки ножки. Кроме того, у *Dictyostelium* отдельные клетки объединяются для образования единой структуры, состоящей из дифференцированных клеток разного типа, — процесс, сходный с образованием тканей у более сложно организованных существ. Агрегация тысяч амеб в единый организм — способ возникновения многоклеточности, побуждавший исследователей строить гипотезы относительно механизмов его осуществления.

Один из главных вопросов, занимающих исследователей: что вызывает агрегацию клеток? Цейтраферная микрокиносъемка показала, что в первые 4—5 ч голодания не происходит никаких направленных движений. В следующие 5 ч, однако, можно видеть, что клетки перемещаются со скоростью около 20 мкм в 1 мин на протяжении 100 с. Эти движения прекращаются примерно на 4 мин и затем возобновляются. Хотя перемещение направлено к некой центральной точке, оно не является просто движением в радиальном направлении. Правильнее сказать, что клетки сближаются между собой и образуют как бы ручейки, которые сливаются в более мощные потоки; в конце концов все потоки объединяются в центре. Эти перемещения обусловлены **хемотаксисом** (Bonner, 1947; Shaffer, 1953), т. е. движение клеток к центру агрегации направляется каким-то растворимым веществом. Позднее было установлено, что этим веществом является циклический аденозин-3′,5′-монофосфат (цАМФ) (Konijn et al., 1967; Bonner et al., 1969), химическая структура которого показана на рис. 1.23, *А*.

Агрегацию вызывает периодическая секреция цАМФ немногими случайно распределенными клетками (Cohen, Robertson, 1971). Соседние клетки отвечают на воздействие цАМФ двояко: они начинают двигаться к источнику цАМФ и сами выделять его (Robertson et al., 1972; Shaffer, 1975). После этого



Рис. 1.23. Хемотаксис, обусловленный волнами синтеза циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). *А*. Химическая структура цАМФ. *Б*. Визуализация волн цАМФ в среде. Центральные клетки секретируют цАМФ через постоянные интервалы времени, и каждый раз секрет диффундирует в виде концентрической волны. Эти волны можно визуализировать, насыщая фильтровальную бумагу радиоактивным цАМФ и накладывая ее на колонию в стадии агрегации. Секретируемый клетками цАМФ разводит радиоактивный цАМФ. Поэтому при регистрации радиоактивности на бумаге (путем помещения ее на чувствительную к рентгеновским лучам пленку) области с высокой концентрацией цАМФ выглядят более светлыми, чем области с низкой его концентрацией. (Из Tomchick, Devreotes, 1981; с любезного разрешения P. Devreotes.)

клетки на несколько минут теряют чувствительность к цАМФ. В результате возникает волна цАМФ, распространяющаяся по популяции клеток (рис. 1.23, *Б*). С прохождением каждой волны клетки еще на один шаг приближаются к центру.

Слизневые грибы выработали также механизм, с помощью которого стимулированные цАМФ клетки слипаются между собой. Обычно отдельные амебы не прилипают друг к другу. Однако после 5 ч голодания на клеточной поверхности появляется целый набор белков (называемых **дискондинами**), которые вызывают слипание клеток между собой (Rosen et al., 1973; Ray et al., 1979).

Дифференцировка отдельных амеб в клетки ножки (соматические) или в споры (репродуктивные элементы) — явление сложное. Боннер (Bonner, 1957) обнаружил, что во всех случаях из передних клеток возникает ножка, тогда как остальные предназначены для образования спор. Хирургическое удаление передней части слизевика не изменяет этой закономерности. Клетки, оказавшиеся впереди (ранее предназначавшиеся для образования спор), теперь становятся клетками ножки (Raper, 1940). Каким-то образом происходит принятие решения, согласно которому, какие бы клетки ни были передними, они станут клетками ножки, и какие бы ни были задними — превратятся в споры. Такая способность клеток изменять свою судьбу в развитии называется **регуляцией**, и мы обнаружим это явление у зародышей многих животных, включая млекопитающих.

Дифференцировка на клетки ножки и споры отражает одну из основных особенностей эмбриогенеза: выбор клетками «пути развития». Мы часто видим, что клетки избирают определенную судьбу при наличии альтернативных путей развития. Так, например, определенная клетка костного мозга может стать лимфоцитом или клеткой крови, определенная клетка зародыша — эпителиальной клеткой кожи или нейроном. В случае слизевиков мы встречаемся с простым дихотомическим решением, так как у них выбор возможен только между двумя клеточными типами. Как же так происходит, что та или иная клетка становится клеткой ножки или спорой? Никто точно пока этого не знает, но, по-видимому, существуют диффундирующие вещества, которые могут влиять на судьбу клеток. Одно их них, **фактор, индуцирующий дифференцировку** (differentiation-inducing factor, или DIF), вероятно, необходимо для дифференцировки ножки. Этот фактор, как и фактор, индуцирующий половую дифференцировку у вольвокса, эффективен в очень низкой концентрации (10^{-10} М), и так же, как белок вольвокса, он индуцирует дифференцировку клеток определенного типа. При его добавлении к амебам до их слияния и даже к презумптивным споровым (задним) клеткам он вызывает образование ими ножки. Синтез этого низкомолекулярного липида регулируется генетически, поскольку существуют мутантные линии *Dictyostelium*, которые образуют только предшественников спор и не образуют клеток ножки. При добавлении DIF к таким культурам в них могут дифференцироваться клетки ножки (Kay, Jermyn, 1983; Morris et al., 1987) и в цитоплазме клеток обнаруживаются новые мРНК (Williams et al., 1987).

Слизевики представляют собой эволюционный тупик. Более сложные многоклеточные организмы не образуются из агрегатов исходно независимых клеток. Тем не менее способность отдельных клеток реагировать на химический градиент (как в случае реакции миксамеб на цАМФ) очень важна для некоторых явлений, происходящих при развитии разных животных. Поверхностные клеточные белки, обусловливающие слипание клеток, обнаруживаются во всем животном царстве, и именно теперь из многоклеточных организмов начинают выделять вещества, индуцирующие дифференцировку. Выше были рассмотрены дифференцировка и морфогенез организма, образованного всего лишь двумя основными клеточными типами. Однако закономерности, установленные для такой «простой» развивающейся системы, присущи и более сложно организованным животным.

Особенности развития разных многоклеточных

Поскольку остальная часть книги посвящена **Metazoa** — многоклеточным организмам, проходящим стадии эмбрионального развития,— мы представим обзор развития разных групп животных. На рис. 1.24 изображены основные эволюционные направления развития многоклеточных. Самое интересное заключается в том, что жизнь не эволюционировала в одном определенном направлении, а эволюция шла разными путями. Мы видим, что бо́льшая часть видов многоклеточных принадлежит к одной из двух основных ветвей филогенетического древа: первичноротым или вторичноротым.

Губки

Полагают, что колониальные простейшие дали начало двум группам многоклеточных, которые проходят стадии эмбрионального развития. Одна из этих групп — губки (Porifera). Процесс их развития настолько отличается от развития представителей всех других групп животных, что некоторые систематики вообще не считают возможным относить губок к группе Metazoa. У них имеется три типа соматических клеток, но только клетки одного из них, **археоциты**, могут дифференцироваться в клетки остальных типов. Если пропустить губку через сито, то из изолированных клеток могут сформироваться новые губки. Такая реагрегация видоспецифична, и если смешать изолированные клетки губок разных видов, то каждая из новообразованных губок будет содер-

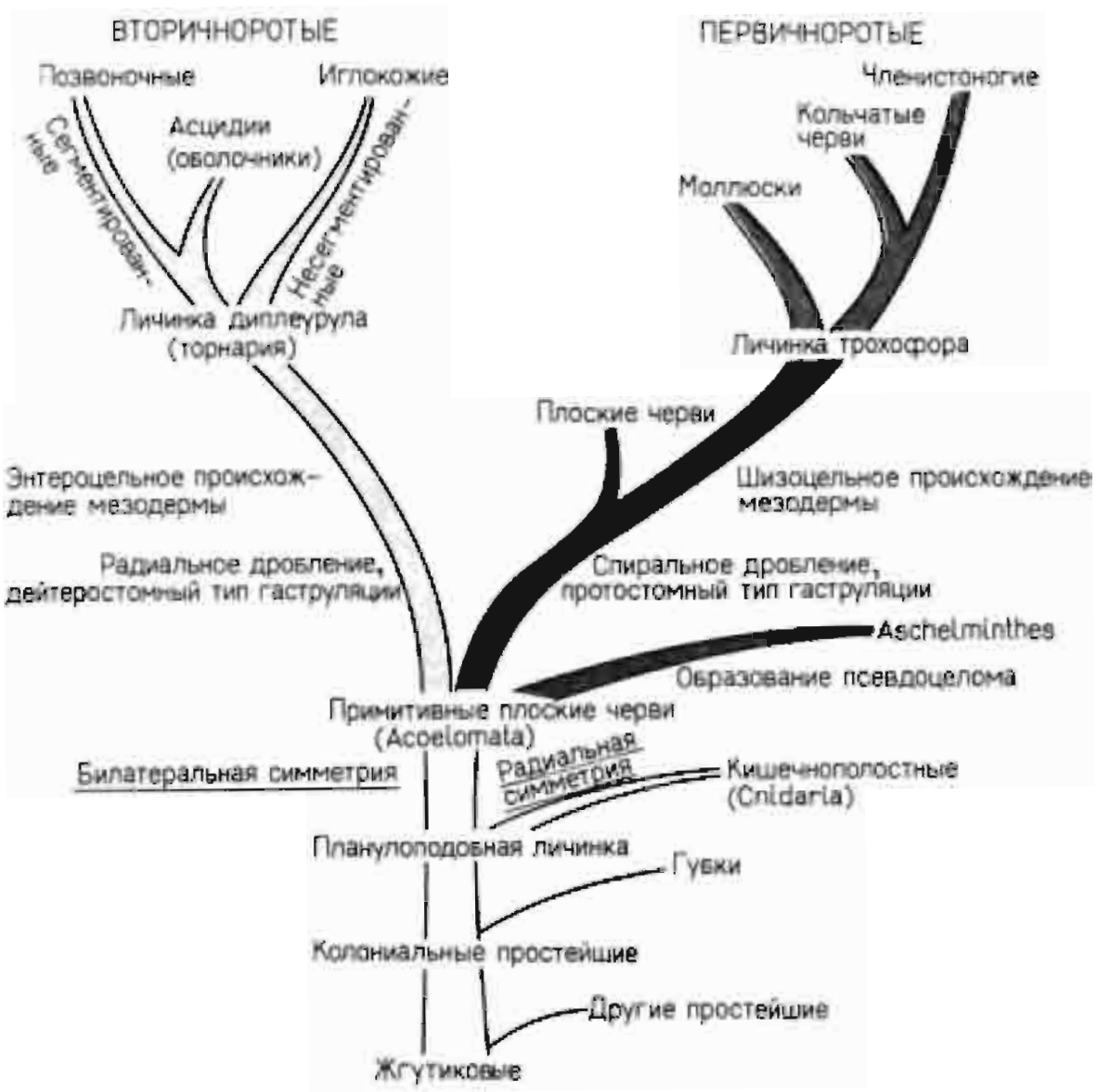


Рис. 1.24. Схематическое изображение основных путей дивергенции в эволюции. (Возможны другие варианты, но общая схема во всех случаях будет сходна с представленной здесь.)

жать клетки только своего вида (Wilson, 1907). Принято считать, что подвижные археоциты содействуют агрегации клеток собственного вида и не взаимодействуют с клетками других видов (Turner, 1978). Губки не имеют мезодермы, поэтому у них нет истинных систем органов — ни пищеварительной трубки или системы кровообращения, ни нервов или мышц. Таким образом, хотя они и проходят в своем развитии эмбриональные и личиночные стадии, но сильно отличаются от большинства Metazoa.

Первичноротые и вторичноротые

Для другой группы многоклеточных, произошедших от колониальных простейших, характерно образование в процессе развития трех зародышевых листков. Некоторые члены этой группы относятся к разделу **Radiata**, потому что обладают **радиальной симметрией** подобно трубке или колесу. Radiata включают кишечнополостных (медузы, кораллы, гидра) и гребневиков. Мезодерма у этих животных находится в зачаточном состоянии; она представлена единичными клетками, разбросанными в студенистом матриксе. Бо́льшая часть Metazoa относится, однако, к разделу **двусторонне-симметричных** животных (Bilateralia) и делится на первично- и вторичноротых. Полагают, что все Bilateralia произошли от примитивных плоских червей. У этих плоских червей впервые появилась истинная мезодерма (хотя она была плотной и в ней не возникала полость тела). Считается, что они были похожи на личинок некоторых современных кишечнополостных. Различия между двумя основными группами Bilateralia представлены на рис. 1.25. **Первичноротые** (Protostomia), включающие моллюсков, членистоногих и червей, носят такое название потому, что ротовое отверстие у них возникает из первичного рта (бластопора) или его части. Мезодерма образуется из телобластов. Полость тела образуется путем расхождения первоначально плотного тяжа клеток (схизоцельный способ).

Другим большим подразделением двусторонне-симметричных животных являются **вторичноротые** (Deuterostomia). Они включают хордовых и иглокожих. Может показаться странным включение человека и росомахи в одному систематическую группу с морскими звездами и морскими ежами, однако некоторые эмбриологические особенности делают очевидным их родство. Во-первых, у вторичноротых дефинитивный рот возникает независимо от первичного рта (бластопора) и в другом месте. Мезодерма образуется энтероцельным способом, и имеется вторичная полость тела (целом).

Первично- и вторичноротые различаются также по типу дробления. У вторичноротых бластомеры каждого квартета располагаются над соответствую-

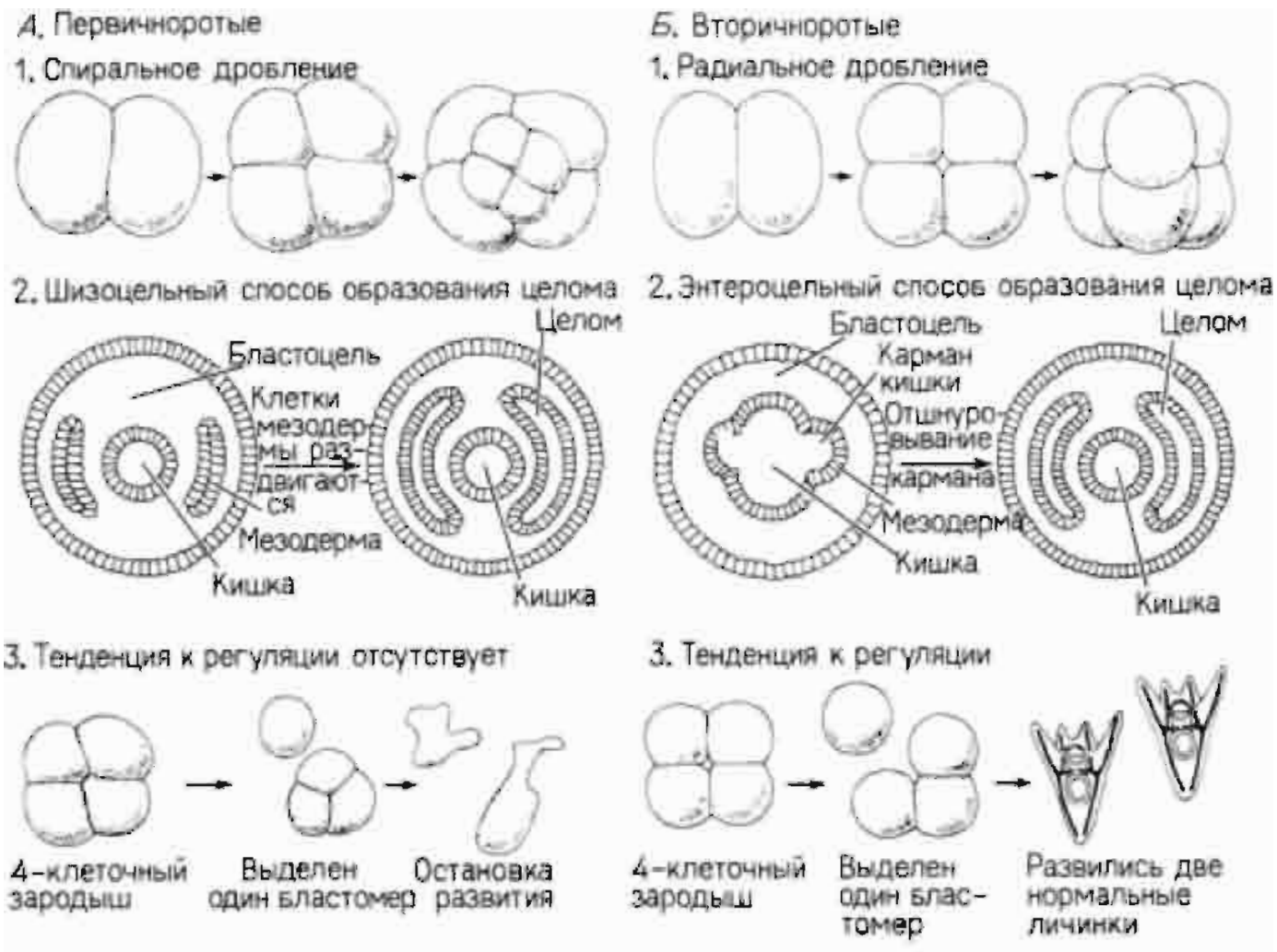


Рис. 1.25. Основные тенденции в развитии первичноротых и вторичноротых.

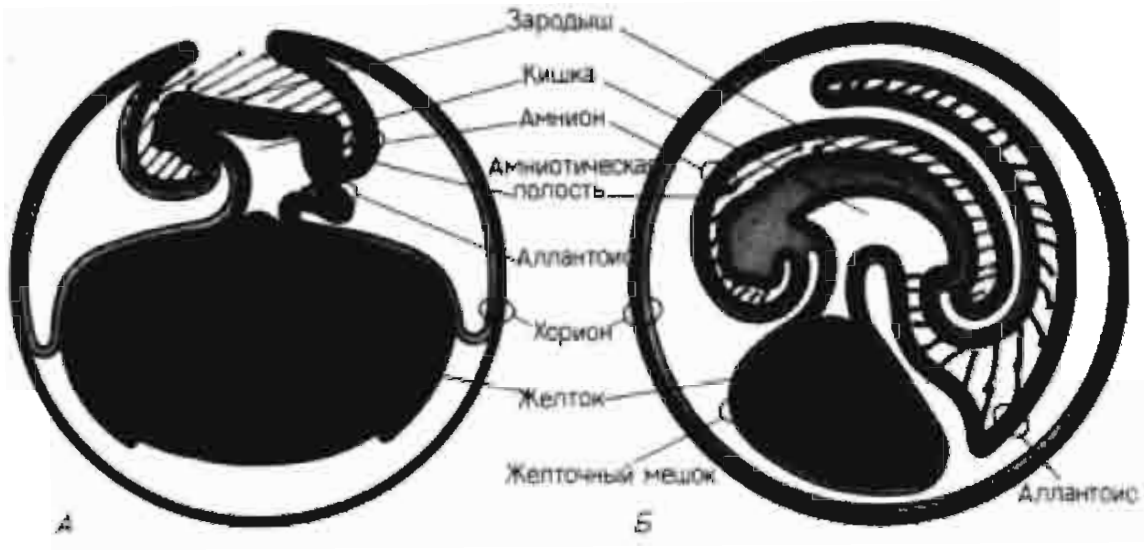


Рис. 1.26. Схема строения куриного яйца, типичного для амниот. Показано развитие оболочек, окружающих зародыш. *А*. 3 сут инкубации. *Б*. 7 сут инкубации.

щими бластомерами подлежащего квартета, и анимально-вегетативная ось яйца является у них осью радиальной симметрии. Такой тип дробления называют **радиальным**. В отличие от вторичноротых у первичноротых бластомеры вышележащего квартета располагаются между бластомерами нижележащего квартета. Такой тип дробления носит название **спирального**. Далее, в период дробления, у большинства вторичноротых бластомеры обладают большей способностью к регуляции развития, чем у первичноротых. Если у зародыша морского ежа или человека на 4-клеточной стадии удалить один из бластомеров, то он способен образовать целый организм, а оставшиеся $^3/_4$ зародыша также могут развиваться нормально. Но если такую же операцию проделать на зародыше улитки или червя, то отдельный бластомер и остальная часть зародыша превратятся в двух частичных зародышей; у каждого из них будут отсутствовать те части, которые представлены у партнера.

Эволюция организмов зависит от унаследованных изменений в их развитии. Одно из величайших достижений эволюции — возникновение амниотического яйца — произошло у вторичноротых. Этот тип яйца, примером которого может служить яйцо курицы (рис. 1.26), впервые появился у рептилий около 30 млн. лет тому назад. Благодаря его возникновению позвоночные в период эмбрионального развития стали независимы от воды. Они получили возможность заселять сушу вдали от водоемов. И если амфибии должны возвращаться к воде для размножения и для того, чтобы их яйца могли развиваться, то яйца амниот имеют собственный запас воды и пищи. Яйца амниот оплодотворяются внутри материнского организма и содержат **желток** для питания развивающегося зародыша. Кроме того, зародыш амниот снабжен двумя мешками: **амнионом**, содержащим жидкость, которая его омывает, и **аллантоисом**, в котором скапливаются конечные продукты обмена. Зародыш вместе с амнионом и аллантоисом заключен в скорлупу, которая проницаема для кислорода, диффундирующего внутрь яйца, но достаточно прочна, чтобы защитить зародыш от неблагоприятных воздействий внешней среды. Сходные эволюционные изменения яйцевых оболочек позволили членистоногим стать первыми сухопутными беспозвоночными. Таким образом, окончательное преодоление границы между водой и сушей явилось результатом изменения самой ранней стадии развития — яйца.

Биология развития располагает бесконечным многообразием интереснейших объектов и увлекательных проблем. Задачей автора было отобрать некоторые из них для иллюстрации основных закономерностей развития животных. Выборка эта очень мала. Для того чтобы яснее представить себе состояние дел в эмбриологической науке, можно прибегнуть к такому сравнению: сейчас мы ведем наблюдения только в доступном нам маленьком прудике, тогда как перед нами лежит целый океан неизвестных закономерностей развития. Изучать развитие животных мы начнем с ранних стадий эмбриогенеза: оплодотворения, дробления, гаструляции и установления плана строения тела. Хотя нами была предпринята попытка дать обзор основных вариантов процесса развития во всем животном царстве, легко заметить, что наибольшего внимания удостоились вторичноротые.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Bergman K., Goodenough U. W., Goodenough D. A., Jawitz J., Martin H. (1975). Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Flagellar membranes and the agglutination reaction. J. Cell Biol., **67**, 606—622.

Berrill N. J. (1961). Growth, Pattern, and Form. Freeman, San Francisco.

Bonner J. T. (1947). Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. J. Exp. Zool., **106**, 1—26.

Bonner J. T. (1957). A theory of the control of differentiation in the cellular slime molds. Q. Rev. Biol., **32**, 232—246.

Bonner J. T., Berkley D. S., Hall E. M., Konijn T. M., Mason J. W., O'Keefe G., Wolfe P. B. (1969). Acrasin, acrasinase and the sensitivity to acrasin in *Dictyostelium discoideum*. Dev. Biol., **20**, 72—87.

Cohen M. H., Robertson A. (1971). Wave propagation in the early stages aggregation of cellular slime molds. J. Theor. Biol., **31**, 101—118.

Fulton C. (1977). Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. Annu. Rev. Microbiol., **31**, 597—629.

Fulton C., Walsh C. (1980). Cell differentiation and flagellar elongation in *Naegleria gruberi*: Dependence on transcription and translation. J. Cell Biol., **85**, 346—360.

Garcia E., Dazy A.-C. (1986). Spatial distribution of poly(A)$^+$ RNA and protein synthesis in *Acetabularia mediterranea*. Biol. Cell, **58**, 23—29.

Goodenough U. W., Weiss R. L. (1975). Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Cell wall lysis and microfilament associated mating structure activation in wild-type and mutant strains. J. Cell Biol., **67**, 623—637.

Hagen G., Kochert G. (1980). Protein synthesis in a new system for the study of senescence. Exp. Cell Res., **127**, 451—457.

Hämmerling J. (1934). Über formbildended Substanzen bei *Acetabularia mediterranea*, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org., **131**, 1—81.

Hartmann M. (1921). Die dauernd agame Zucht von *Eudorina elegans*, experimentelle Beiträge zum Befruchtungs-und Todproblem. Arch. Protistk., **43**, 223—286.

Kay R. R., Jermyn K. A. (1983). A possible morphogen controlling differentiation in *Dictyostelium*. Nature, **303**, 242—244.

Kirk D. L., Kirk M. M. (1986). Heat shock elicits production of sexual inducer in *Volvox*. Science, **231**, 51—54.

Kirk D. L., Viamontes G. I., Green K. J., Bryant J. L. Jr. (1982). Integrated morphogenetic behavior of cell sheets: *Volvox* as a model. In: S. Subtelny and P. B. Green (eds). Developmental Order: Its Origin and Regulation. Alan R. Liss, New York, pp. 247—274.

Kloppstech K., Schweiger H. G. (1975). Polyadenylated RNA from *Acetabularia*. Differentiation, **4**, 115—123.

Kanijn T. M., van der Meene J. G. C., Bonner J. T., Barkley D. S. (1967). The acrasin activity of adenosine-3′, 5′-cyclic phosphate. Proc. Natl. Acad. Sci USA, **58**, 1152—1154.

Krutch J. W. (1956). The Great Chain of Life. Houghton Mifflin, Boston, pp. 28—29.

Morris H. R., Taylor G. W., Masento M. S., Jermyn K. A., Kay R. R. (1987). Chemical structure of the morphogen differentiation-inducing factor from *Dictyostelium discoideum*. Nature, **328**, 811—814.

Powers J. H. (1908). Further studies on *Volvox*, with description of three new species. Trans. Am. Micr. Soc., **28**, 141—175.

Raper K. B. (1940). Pseudoplasmodium formation and organization in *Dictyostelium discoideum*. J. Elisha Mitchell Sci. Soc., **56**, 241—282.

Ray J., Shinnick T., Lerner R. A. (1979). A mutation altering the function of a carbohydrate binding protein blocks cell—cell cohesion in developing *Dictyostelium discoideum*. Nature, **279**, 215—221.

Robertson A., Drage D. J., Cohen M. H. (1972). Control of aggregation in *Dictyostelium discoideum* by an external periodic pulse of cyclic adenosine monophosphate. Science, **175**, 333—335.

Rosen S. D., Kafka J. A., Simpson D. L., Barondes S. H. (1973). Developmentally regulated carbohydrate binding protein in *Dictyostelium discoideum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70**, 2554—2558.

Shaffer B. M. (1953). Aggregation in cellular slime molds: In vitro isolation of acrasin. Nature, **171**, 975.

Shaffer B. M. (1975). Secretion of cyclic AMP induced by cyclic AMP in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. Nature, **255**, 549—552.

Strickberger M. W. (1985). Genetics, 3rd ed. Macmillan, New York.

Tomchick K. J., Devreotes P. N. (1981). Adenosine 3′, 5′-monophosphate waves in *Dictyostelium discoideum*: A demonstration by isotope dilution-fluorography. Science, **212**, 443—446.

Turner R. S. Jr. (1978). Sponge cell adhesions. In: D. R. Garrod (ed.), Specificity of Embryological Interactions. Chapman and Hall, London, pp. 199—232.

Walsh C. (1984). Synthesis and assembly of the cytoskeleton of *Naegleria gruberi* flagellates. J. Cell Biol., **98**, 449—456.

Williams J. G., Ceccarelli A., McRobbie S., Mahbubani H., Kay R. R., Early A., Berks M., Jermyn K. A. (1987). Direct induction of *Dictyostelium* pre-stalk gene expression of DIF provides evidence that DIF is a morphogen. Cell, **49**, 185—192.

Wilson E. B. (1896). The Cell in Development and Inheritance. Macmillan, New York.

Wilson H. V. (1907). On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J. Exp. Zool., **5**, 245—258.

Глава 2

Оплодотворение: возникновение нового организма

Еще, и еще, и еще,
Это вечное стремление Вселенной рождать и рождать,
Вечно плодородное движение мира.
Из мрака выходят двое, они так несхожи, но равны; вечно материя,
вечно рост, вечно явление пола,
Вечно ткань из различий и тождеств, вечно зарождение жизни.

УОЛТ УИТМЕН (1855)[1]

Введение

Оплодотворение представляет собой процесс слияния двух половых клеток (**гамет**) друг с другом, в результате чего возникает новая особь, генетические потенции которой берут начало от обоих родителей. Оплодотворение осуществляет две разные функции: половую (комбинирование генов двух родителей) и репродуктивную (создание нового организма). Первая из этих функций включает передачу генов от родителей потомкам, вторая — инициацию в цитоплазме яйца тех реакций, которые позволяют продолжать развитие.

Конкретные особенности оплодотворения очень сильно варьируют у различных видов, но происходящие при этом события обычно сводятся к четырем основным процессам:

1. *Контакт спермия с яйцом и их взаимное узнавание.* Это этап качественного контроля. Спермий и яйцо должны принадлежать одному и тому же виду.
2. *Регуляция проникновения спермия в яйцо.* Это этап количественного контроля. Только один спермий должен в конечном счете оплодотворить яйцо. Все остальные спермии должны быть элиминированы.
3. *Слияние генетического материала спермия и яйца.*
4. *Активация метаболизма яйца для его вступления на путь развития.*

Строение гамет

Прежде чем перейти к рассмотрению каждого события, происходящего при оплодотворении, остановимся на строении спермия и яйца, двух типов клеток, которые специализированы для осуществления оплодотворения.

Спермий

Роль, выполняемая спермием в процессе оплодотворения, была выяснена только в прошлом столетии. Антони ван Левенгук, голландский микроскопист, который был одним из двух ученых, открывших в 1678 г. существование спермиев, первоначально считал их паразитическими животными, живущими в сперме (отсюда название *сперматозоиды*, т. е. «животные спермы»). Поначалу он решил, что спермии не имеют никакого отношения к размножению животных, у которых они были обнаружены, но позднее пришел к мысли, что каждый спермий содержит преформированное животное. Левенгук писал (1685), что спермии — это семена (как sperma, так

[1] Уолт Уитмен «Листья травы». Гос. изд-во худож. литературы, 1955, с. 49.



Рис. 2.1. Ребенок, преформированный в спермии, по рисунку Николаса Хартсекера (1694).

и semen означают «семя, зерно») и что самка только предоставляет питательную почву для посева семян. В этом отношении он возвращается к идее порождения, провозглашенной Аристотелем за две тысячи лет до этого. Несмотря на все старания, Левенгуку, к его разочарованию, никак не удавалось обнаружить в сперматозоидах преформированное семя. Николас Хартсекер, открывший спермии одновременно с Левенгуком, нарисовал то, что надеялся найти в спермии: преформированного человечка — «гомункулуса» (рис. 2.1). Представление, согласно которому в спермии содержится целый зародыш, никогда не имело много приверженцев, так как оно подразумевает огромное и бессмысленное растрачивание потенциальной жизни.

В серии опытов, осуществленных в конце 1700-х годов, Ладзаро Спалланцани показал, что профильтрованная сперма жабы, из которой удалены спермии, не оплодотворяет яиц. Однако он сделал заключение, что действующим началом в оплодотворении является вязкая жидкость, задерживаемая фильтровальной бумагой, а не спермии. Спалланцани тоже полагал, что спермии, содержащиеся в сперме, не что иное, как паразитические животные. И все же проделанный им опыт был первым свидетельством важной роли спермиев при оплодотворении.

Улучшение качества линз для микроскопирования и развитие клеточной теории привели к новому пониманию функции спермиев. В 1824 г. Ж. Л. Прево и Ж. Б. Дюма заявили, что спермии — не паразиты, а активные участники оплодотворения. Этими исследователями было установлено неизменное присутствие спермиев у половозрелых самцов и их отсутствие у не достигших зрелости и старых особей. Эти наблюдения в сочетании с известным фактом отсутствия спермиев у стерильных мулов привели к заключению, что «существует тесная зависимость между их присутствием в половых органах и плодовитостью животного». Прево и Дюма утверждали, что на самом деле спермий проникает в яйцо и вносит материальный вклад в формирование следующего поколения.

Эти утверждения, как правило, не находили признания, пока в 1840-х годах А. фон Кёлликер не описал образование спермиев из клеток семенника. Он пришел к выводу, что спермии являются сильно измененными клетками, которые образуются в семенниках взрослых самцов. Кёлликер высмеял идею, что наличие спермы может быть нормальным явлением, если она нужна только для того, чтобы поддерживать существование огромного числа паразитов. Несмотря на все это, он считал, что между спермием и яйцом отсутствует какой-либо физический контакт. Он полагал, что спермий побуждает яйцо к развитию подобно тому, как магнит воздействует на железо. И только в 1876 г. Оскар Гертвиг наглядно продемонстрировал проникновение спермия в яйцо и соединение их ядер. Гертвиг разыскивал организм, пригодный для тщательных микроскопических наблюдений, и нашел, что средиземноморский морской еж *Toxopneustes lividus* прекрасно отвечает его требованиям. *T. lividus* был не только обычен в данном районе, и особи этого вида со зрелыми половыми продуктами встречались на протяжении большей части года, но его яйца были доступны в большом числе и были достаточно прозрачны для наблюдений даже при больших увеличениях. После смешивания суспензий спермиев и яиц Гертвиг многократно наблюдал проникновение спермия в яйцо и слияние двух ядер. Он заметил также, что в каждое яйцо проникает только один спермий и что все ядра зародыша являются потомками ядра, возникшего в результате слияния ядер спермия и яйца при оплодотворении. Наблюдения Гертвига были вскоре дополнены Германом Фолем, который проследил в деталях механизм проникновения спермия. Наконец, было признано, что оплодотворение представляет собой слияние спермия и яйца, и соединение гамет

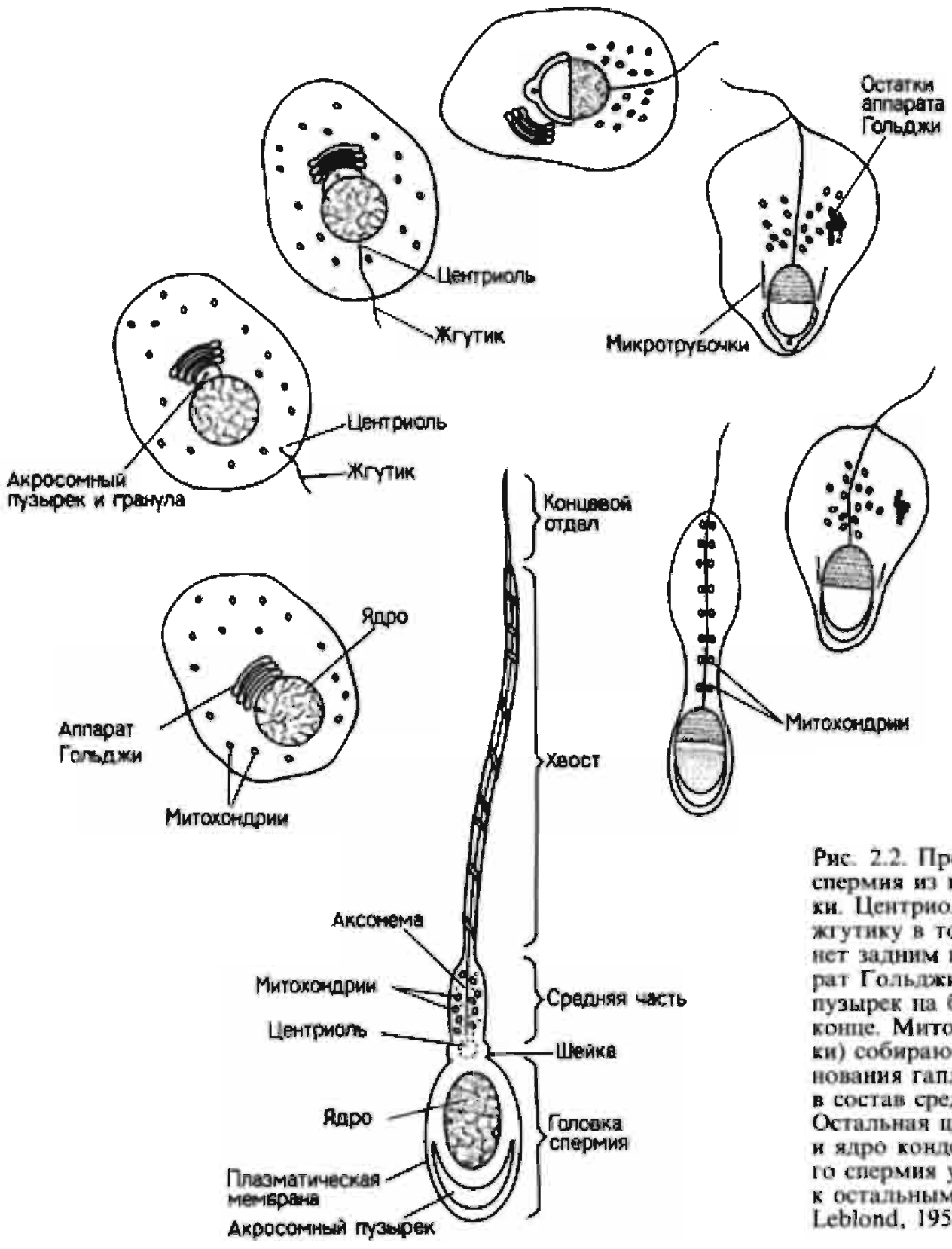
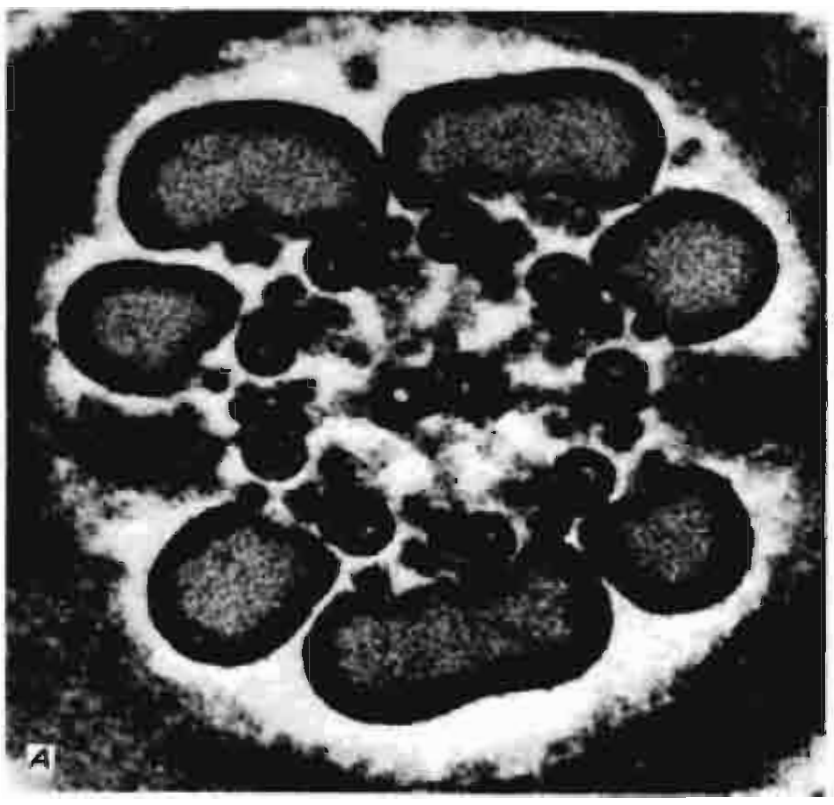


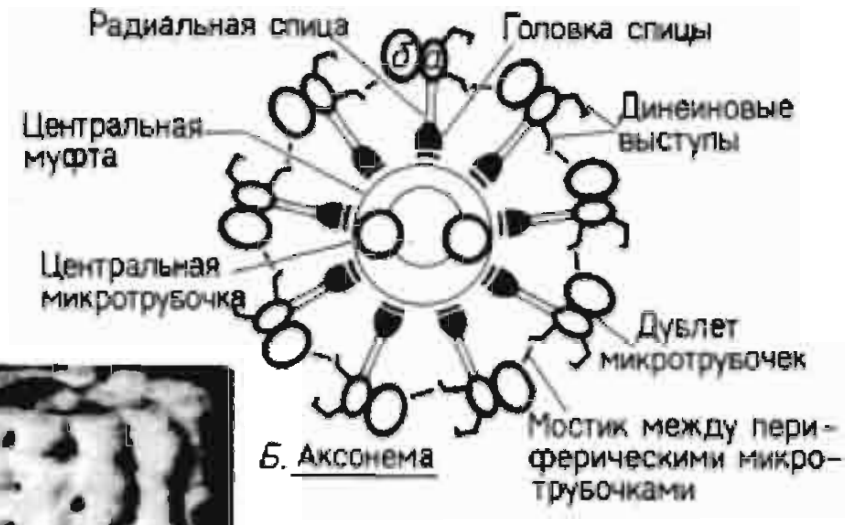
Рис. 2.2. Процесс формирования спермия из первичной половой клетки. Центриоль дает начало длинному жгутику в той области, которая станет задним концом спермия, а аппарат Гольджи образует акросомный пузырек на будущем его переднем конце. Митохондрии (мелкие кружочки) собираются около жгутика у основания гаплоидного ядра и входят в состав средней части спермия. Остальная цитоплазма сбрасывается, и ядро конденсируется. Размер зрелого спермия увеличен по отношению к остальным рисункам. (По Clermont, Leblond, 1955.)

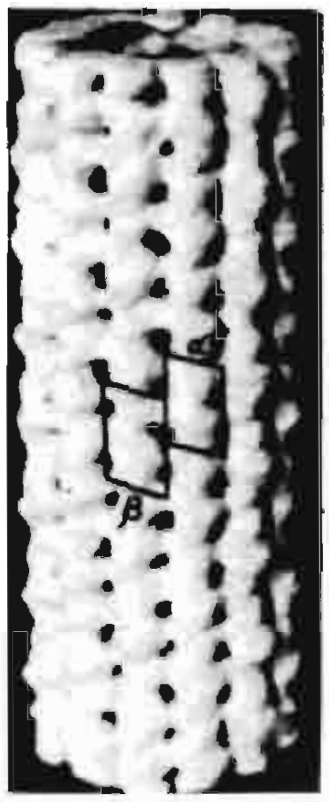
у морского ежа до сих пор остается наиболее изученным примером оплодотворения.

Известно, что каждый спермий содержит гаплоидное ядро, двигательную систему, обеспечивающую перемещение ядра, и мешок, заполненный ферментами, необходимыми для проникновения ядра в яйцо. Бóльшая часть цитоплазмы спермия элиминируется при его созревании, и сохраняются только некоторые органеллы, видоизмененные для выполнения спермием своей функции (рис. 2.2). В период созревания спермия его гаплоидное ядро приобретает обтекаемую форму, а ДНК сильно уплотняется. Впереди от такого конденсированного гаплоидного ядра лежит **акросомный пузырек**, произошедший от аппарата Гольджи и содержащий ферменты, которые переваривают белки и полисахариды. Таким образом, его можно рассматривать как измененную лизосому. Запас ферментов в акросомном пузырьке служит для проникновения спермия через наружные покровы яйца. У многих видов, например у морских ежей, между ядром и акросомным пузырьком имеется область, содержащая глобулярный актин. На ранних стадиях оплодотворения этот актин используется для образования пальцеобразного выроста. У таких видов молекулы на поверхности **акросомного выроста** участвуют в узнавании спермием и яйцом друг друга. Акросома и ядро вместе образуют головку спермия.

Способ передвижения спермиев различается в зависимости от того, каким образом вид адаптирован







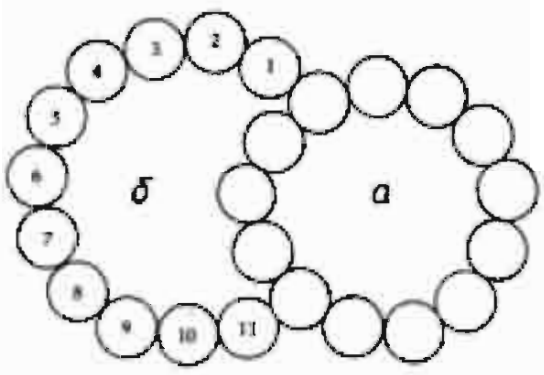


Рис. 2.3. Двигательный аппарат спермия. *А*. Поперечный срез жгутика спермия млекопитающего; видны центрально расположенная аксонема и наружные волокна. *Б*. Пояснительная схема строения аксонемы: изображен комплекс микротрубочек типа «9 + 2» и другие компоненты жгутика. *В*. Схематически изображено взаимное расположение микрофиламентов тубулина в дублете микротрубочек. Одна часть дублета (*а*) является нормальной микротрубочкой, содержащей 13 микрофиламентов. Другая часть (*б*) содержит только 11 (иногда 10) микрофиламентов. *Г*. Трехмерная модель микротрубочки *а*; α-и β-субъединицы тубулина сходны, но не идентичны. Размеры микротрубочки могут изменяться в результате полимеризации или деполимеризации субъединиц тубулина на любом ее конце. (*А* — с любезного разрешения D. M. Phillips; *Б* — по De Robertis et al., 1975; *В* — по Tilney et al., 1973; *Г* — по Amos, Klug, 1974; фотографии с любезного разрешения авторов.)

к условиям окружающей среды. У некоторых видов (как, например, у паразитического круглого червя аскариды) спермий перемещается при помощи амебоидного движения **ламеллиподий** — локальных выростов клеточной мембраны. У большинства видов, однако, спермии способны передвигаться на большие расстояния благодаря биению своих **жгутиков**.

Жгутики имеют сложное строение. Главная двигательная структура жгутика называется **аксонемой**. Аксонему образуют **микротрубочки**, отходящие от центриоли, которая находится в основании ядра спермия (рис. 2.2; 2.3, *Б*). Стержень аксонемы состоит из двух центральных одиночных микротрубочек, окруженных кольцом из девяти двойных микротрубочек (дублетов). В действительности только одна микротрубочка каждого дублета имеет законченное строение и содержит 13 протофиламентов, тогда как вторая имеет С-образное строение и содержит только 11 протофиламентов (рис. 2.3, *А*—*В*). Трехмерная модель микротрубочки законченного строения представлена на рис. 2.3, *Г*. На этом рисунке можно видеть 13 связанных между собой протофиламентов, образованных только димерным белком **тубулином**.

С микротрубочками связан другой белок — **динеин** (рис. 2.3, *Б*). Этот белок может гидролизовать молекулы аденозинтрифосфата (АТФ) и преобразовывать выделяющуюся при этом химическую энергию в механическую, за счет которой осуществляется движение спермия (Ogawa et al., 1977). Важная роль белка динеина очевидна на примере мужчин с генетическим синдромом, называемым триадой

Картедженера. У таких мужчин динеин отсутствует во всех клетках, обладающих ресничками и жгутиками; соответственно, эти органеллы неподвижны. Мужчины, страдающие таким заболеванием, стерильны (так как спермии неподвижны), подвержены респираторным инфекциям (из-за неподвижности ресничек дыхательных путей), и у них в 50% случаев сердце располагается справа (Afzelius, 1976).

Набор микротрубочек типа «9 + 2» с динеиновыми выступами сохранился во всем царстве эукариот, что свидетельствует об исключительной эффективности такой организации для передачи энергии, обеспечивающей движение. Энергия для биения жгутика, благодаря которому осуществляется продвижение спермия, исходит от кольца митохондрий, расположенных в области шейки спермия (рис. 2.2).

У многих видов (преимущественно у млекопитающих) между митохондриями и аксонемой располагается слой плотных волокон. Этот слой придает хвостовому отделу спермия бóльшую жесткость. Поскольку толщина этого слоя уменьшается по направлению к кончику хвоста, можно думать, что волокна служат для предотвращения слишком резких изгибов головки. Таким образом, для того чтобы перенести материал своего ядра в яйцеклетку, спермий претерпел далеко идущие преобразования.

Яйцо

Все материалы, необходимые для начальных стадий роста и развития зародыша, должны быть запасены в зрелом **яйце**. Поэтому, если спермий избавляется от большей части своей цитоплазмы, то развивающееся яйцо не только сохраняет содержащиеся в нем запасные материалы, но и активно увеличивает их количество. Оно либо само синтезирует, либо поглощает белки желтка, который служит источником питания развивающегося зародыша. Так, яйцо птиц представляет собой огромную одиночную клетку, достигшую таких размеров благодаря накоплению желтка. Даже яйца с относительно небольшим содержанием желтка имеют значительные размеры. Объем яйца морского ежа составляет около $2 \cdot 10^5$ мкм^3 и превосходит объем спермия более чем в 10 000 раз. На схематическом рисунке 2.4 показано соотношение их размеров. На этом рисунке изображены также различные структурные элементы зрелого яйца. Если в яйце и спермии содержатся количественно равные гаплоидные ядерные компоненты, то по содержанию цитоплазматических компонентов различия между ними очень велики. Так, цитоплазма яйца представляет собой огромную кладовую запасов, накопленных в период вителлогенеза. Эти запасы включают белки, рибосомы и транспортную

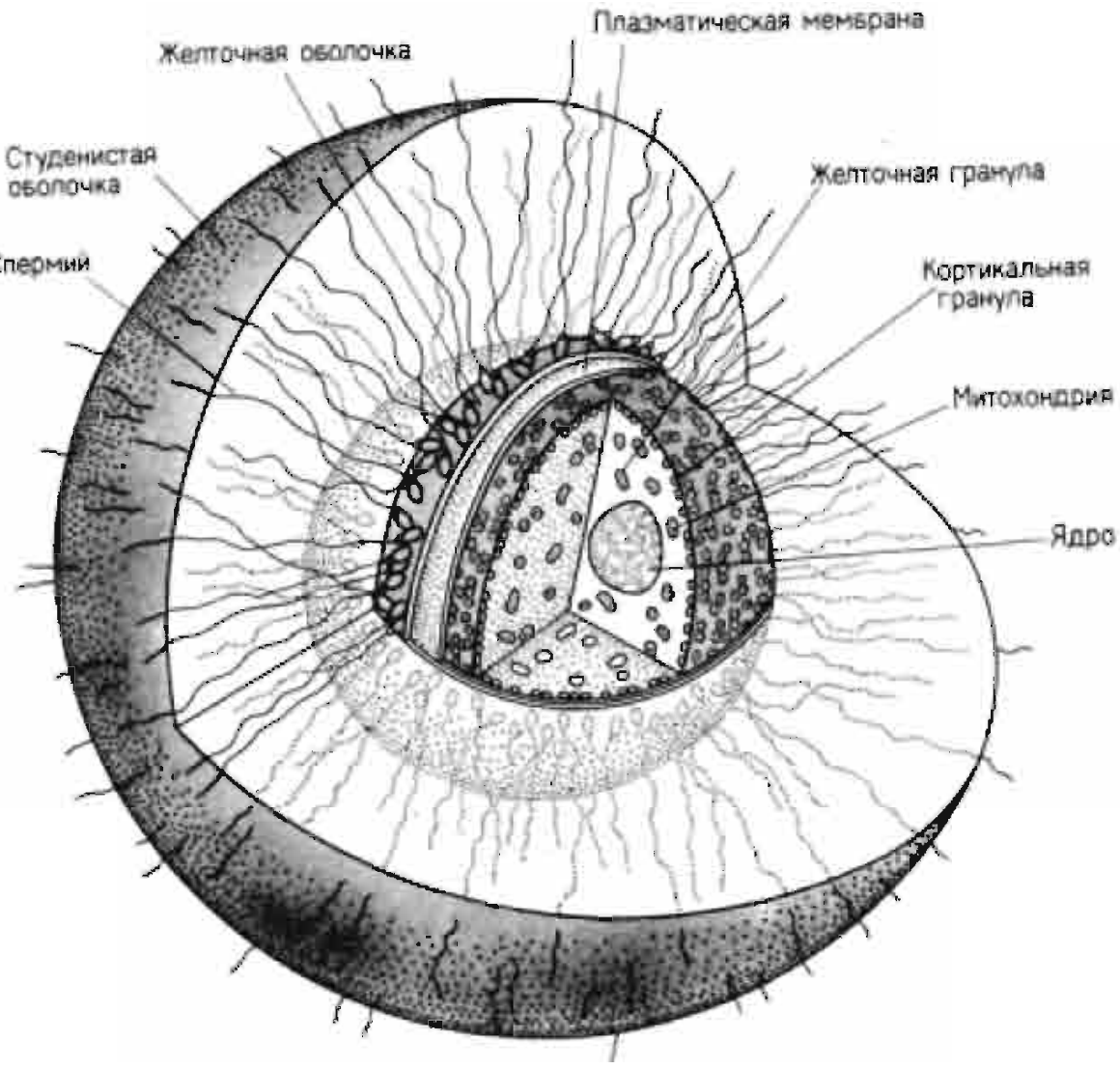


Рис. 2.4. Строение яйца морского ежа в момент оплодотворения. (По Epel, 1977.)

РНК (тРНК), матричную РНК и морфогенетические факторы.

1. *Белки.* Пройдет еще много времени, прежде чем зародыш окажется способным самостоятельно питаться или получать пищу от матери. Клетки зародыша на ранних стадиях нуждаются в запасенных заранее источниках энергии и аминокислот. У многих видов такими источниками являются накопленные яйцом белки желтка. Многие из желточных белков синтезируются в других органах (печени, жировом теле) и транспортируются к яйцу.
2. *Рибосомы и тРНК.* Как мы увидим ниже, вскоре после оплодотворения в яйце резко увеличивается синтез белка. Этот синтез осуществляется при участии рибосом и тРНК, которые уже имеются в яйце. Развивающееся яйцо (**ооцит**) обладает специальным механизмом синтеза рибосом, и в ооцитах некоторых амфибий в течение профазы мейоза образуется до 10^{12} рибосом.
3. *Матричная РНК.* У большинства организмов информация для осуществления белкового синтеза, происходящего в раннем развитии, заключена уже в ооците. Полагают, что яйца морского ежа содержат 25—50 тыс. различных типов мРНК. Однако эти мРНК до оплодотворения остаются в неактивном состоянии.
4. *Морфогенетические факторы.* Эти молекулы, направляющие дифференцировку клеток для образования различных тканей и органов, по-видимому, рассеяны по всему яйцу и распределяются между разными клетками при дроблении (гл. 7 и 8).

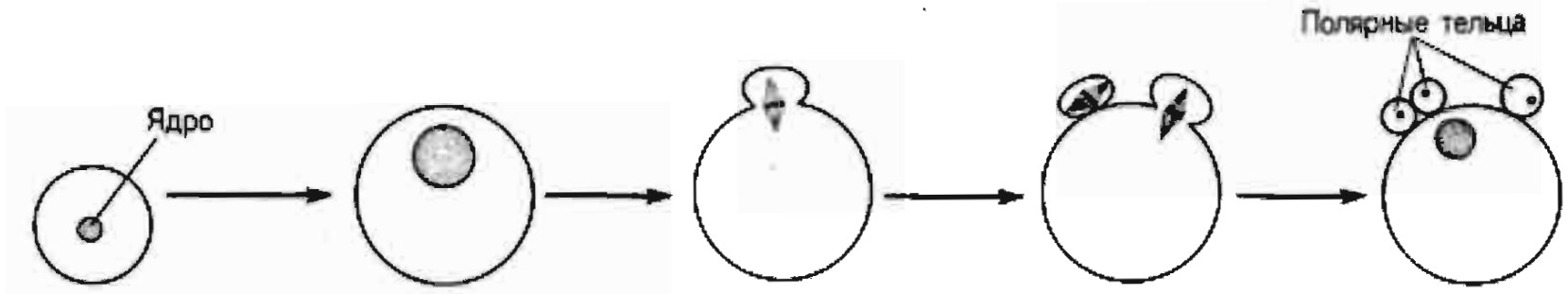
Внутри этого огромного объема цитоплазмы яйца располагается большое ядро. У некоторых видов животных (например, у морского ежа) ядро к моменту оплодотворения уже гаплоидное. У других видов (в том числе у многих червей и некоторых млекопитающих) ядро яйца в это время еще диплоидное, и спермий проникает в цитоплазму до завершения мейотических делений. Стадии, на которых находится ядро яйца ко времени проникновения спермия, представлены на рис. 2.5.

Цитоплазма яйца окружена **плазматической мембраной**. Во время оплодотворения она регулирует поступление в яйцо некоторых ионов (главным образом Na^+) и способна сливаться с плазматической мембраной спермия. К плазматической мембране снаружи примыкает **желточная оболочка** (рис. 2.6). Образованная гликопротеинами, эта оболочка играет важную роль в обеспечении видовой специфичности прикрепления спермия. У млекопитающих желточная оболочка очень толстая и носит название **прозрачной оболочки** (zona pellucida). Яйцо млекопитающих окружено также слоем клеток **лучистого венца** (corona radiata; рис. 2.7). Это фолликулярные клетки, которые доставляли пищу яйцу вплоть до его овуляции. Чтобы оплодотворить яйцо, спермий должен преодолеть также и этот слой [1].

Слой цитоплазмы, располагающийся непосредственно под плазматической мембраной яйца морского ежа, называется кортикальным слоем или кортексом. Цитоплазма этого слоя имеет более упорядоченное строение, чем цитоплазма более глубоких слоев, и в ней содержатся высокие концентрации глобулярных молекул актина. При оплодотворении молекулы актина полимеризуются, образуя длинные тяжи, известные под названием **микрофиламентов**. Микрофиламенты необходимы для осуществления клеточного деления; кроме того, они участвуют в образовании выростов, увеличивающих клеточную поверхность,— микроворсинок, которые способствуют проникновению спермия в клетку (рис. 2.6 и 2.18). Кортикальная цитоплазма гораздо более вязкая, чем расположенная глубже основная масса цитоплазмы, и она не смещается при центрифугировании. В кортексе заключены **кортикальные гранулы** (рис. 2.4; 2.6). Эти мембранные структуры гомологичны акросомному пузырьку спермия, поскольку они содержат протеолитические ферменты и формируются аппаратом Гольджи. Однако если каждый спермий имеет один акросомный пузырек, то каждое яйцо содержит приблизительно 15 000 кортикальных гранул. Кроме того, в кортикальных гранулах помимо пищеварительных ферментов содержатся мукополисахариды и белок гиалинового слоя. Ферменты и мукополисахариды участвуют в защите яйца от проникновения сверхчисленных спермиев после того, как первый спермий придет в контакт с ним; белок гиалинового слоя окружает зародыш на ранних стадиях развития и объединяет бластомеры в период дробления.

Яйца многих типов выделяют также студенистое вещество, располагающееся поверх желточной оболочки. Этот студенистый гликопротеиновый слой выполняет различные функции, но одна из главных его функций — это привлечение или активация сперм-

[1] У некоторых видов млекопитающих во внеклеточных покровах яйца различают три разных образования: 1) прозрачная оболочка (zona pellucida); 2) яйценосный бугорок (cumulus oophorus) и 3) лучистый венец (corona radiata). В этих случаях лучистым венцом называют те фолликулярные клетки, которые примыкают непосредственно к прозрачной оболочке, а термин **яйценосный бугорок** применяют к более диффузно распределенным клеткам, расположенным на большем расстоянии от яйца. У многих млекопитающих (например, у хомячка, рис. 2.7, *Б*) провести границу между яйценосным бугорком и лучистым венцом нелегко; у других (таких, как овца и корова) они, по-видимому, сбрасываются до оплодотворения (см. Talbot, 1985). Клетки лучистого венца и яйценосного бугорка погружены в матрикс, состоящий преимущественно из гиалуроновой кислоты.



Ооцит первого порядка в начале периода роста	Ооцит первого порядка дефинитивного размера	Метафаза I	Метафаза II	Женский пронуклеус
Кольчатые черви *Dinophilus*, *Saccocirrus*	Круглый червь *Ascaris*	Немертина *Cerebratulus*	Ланцетник *Branchiostoma*	Кишечнополостные (например, актинии)
Многощетинковый червь *Histriobdella*	Представитель Mesozoa *Dicyema*	Многощетинковые черви *Chaetopterus*, *Pectinaria*	Амфибии	Морские ежи
Плоский червь *Otomesostoma*	Губка *Grantia*	Моллюск *Dentalium*	Большинство млекопитающих	
Онихофора *Peripatopsis*	Многощетинковые черви *Myzostoma*, *Nereis*	Многие насекомые		
	Двустворчатый моллюск *Spisula*			
	Эхиурида *Thalassema*			
	Собаки и лисицы			

Рис. 2.5. Стадии созревания, на которых находятся яйца, когда в них проникает спермий, у разных животных. (По Austin, 1965.)

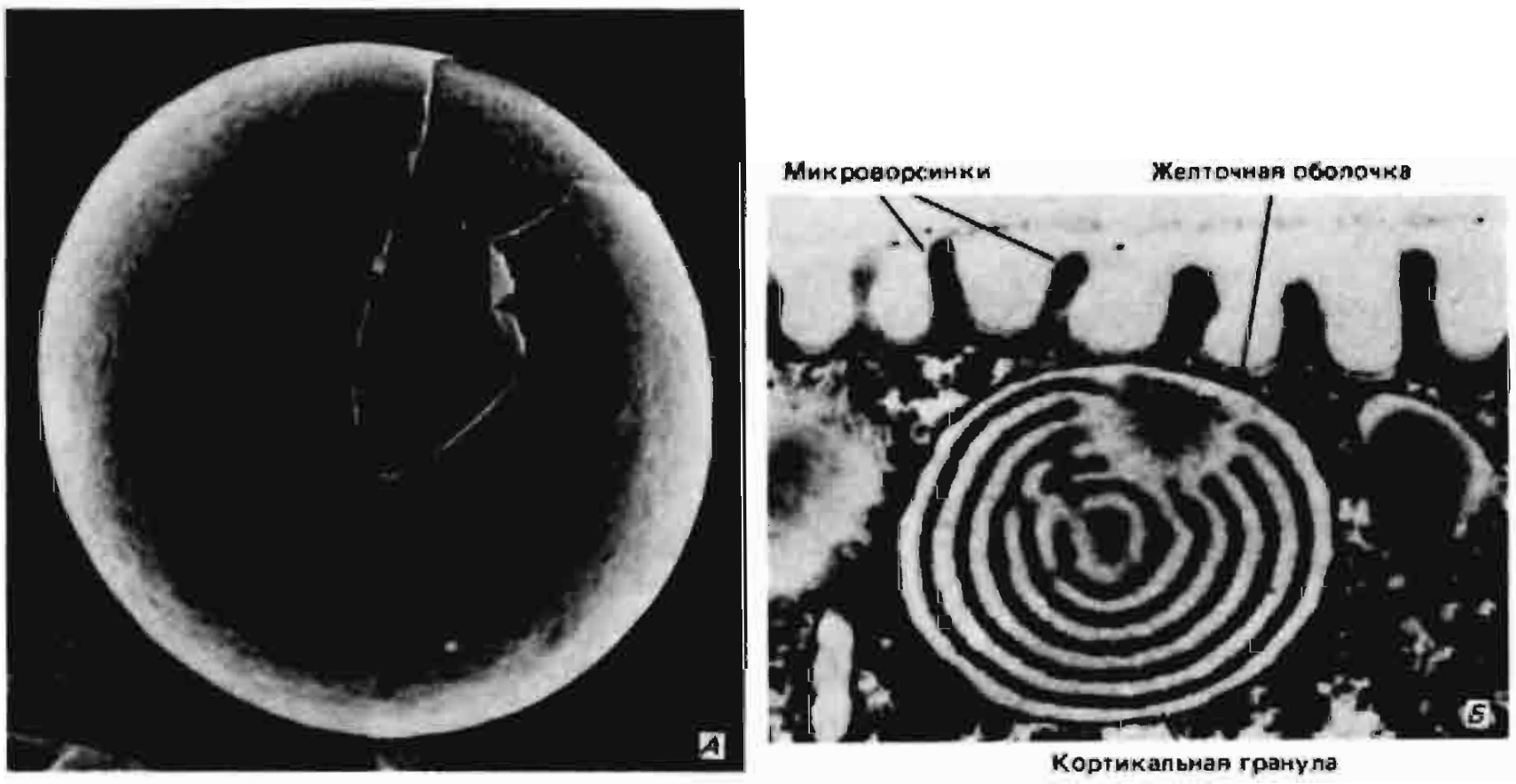


Рис. 2.6. Поверхность яйца морского ежа. *А*. Микрофотография яйца перед оплодотворением (получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). В месте разрыва желточной оболочки обнажена плазматическая мембрана. *Б*. Микрофотография неоплодотворенного яйца (получена с помощью просвечивающего электронного микроскопа). Видны микроворсинки и плазматическая мембрана, вплотную к которой прилежит желточная оболочка. Непосредственно под плазматической мембраной яйца видна кортикальная гранула. (Из Schroeder, 1979; фотографии с любезного разрешения T. E. Schroeder.)

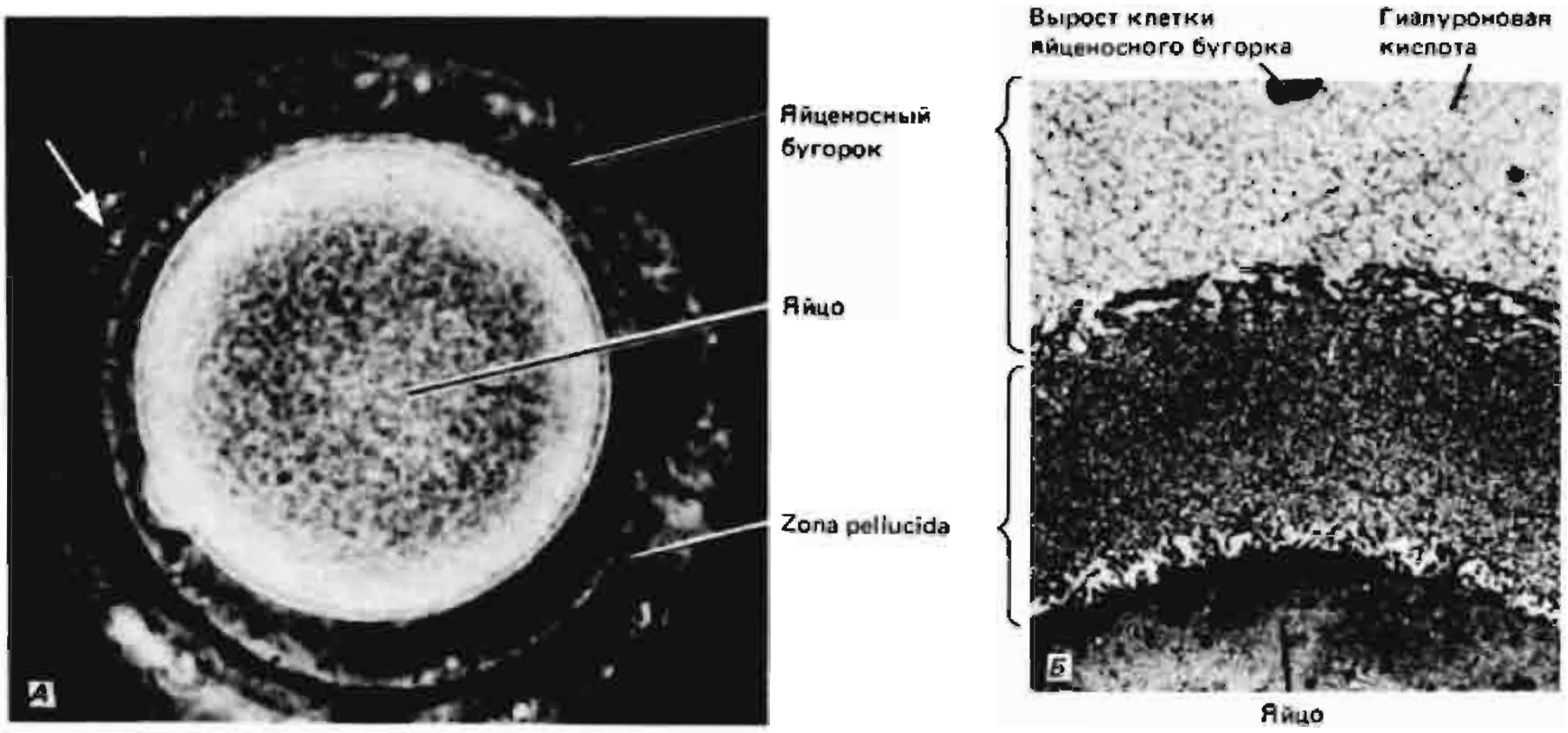


Рис. 2.7. Яйцо млекопитающего непосредственно перед оплодотворением. Яйцо одето прозрачной оболочкой (zona pellucida). Последняя в свою очередь окружена клетками яйценосного бугорка (cumulus oophorus). В яйце человека (*А*) спермий (указан стрелкой) преодолел слой клеток яйценосного бугорка, но должен еще проникнуть через прозрачную оболочку, чтобы достигнуть поверхности цитоплазмы и осуществить оплодотворение. *Б*. Микрофотография яйца хомячка (получена с помощью просвечивающего электронного микроскопа). Яйцо фиксировано таким образом, чтобы сохранилась структура прозрачной оболочки и образованного гиалуроновой кислотой матрикса, окружающего яйцо. В этом матриксе виден вырост клетки яйценосного бугорка. (*А* — с любезного разрешения R. Yanagimachi; *Б* — из Yudin et al., 1988; с любезного разрешения G. Cherr.)

миев. Таким образом, яйцо представляет собой клетку, специализированную для восприятия спермия и инициации развития.

Узнавание спермия и яйца: воздействие на расстоянии

Многие морские организмы выметывают гаметы непосредственно в окружающую среду. Этой средой может быть маленькая лужа, образовавшаяся при отливе, а может быть и океан. В эту среду одновременно могут выметывать свои половые продукты представители других видов. Размножающиеся таким образом организмы сталкиваются с двумя проблемами: 1) осуществление встречи спермиев и яиц при столь низкой их концентрации и 2) создание механизмов, препятствующих оплодотворению яиц спермиями другого вида, например яиц морского ежа спермиями морской звезды. Для разрешения этих проблем в процессе эволюции выработалось два механизма: видоспецифическое привлечение спермиев и видоспецифическая их активация.

Привлечение спермиев

Видоспецифическое привлечение спермиев (род хемотаксиса) доказано для многих животных, в том числе для кишечнополостных, моллюсков, иглокожих и первичнохордовых (Miller, 1985). Еще в 1978 г. Миллер (Miller, 1978) показал, что яйца кишечнополостного *Orthopyxis caliculata* не только секретируют хемотактический фактор, но и регулируют время его выделения. Развивающиеся ооциты на разных стадиях созревания приклеивали к предметным стеклам и на некотором расстоянии от них помещали сперму. Если яйца еще не завершили второго деления мейоза, то спермии никак не реагировали на них. Однако после завершения второго деления мейоза, когда яйца были уже готовы к оплодотворению, спермии перемещались по направлению к ним. Таким образом, ооцит контролировал не только видовую принадлежность спермиев, которых он будет привлекать, но и время, когда он будет их привлекать.

Механизмы хемотаксиса у разных животных различны (см. обзор Metz, 1978). До последнего времени ни один из хемотактических факторов идентифицирован не был. Однако недавно из яиц морского ежа выделили два видоспецифических аттрактанта спермиев: **сперакт** — пептид, содержащий 10 аминокислотных остатков, был выделен из яиц *Strongylocentrotus purpuratus* (Hansbrough, Garbers, 1981), а **резакт** — пептид, содержащий 14 аминокислотных остатков,— из студенистой оболочки яиц *Arbacia punctulata* (Ward et al., 1985). Резакт быстро диффундирует в морской воде и при добавлении к суспен-

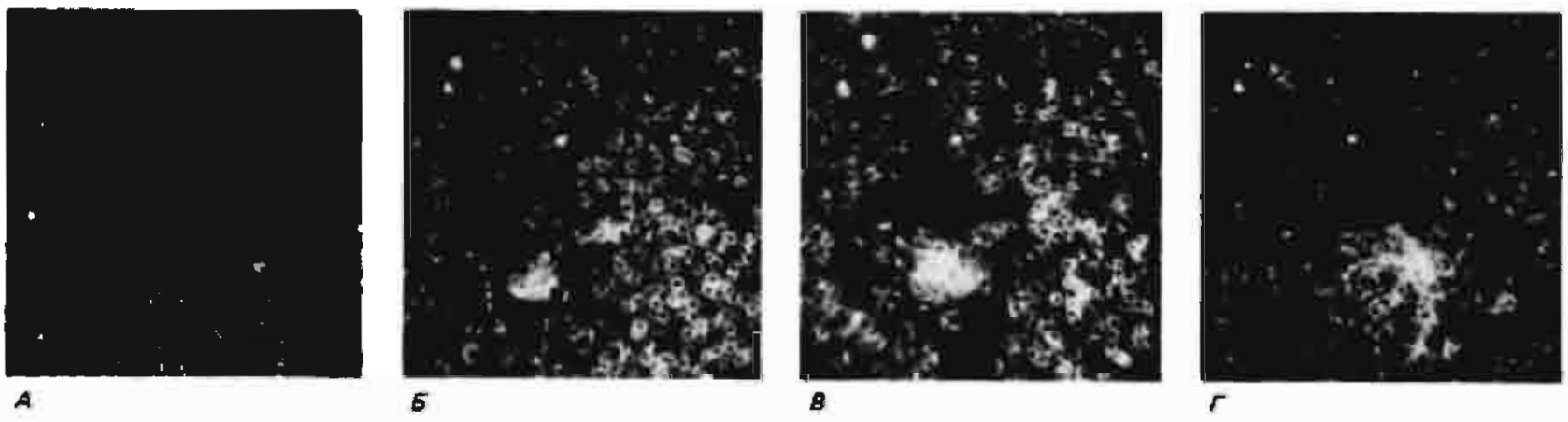


Рис. 2.8. Хемотаксис спермиев у *Arbacia*. В каплю суспензии спермиев объемом 20 мкл вносили 1 мл раствора резакта (концентрация 10 нМ). *А*. Фотография, сделанная с экспозицией 1 с; показано положение микропипетки. До добавления резакта спермии плавают кругами, диаметры которых очень малы. *Б—Г*. Также 1-секундные экспозиции; миграция спермиев к центру градиента резакта соответственно через 20, 40 и 90 с после его введения. (Из Ward et al., 1985; фотографии с любезного разрешения V. Vacquier.)

зии спермиев *Arbacia* оказывает сильное воздействие в очень низких концентрациях (рис. 2.8). Когда на предметное стекло помещают каплю морской воды со спермой *Arbacia*, спермии обычно плавают кругами диаметром около 50 мкм. Через несколько секунд после внесения в каплю незначительного количества резакта спермии мигрируют в ту область, куда он был внесен, и скапливаются в ней. По мере того как резакт диффундирует из этой области, к скоплению присоединяются новые спермии.

Воздействие резакта видоспецифично, и он не привлекает спермии других видов. Поверхностными рецепторами спермиев *Arbacia* резакт связывается (Bentley et al., 1986), поэтому спермии плывут по градиенту концентрации этого соединения до тех пор, пока не достигнут яйца.

Акросомная реакция

Второй тип взаимодействия спермия и яйца — это активация спермия материалом студенистой оболочки, вызывающим акросомную реакцию. У большинства морских беспозвоночных акросомная реакция протекает в два этапа: разрыв акросомного пузырька и выдвижение акросомного выроста (Colwin, Colwin, 1963; рис. 2.9). Акросомную реакцию может инициировать растворенный материал студенистой оболочки, сама студенистая оболочка и у некоторых видов непосредственный контакт с яйцом. Эта реакция может быть также вызвана искусственным повышением концентрации кальция в морской воде.

У морских ежей контакт со студенистой оболочкой вызывает разрушение акросомного пузырька и выделение протеолитических ферментов, которые прокладывают спермию путь через эту оболочку к поверхности яйца (Dan, 1967; Franklin, 1970; Levine et al., 1978). Последовательность событий представлена на рис. 2.10. Полагают, что акросомную реакцию инициируют сульфатированные полисахариды студенистой оболочки, которые вызывают поступление ионов кальция и натрия в головку спермия и за-

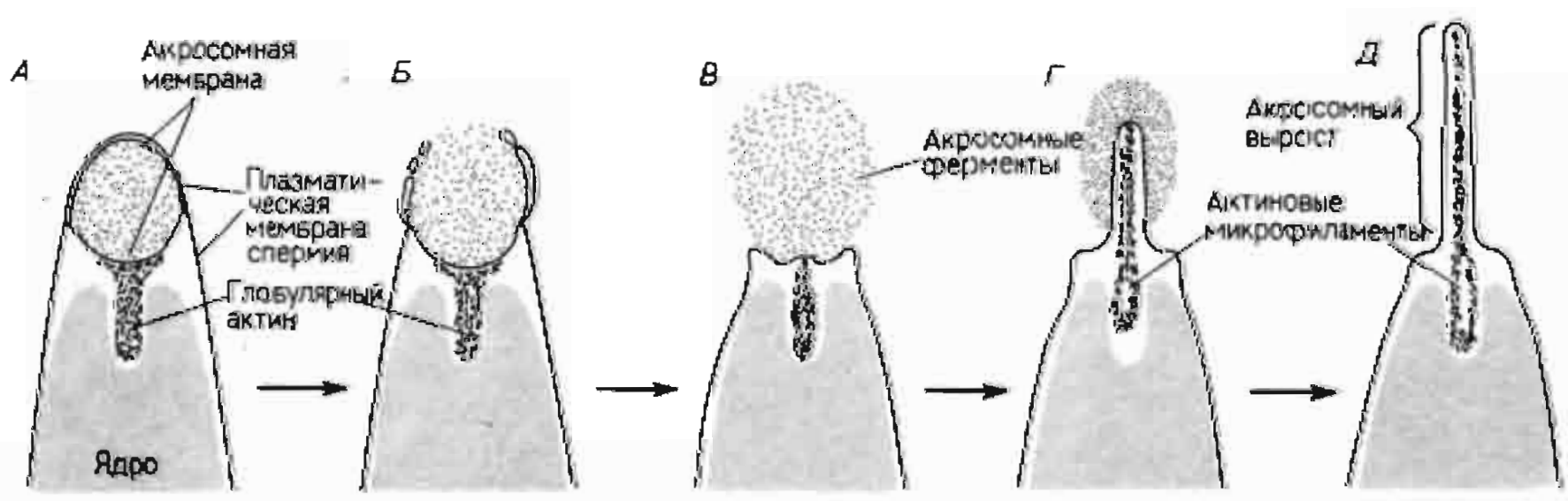


Рис. 2.9. Акросомная реакция спермия морского ежа. *А—В*. Участок акросомной мембраны, расположенный непосредственно под плазматической мембраной спермия, сливается с ней, и происходит выделение содержимого акросомного пузырька. *Г, Д*. По мере полимеризации молекул актина с образованием филаментов происходит выдвижение акросомного выроста вперед. (По Saunders, 1970.)

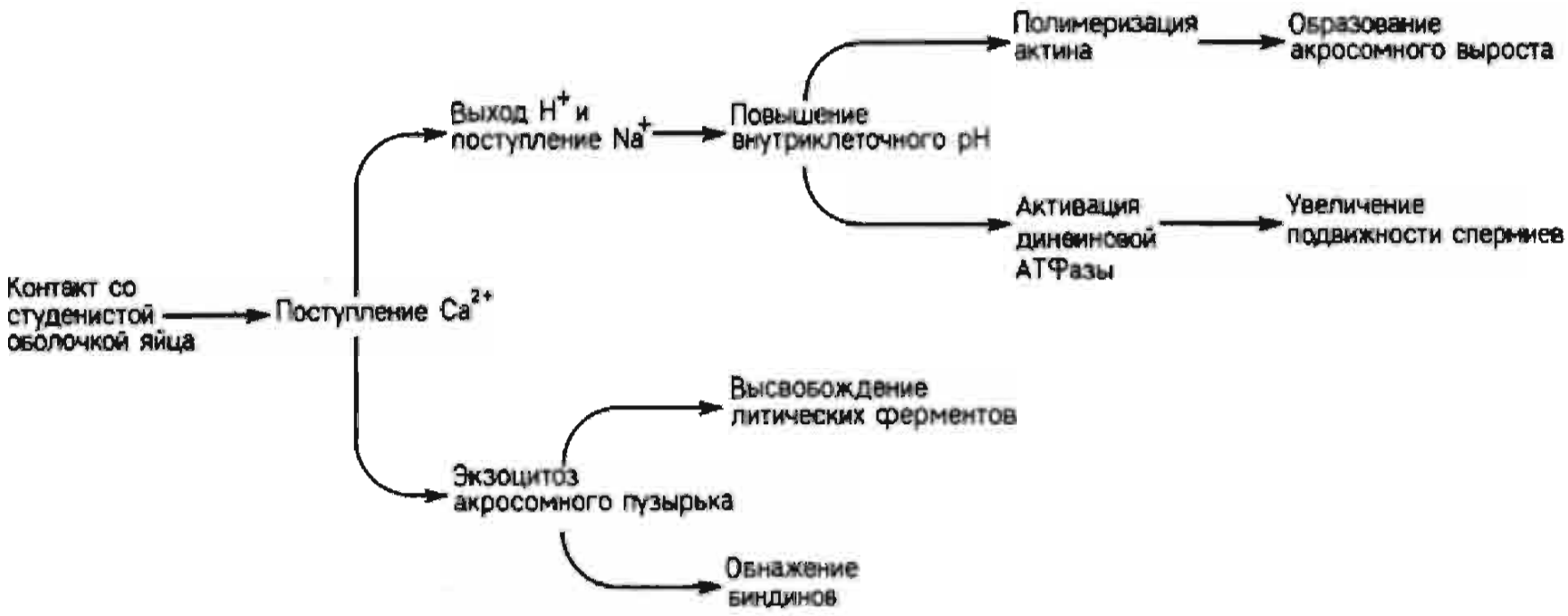


Рис. 2.10. Возможное взаимодействие процессов, происходящих при акросомной реакции у морского ежа. (По Schackmann, Shapiro, 1981.)

мещение ими ионов калия и водорода (SeGall, Lennarz, 1979; Schackmann, Shapiro, 1981). Разрыв акросомного пузырька происходит в результате кальций-зависимого слияния акросомной мембраны с прилежащей плазматической мембраной спермия (рис. 2.9; 2.11). Это по сути дела реакция экзоцитоза, заключающаяся в том, что пузырек приближается к клеточной поверхности и, сливаясь с плазматической мембраной, выделяет свое содержимое наружу. Такие реакции экзоцитоза наблюдаются при выделении инсулина клетками поджелудочной железы и при выделении нейромедиаторов из синаптических окончаний. Во всех этих случаях происходит кальций-зависимое слияние секреторного пузырька с плазматической мембраной.

Второй этап акросомной реакции заключается

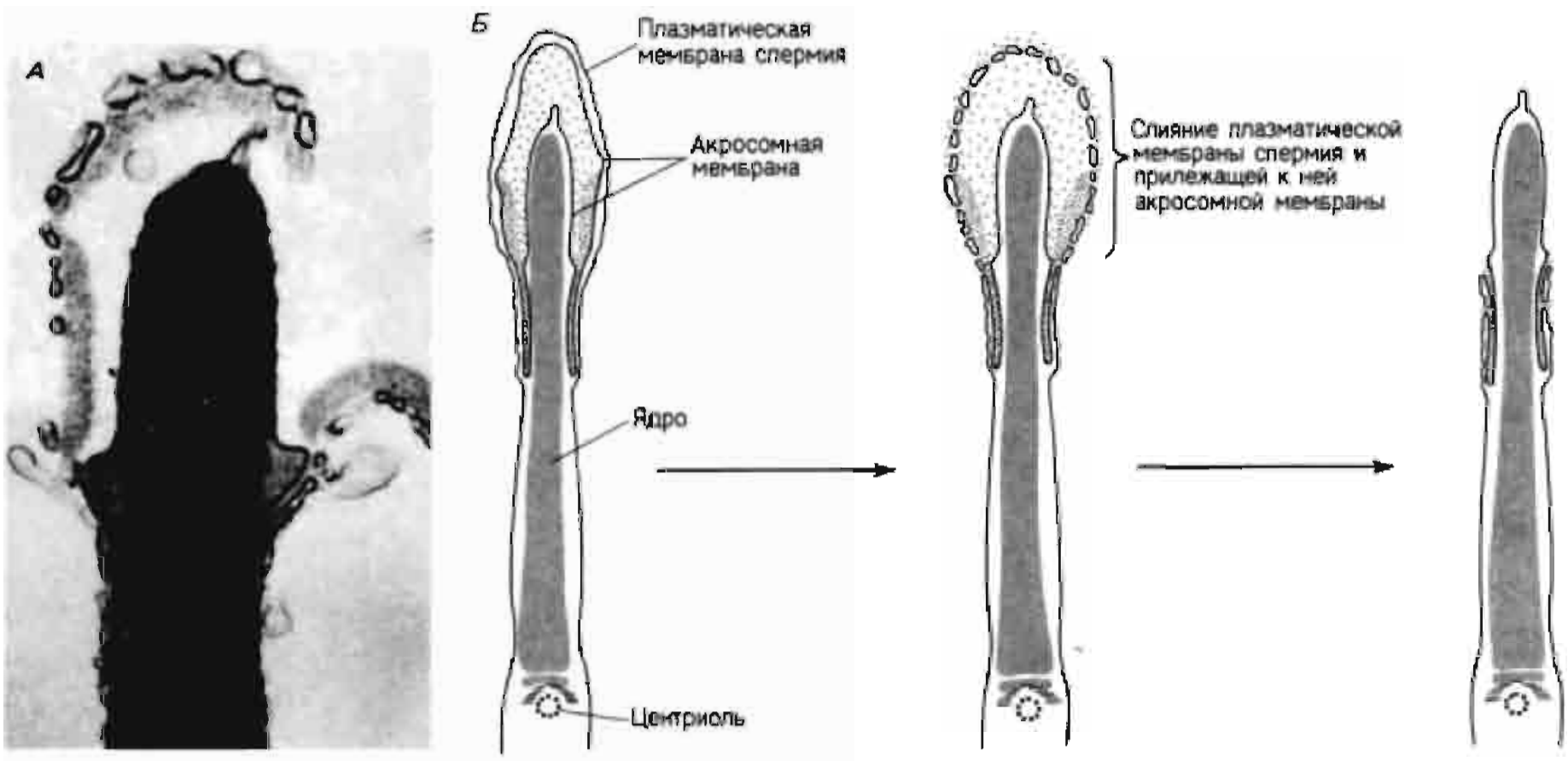


Рис. 2.11. Акросомная реакция спермия хомячка. *А*. Микрофотография спермия хомячка, осуществляющего акросомную реакцию, полученная с помощью просвечивающего электронного микроскопа. Можно видеть, что мембрана образует пузырьки. *Б*. Пояснительный схематический рисунок, выполненный по электронным микрофотографиям, который демонстрирует слияние акросомной и плазматической мембран в головке спермия. (*А* — из Meizel, 1984; фотография с любезного разрешения S. Meizel. *Б* — по Yanagimachi, Noda, 1970.)

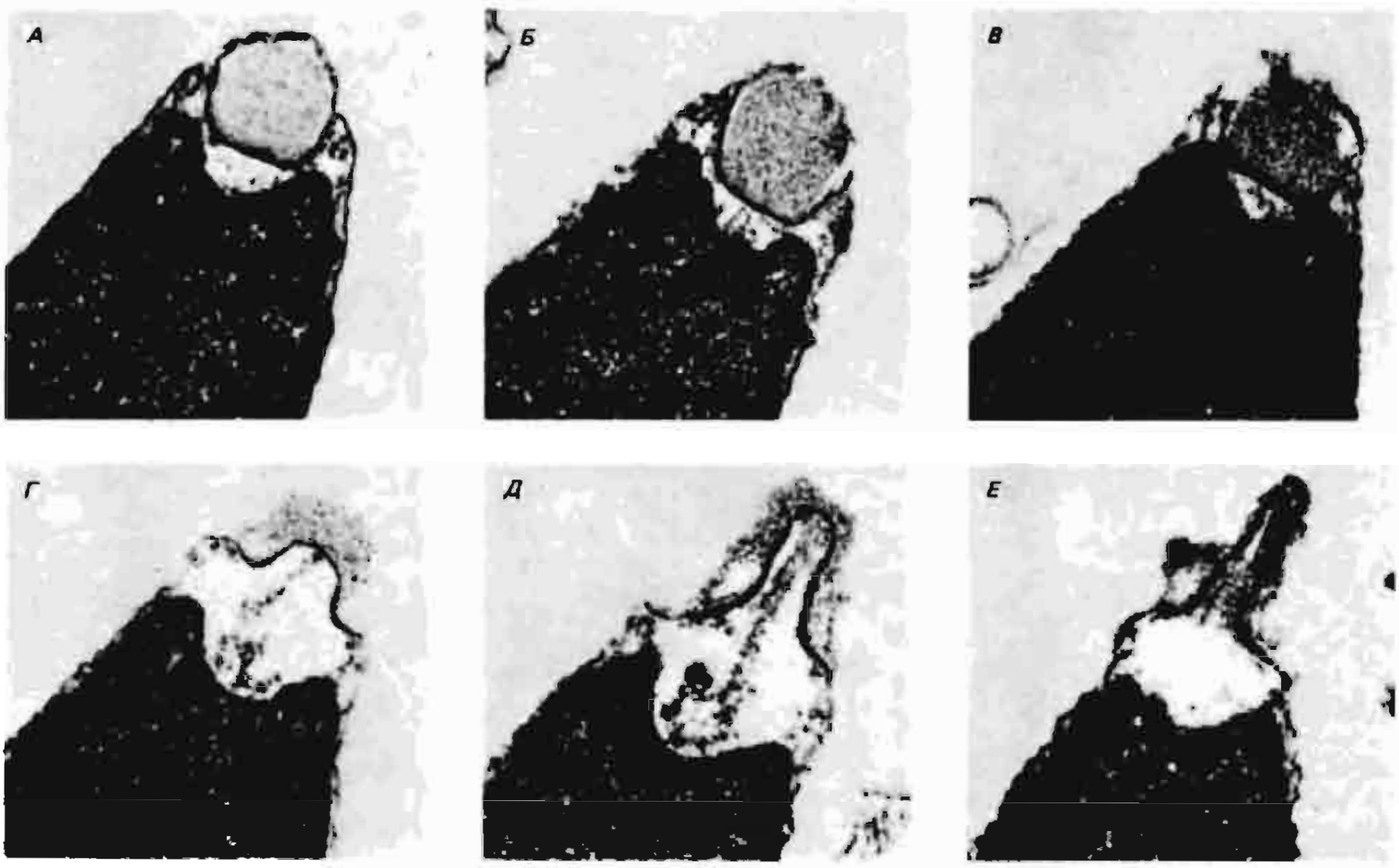


Рис. 2.12. Формирование акросомного выроста у спермия морского ежа. *А—В*. Экзоцитоз акросомного пузырька и высвобождение ферментов. *Г—Е*. Полимеризация актина приводит к образованию акросомного выроста. (Фотографии с любезного разрешения G. L. Decker и W. J. Lennarz.)

в образовании акросомного выроста (рис. 2.12). Этот вырост возникает в результате полимеризации молекул глобулярного актина и образования актиновых филаментов —процесс, вызываемый, как полагают, выходом ионов водорода из головки спермия (Tilney et al., 1978; Schackmann et al., 1978). До активации спермия полимеризация актина, вероятно, блокирована регуляторным белком; сопровождающее активацию повышение внутриклеточного pH может воспрепятствовать выполнению этой функции. Значительное повышение pH вызывает не только образование акросомного выроста, но и активирует динеиновую АТФазу в шейке спермия. В результате такой активации происходит быстрое использование АТФ и 50%-ное увеличение интенсивности дыхания митохондрий. Произведенная энергия используется главным образом для обеспечения движений жгутика (Tombes, Shapiro, 1985).

Действующее начало студенистой оболочки, инициирующее у морских ежей акросомную реакцию, часто бывает высокоспецифичным. Спермии морских ежей *Arbacia punctulata* и *Strongylocentrotus droebachiensis* реагируют только на воздействие материала студенистой оболочки яиц собственного вида. Однако спермии *S. purpuratus* могут быть активированы материалом студенистой оболочки яиц не только собственного вида, но и *Lytechinus variegatus* (но не *A. punctulata*) (Summers, Hylander, 1975). Следовательно, студенистая оболочка у некоторых видов (но не у всех) может обеспечивать видоспецифическое узнавание гамет.

Узнавание спермия и яйца: контакт между гаметами

Видоспецифическое узнавание у морских ежей

Сразу же после того, как спермий морского ежа проник в студенистую оболочку яйца, его акросомный вырост вступает в контакт с наружной поверхностью желточной оболочки (рис. 2.13). Основной этап видоспецифического узнавания осуществляется в этот момент. Белок акросомы, при посредстве которого происходит это узнавание, называется **биндином**. В 1977 г. Вакье с сотрудниками (Vacquier, Moy, 1977) изолировали этот нерастворимый белок с молекулярной массой 30 500 дальтон из акросомы спермиев *Strongylocentrotus purpuratus*: биндин способен



Рис. 2.13. Контакт акросомного выроста спермия морского ежа с микроворсинкой яйца. (Из Epel, 1977; фотография с любезного разрешения F. D. Collins и D. Epel.)

прикрепляться к яйцам *S. purpuratus*, освобожденным от студенистой оболочки, и к изолированным желточным оболочкам (рис. 2.14). Взаимодействие биндина с яйцом видоспецифично (Glabe, Vacquier, 1977; Glabe, Lennarz, 1979); этот белок, выделенный из акросомы спермиев *S. purpuratus*, вызывает агглютинацию яиц своего вида, освобожденных от студенистой оболочки, но не яиц близкородственного вида *S. franciscanus*.

Было обнаружено (Moy, Vacquier, 1979), что локализация биндина строго специфична — он находится на акросомном выросте, именно там, где он должен находиться, чтобы обеспечить узнавание спермием и яйцом друг друга. Использованный этими авторами метод иммунохимического окрашивания биндина представлен на рис. 2.15, *А*. Антитела к очищенному биндину морского ежа получали, инъецируя биндин кроликам. Спермии морского ежа, осуществившие акросомную реакцию, связывали этот антибиндин. После отмывания непрореагировавших антител спермии обрабатывали антителами свиньи, ковалентно связанными с пероксидазами и способными присоединяться к антителам кролика. В результате молекулы пероксидазы оказывались везде, где присутствовал биндин. Пероксидаза катализирует образование темного осадка при взаимодействии диаминобензидина и перекиси водорода. Когда к обработанным спермиям добавляли эти два субстрата, осадок покрывал акросомный вырост (рис. 2.15, *Б*). Более того, до осуществления акросомной реакции выявить биндин на поверхности спермия не удавалось, а затем его обнаруживали в месте соединения спермия с яйцом (рис. 2.15, *В*).

Данные биохимических исследований показали, что биндины близкородственных видов морских ежей на самом деле различны. Эти данные заставляют предположить существование на желточной оболочке видоспецифических рецепторов для связывания биндина. О том же свидетельствуют опыты по насыщению яиц морского ежа спермиями (Vacquier, Payne, 1973). Как видно на рис. 2.16, спермии прикрепляются к яйцу не на всей его поверхности. Даже в случаях насыщения спермиями (приблизительно 1500 спермиев на 1 яйцо) на поверхности желточной оболочки остаются свободные участки, что говорит об ограниченном числе мест для прикрепления спермиев. Из желточных оболочек яиц морского ежа был выделен крупный гликопротеиновый комплекс, который видоспецифическим образом связывал радиоактивный биндин (Glabe, Vacquier, 1978; Rossignol et al., 1984). Этот гликопротеин способен конкурировать с яйцами за спермии того же вида. Таким образом, если спермии *S. purpuratus* смешать с биндиновыми рецепторами из желточных оболочек *S. purpuratus*, то спермии прикрепятся к ним и не будут оплодотворять яйца. Однако выделенные биндиновые рецепторы *S. purpuratus* не препятствуют оплодотворению яиц родственных видов морских ежей. Следовательно, видоспецифическое узнавание гамет морского ежа происходит на двух уровнях — на уровне активации акросомной реакции и на уровне прикрепления спермия к желточной оболочке.

Соединение гамет у млекопитающих

До сих пор наше обсуждение касалось тех организмов, у которых оплодотворение происходит во внешней среде. У млекопитающих оплодотворение внутреннее и процесс оплодотворения приспособлен к внутренней среде организма. И в самом деле, было обнаружено, что у млекопитающих половые пути самки принимают активное участие в процессе оплодотворения. Спермии млекопитающих сразу после эякуляции не способны к акросомной реакции; для того чтобы эта реакция стала возможной, спермиям необходимо в течение некоторого времени находиться в половых путях самки. Условия, требующиеся для **капацитации** (приобретения спермиями оплодотворяющей способности), варьируют в зависимости от вида (Gwatkin, 1976); пребывание спермиев в половых путях самки может быть заменено их инкубацией in vitro в жидком содержимом яйцеводов или матки. Одна из гипотез относительно природы процесса капацитации постулирует, что процесс этот заключается в изменениях структуры липидов клеточ-

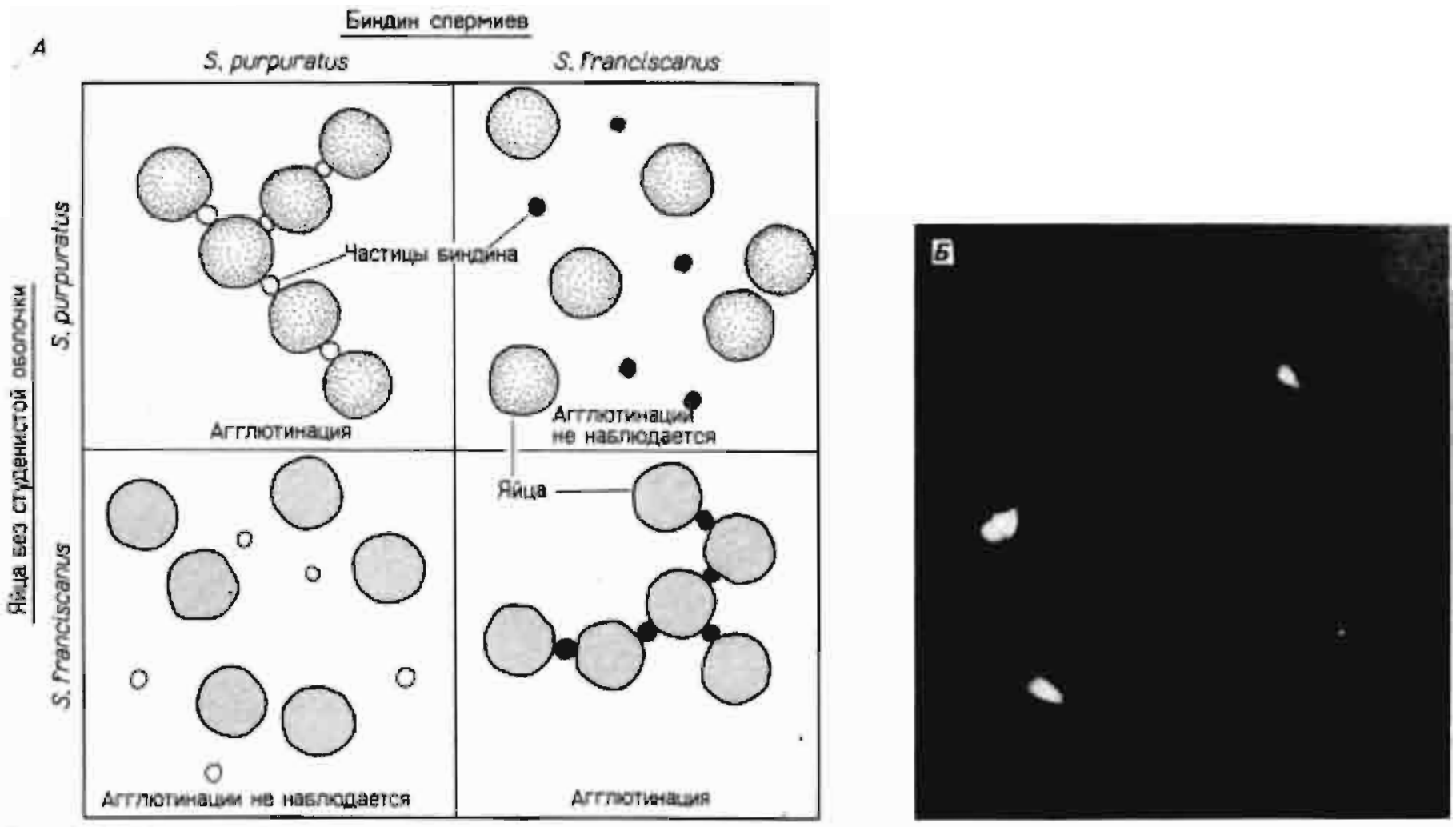


Рис. 2.14. Видоспецифическая агглютинация яиц, освобожденных от студенистой оболочки, при добавлении биндина. *А*. Агглютинацию вызывает добавление 213 мкг биндина в пластмассовую чашку, содержащую 0,25 мл 2%-ной (по объему) суспензии яиц. В течение 2—5 мин чашку осторожно покачивают и затем фотографируют (пояснительная схема сделана по фотографиям Glabe, Vacquier, 1977). *Б*. Микрофотография флуоресцирующих яиц *S. purpuratus*, соединенных друг с другом частицами биндина *S. purpuratus*, меченными флуоресцеином. В местах, где два яйца соприкасались, неизменно присутствовали частицы биндина. (Из Glabe, Lennarz, 1979; фотография с любезного разрешения авторов.)

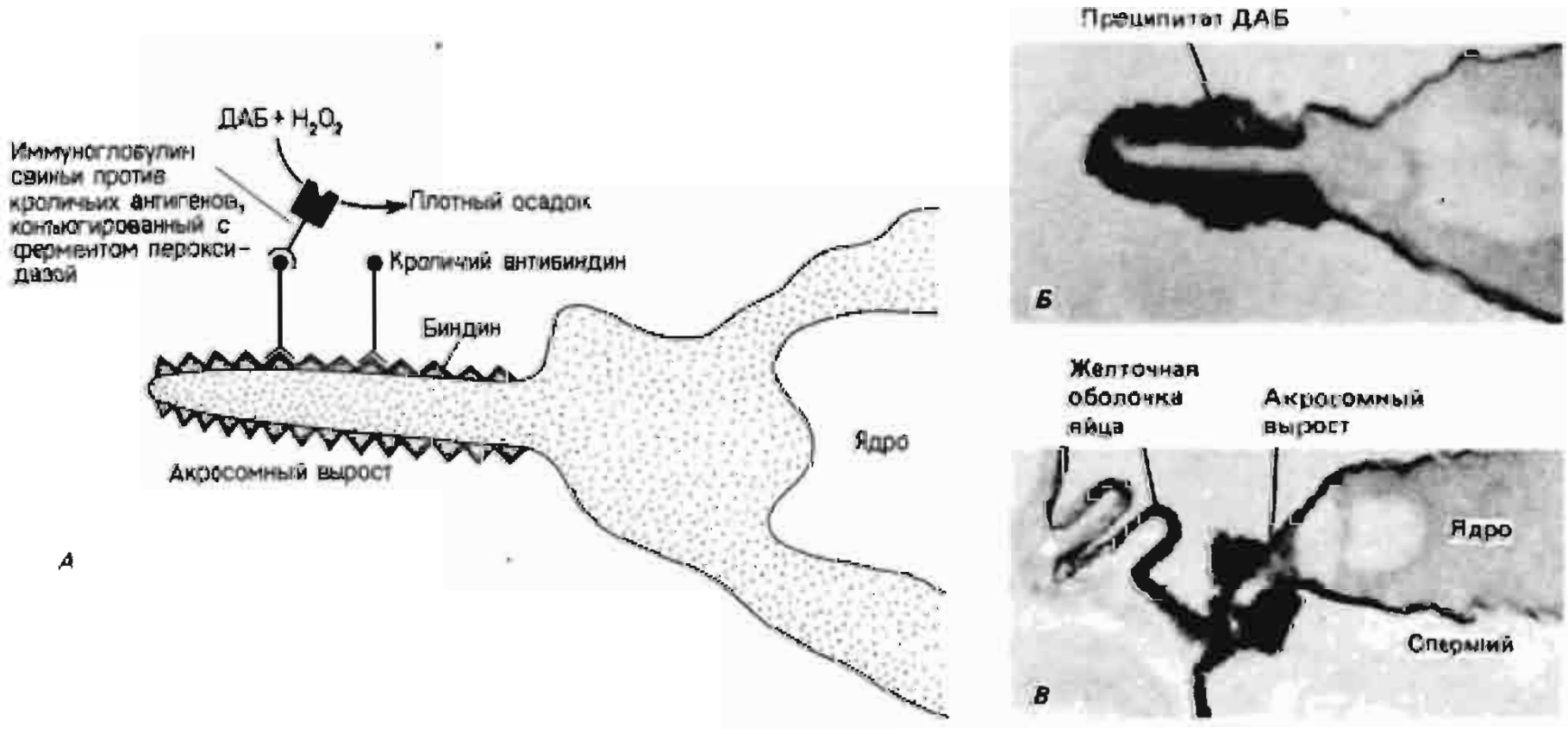


Рис. 2.15. Локализация биндина на акросомном выросте. *А*. Иммунохимический метод выявления локализации биндина. Кроличьи антитела взаимодействуют с обнажившимся биндином. Затем к этим антителам добавляют ковалентно связанные с молекулой пероксидазы антитела свиньи против кроличьих антител. Пероксидаза катализирует реакцию между диаминобензидином (ДАБ) и перекисью, в результате которой образуется электроноплотный осадок. Таким образом, этот осадок будет возникать только там, где имеется биндин. *Б*. Локализация биндина на акросомном выросте после акросомной реакции (× 133 200). *В*. Локализация биндина на акросомном выросте в месте соединения спермия с яйцом. (*Б* и *В* — из Moy, Vacquier, 1979; фотографии с любезного разрешения V. D. Vacquier.)

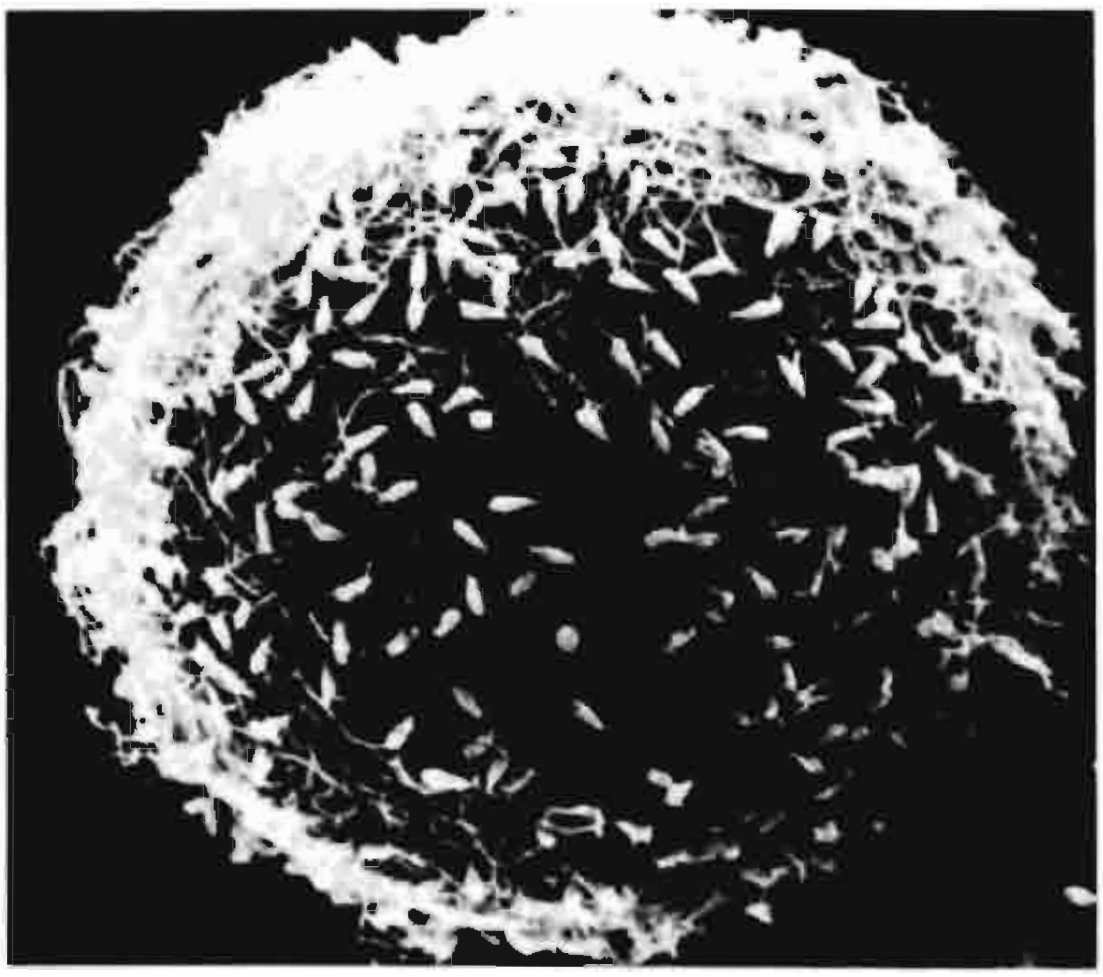


Рис. 2.16. Микрофотография спермиев морского ежа, прикрепившихся к желточной оболочке яйца, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Фотография с любезного разрешения C. Glabe, L. Perez, W. J. Lennatz.)

ной мембраны спермия. Это представление основывается на исследованиях (Davis et al., 1980), которые показывают, что соотношение холестерин : фосфолипиды в мембране спермия по мере капацитации снижается и что молекулы альбумина, имеющиеся в половых путях самки, способны отнимать холестерин у спермия. Продолжительность капацитации различна у разных видов и тесно коррелирует с временем, требующимся для изменения соотношения холестерин : фосфолипиды (Davis, 1981). Полагают, что снижение содержания холестерина дестабилизирует мембрану акросомного пузырька и что без таких изменений липидного состава слияние мембран, наблюдающееся при акросомной реакции, не может осуществиться. Вместе с тем при капацитации с поверхности спермия удаляются особые, связанные с ней вещества ("coating factors"), которые, оставаясь на поверхности, препятствуют оплодотворению (Yanagimachi, 1981).

Вопрос о том, как инициируется акросомная реакция у млекопитающих, остается спорным; местонахождение спермиев в момент ее инициации у разных видов может быть различным. Это различие, вероятно, сопряжено с разной способностью спермиев проникать через лучистый венец, окружающий яйцо. У некоторых видов акросомная реакция происходит, по-видимому, в то время, когда спермий находится на некотором расстоянии от яйца. Так, например, по имеющимся данным, у кролика акросомная реакция может быть индуцирована растворимыми веществами, выделяемыми яйцом (Bedford, 1968), тогда как у морской свинки она происходит в определенное время независимо от присутствия яиц (Yanagimachi, Usui, 1974). В этих случаях акросомная реакция приводит к выделению ферментов, лизирующих связи между клетками лучистого венца (Zaneveld, Williams, 1970; Williams, 1972). Выделенные ферменты, называемые **лизинами**, включают **гиалуронидазу**, расщепляющую гиалуроновую кислоту, которая составляет бо́льшую часть внеклеточного матрикса, и **фермент, рассеивающий клетки лучистого венца**, специфическим образом разрушая связи между ними. С помощью этих ферментов спермий проходит через лучистый венец и достигает прозрачной оболочки яйца.

У наиболее хорошо изученных млекопитающих — мыши и хомячка — акросомная реакция происходит *после* прикрепления спермия к прозрачной оболочке (Saling et al., 1979; Florman, Storey, 1982; Cherr et al., 1986). У этих животных спермии способны, по-видимому, проникать через лучистый венец, не выделяя больших количеств гиалуронидазы (Talbot at al., 1985).

Прозрачная оболочка яиц млекопитающих выполняет такую же роль, как и желточная оболочка у иглокожих. Прикрепление спермия к прозрачной оболочке лишь относительно, а не абсолютно видоспецифично (видовая специфичность при внутреннем оплодотворении — не столь важная проблема). Спермии мыши можно лишить способности прикрепляться к прозрачной оболочке яиц своего вида, если их предварительно инкубировать с гликопротеина-

ми этой оболочки. В этом опыте активным конкурентом яйца является гликопротеин с молекулярной массой 83 000 дальтон (ZP3), выделенный из прозрачной оболочки (Bleil, Wassarman, 1980, 1986; см. рис. 2.17). Таким образом, в прозрачной оболочке содержится особый гликопротеин, к которому прикрепляется спермий. После того как прикрепление произошло, тот же самый белок, как было показано, возбуждает акросомную реакцию. Это позволяет спермию мыши концентрировать свои протеолитические ферменты непосредственно в месте прикрепления к прозрачной оболочке.

Спермии всех млекопитающих содержат лизин, разрушающий прозрачную оболочку в месте прикрепления (Stambaugh, Buckley, 1960). Этот лизин, называемый **акрозином**, по аминокислотной последовательности очень сходен с трипсином, и чтобы начать работать, он, подобно трипсину, должен быть активирован. Было установлено (Wincek et al., 1979; Stambaugh, Mastroianni, 1980), что акрозин, находящийся в акросомном пузырьке, неактивен, но под воздействием гликопротеина из половых путей самки происходит его активация. Здесь мы опять убеждаемся в том, что половые пути самки являются не просто каналами для проведения спермы, но и активными участниками процесса оплодотворения.

Молекулярный механизм, с помощью которого прозрачная оболочка яйца и спермий млекопитающих узнают друг друга, полностью еще не изучен. Распространенная гипотеза, предложенная для объяснения механизма соединения гамет у млекопитающих, постулирует существование на поверхности спермия белка, способного узнавать видоспецифический углевод гликопротеина прозрачной оболочки (Wassarman, 1987). Показано (Florman et al., 1984; Florman, Wassarman, 1985), что у мыши важную роль в узнавании спермия прозрачной оболочкой играет углеводная группа на гликопротеине ZP3. После удаления этих углеводных групп ZP3 утрачивает способность конкурировать за прикрепление спермия (однако для инициации акросомной реакции, по-видимому, необходима вся молекула гликопротеина). В лаборатории Шура (Shur, Hall, 1982a,b; Lopez et al., 1985) с использованием другого подхода было показано, что рецепторы спермия для прозрачной оболочки представляют собой фермент на поверхности его головки, который узнает сахар N-ацетилглюкозамин (рис. 2.18*А*). Этот фермент (N-ацетилглюкозамин : галактозилтрансфераза) встроен в плазматическую мембрану спермия непосредственно над акросомой, причем его активный центр обращен наружу. Эта гликозилтрансфераза, вероятно, катализирует присоединение галактозы к углеводной цепи, оканчивающейся N-ацетилглюкозамином. Однако в половых путях самки отсутствуют активированные остатки галактозы. Поэтому, хотя фермент может присоединяться к N-ацетилглюкозаминовым остаткам белков zona pellucida (возможно, к ZP3, что, однако, еще не установлено) точно так же, как любой фермент соединяется с субстратом, он не может катализировать реакцию, поскольку второй ее участник отсутствует. В результате ферменты (на спермии) остаются связанными со своими субстратами (на яйце).

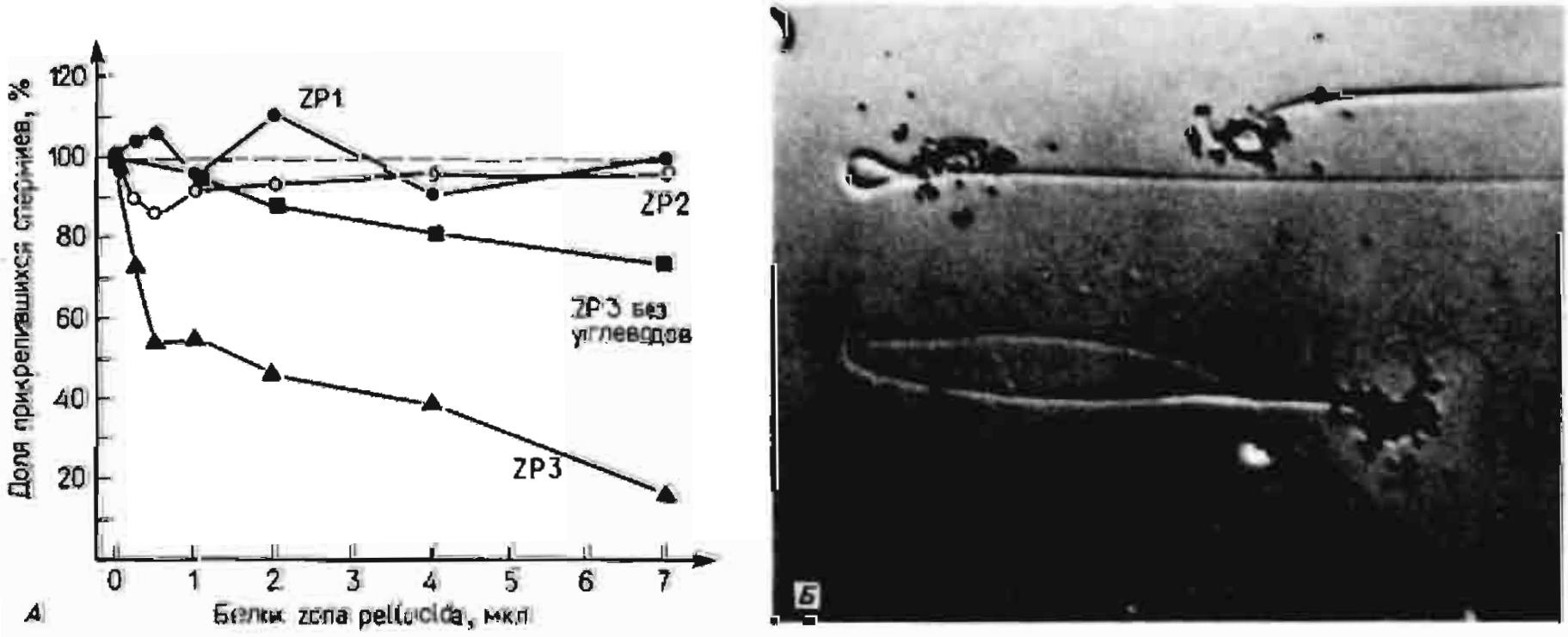


Рис. 2.17. Прикрепление спермия к прозрачной оболочке. *А*. Опыт, показывающий специфическое снижение доли спермиев, прикрепившихся к прозрачной оболочке, при инкубации оболочек и спермиев мыши с возрастающими количествами гликопротеина ZP3. Этот рисунок демонстрирует также значение углеводной части ZP3. *Б*. Прикрепление ZP3 с радиоактивной меткой к капацитированным спермиям мыши. (*А* — по Bleil, Wassarman, 1980; Florman, Wassarman, 1985; *Б* — из Bleil, Wassarman, 1986; с любезного разрешения авторов.)

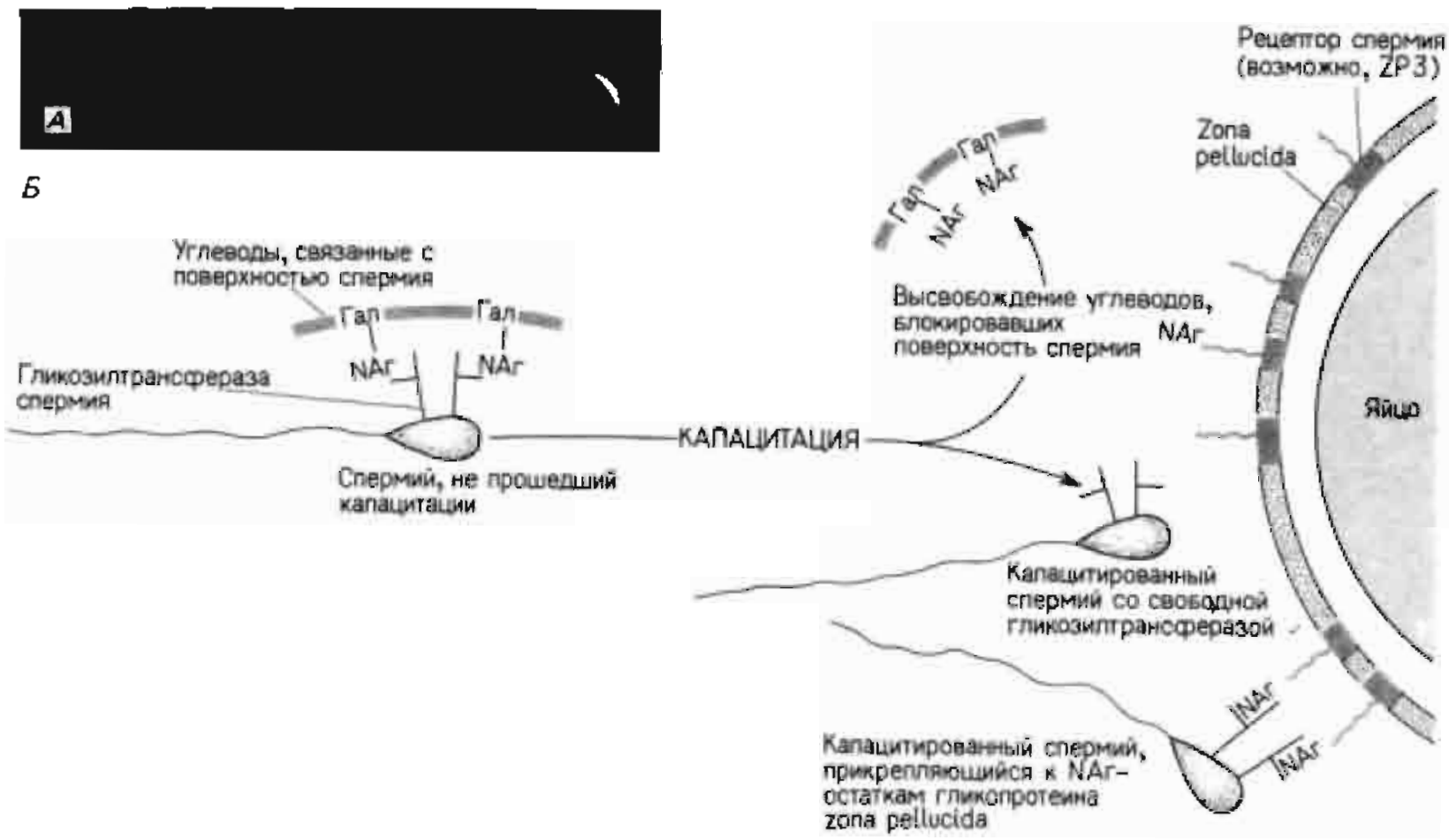


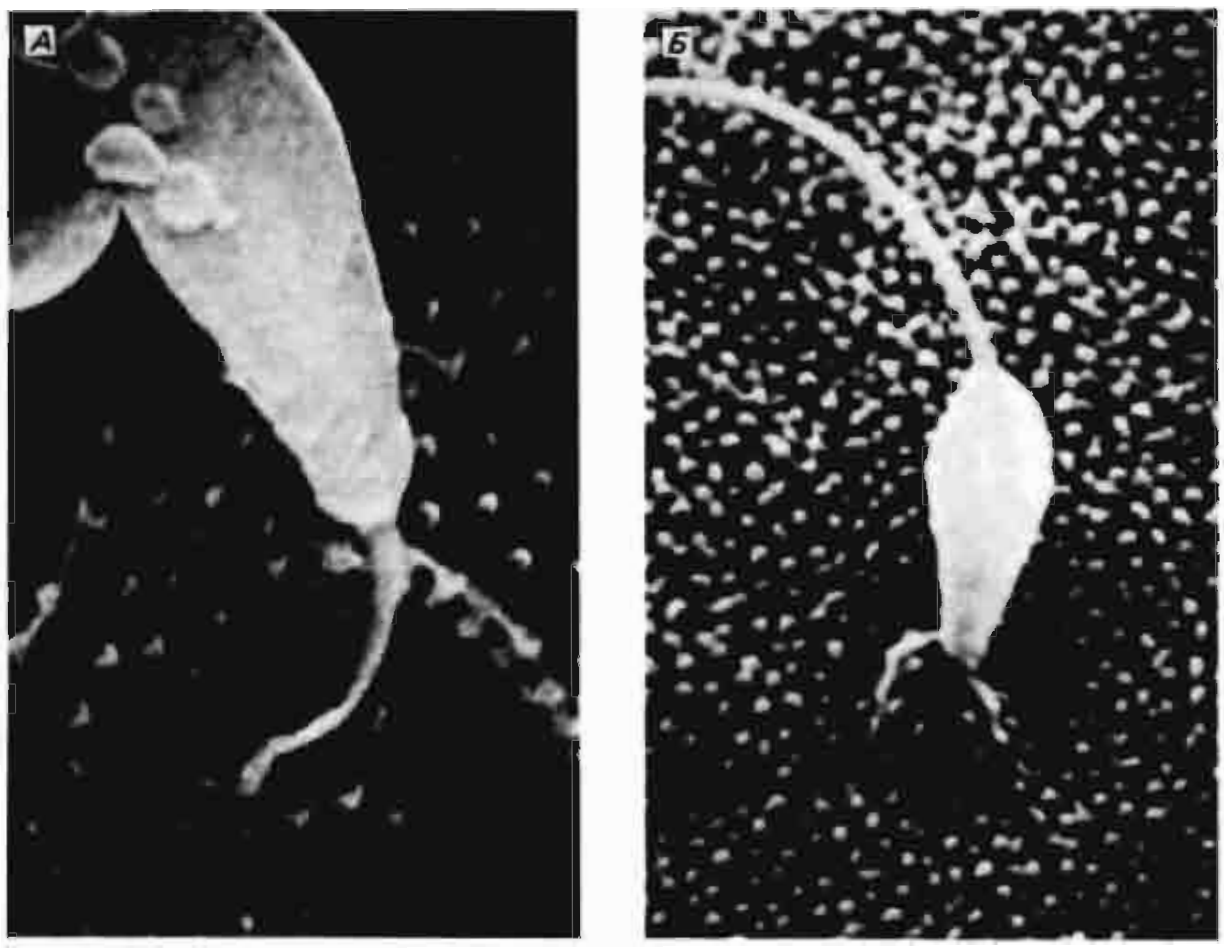
Рис. 2.18. Галактозилтрансфераза спермиев мыши. *А*. Флуоресцирующие антитела к галактозилтрансферазе спермиев мыши выявляют ее в плазматической мембране спермия над акросомой. *Б*. Модель узнавания спермием и яйцом друг друга. Поверхность спермия содержит фермент, галактозилтрансферазу, способную узнавать концевые остатки N-ацетилглюкозамина. В спермиях, не прошедших капацитации, активные центры этого фермента блокированы связанными с их поверхностью углеводами, включающими остатки N-ацетилглюкозамина (NAr) и галактозы (Гал). При капацитации эти углеводы отделяются от поверхности спермия, освобождая активные центры галактозилтрансфераз. Теперь галактозилтрансферазы могут узнавать N-ацетилглюкозаминовые остатки в молекуле гликопротеина ZP3 на поверхности прозрачной оболочки. Представленная модель объединяет результаты многих исследований. Однако идентичность галактозилтрансферазного рецептора с ZP3 до сих пор не доказана. (По Lopez et al., 1985; фотография с любезного разрешения B. Shur.)

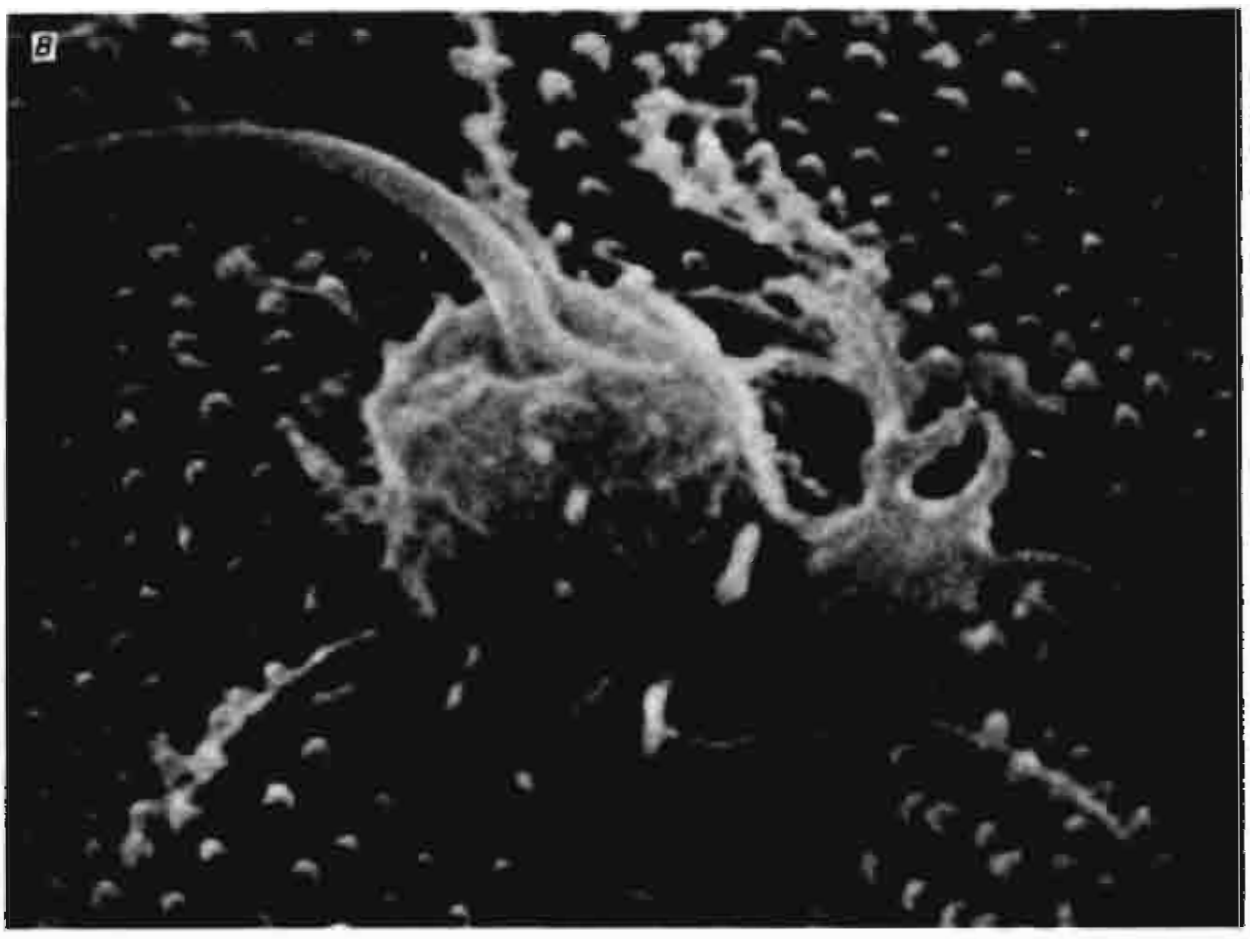
Если приведенная гипотеза справедлива, то прикрепление спермия можно предотвратить ингибированием фермента или добавлением второго участника реакции — активированной галактозы. Именно такой результат и был получен Шуром с сотрудниками: как при ингибировании гликозилтрансферазы (антителами), так и при завершении реакции (путем добавления УДФ-галактозы) спермий к яйцу не прикреплялся. Эти данные позволили связать обнажение гликозилтрансферазы на поверхности спермия с его капацитацией. Уже около десятка лет известно, что одно из проявлений капацитации — приобретение спермием способности узнавать прозрачную оболочку яйца. На поверхности спермия, не прошедшего капацитации, находятся углеводы ("coating factors"), которые препятствуют его прикреплению к яйцу. При капацитации эти углеводы удаляются, а когда их добавляют к капацитированным спермиям, то спермии утрачивают способность прикрепляться к яйцам. Углеводы, блокирующие прикрепление спермия, представляют собой, по-видимому, полимер из повторяющихся остатков галактозы и N-ацетилглюкозамина — именно тот тип молекулы, который способен связывать активный центр гликозилтрансферазы в головке спермия. Объединение накопленных данных позволяет создать модель, представленную на рис. 2.18.*Б*. Прозрачная оболочка выступает как носитель субстрата — остатков N-ацетилглюкозамина, а спермий — молекул гликозилтрансферазы, которые к этим остаткам прикрепляются. Капацитация обнажает гликозилтрансферазы на поверхности спермия, и их соединение с N-ацетилглюкозаминовыми остатками прозрачной оболочки по типу ключ—замок прикрепляет спермий к яйцу. Такая же гликозилтрансфераза была обнаружена в спермиях морской свинки и человека, но ее роль в соединении гамет у этих видов предстоит еще выяснить.

Слияние гамет и предотвращение полиспермии

Слияние плазматических мембран спермия и ооцита

Вслед за узнаванием спермия желточной (или прозрачной) оболочкой яйца происходит лизис ча-





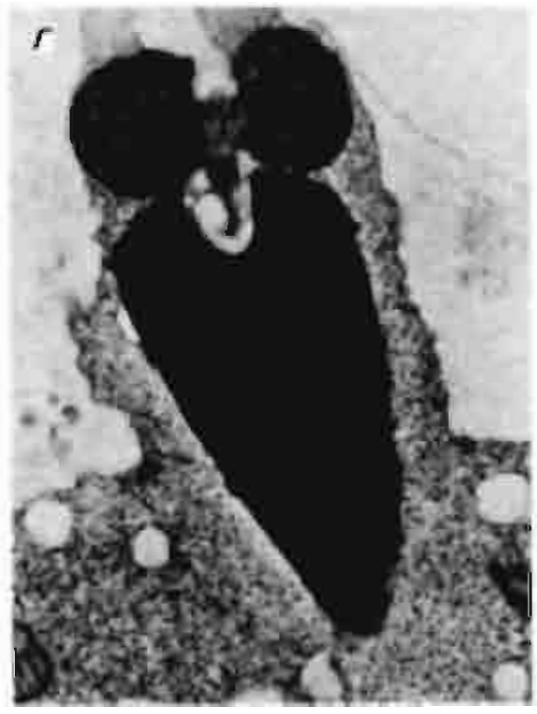


Рис. 2.19. Проникновение спермия в яйцо морского ежа. *А—В.* Микрофотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. *А.* Контакт головки спермия с микроворсинкой яйца, осуществляемый посредством акросомного выроста. *Б.* Образование воспринимающего бугорка по мере того, как микроворсинки выпячиваются и сливаются с погружающимся спермием. *В.* Спермий вовлекается в яйцо. *Г.* Микрофотография спермия, проникающего в яйцо через воспринимающий бугорок, полученная с помощью просвечивающего электронного микроскопа. (*А—В* — из Schatten, Mazia, 1976; фотографии с любезного разрешения: *А*, *Б* и *В* — G. Schatten, *Г* — F. J. Longo.)

сти этой оболочки в области головки спермия (Colwin, Colwin, 1960; Epel, 1980), в результате чего плазматические мембраны спермия и яйца сливаются.

Проникновение спермия в яйцо морского ежа представлено на рис. 2.19. Поверхность яйца покрыта небольшими выростами, называемыми **микроворсинками.** Контакт между спермием и яйцом вызывает, по-видимому, полимеризацию актина и увеличение размеров микроворсинок (Summers et al., 1975; Schatten, Schatten, 1980, 1983), которые формируют **воспринимающий бугорок.** Этот цитоплазматический бугорок имеет в среднем высоту 6,7 и ширину 2 мкм. Здесь снова проявляется гомология между яйцом и спермием, поскольку временно существующий воспринимающий бугорок, подобно акросомному выросту, возникает в результате полимериза-

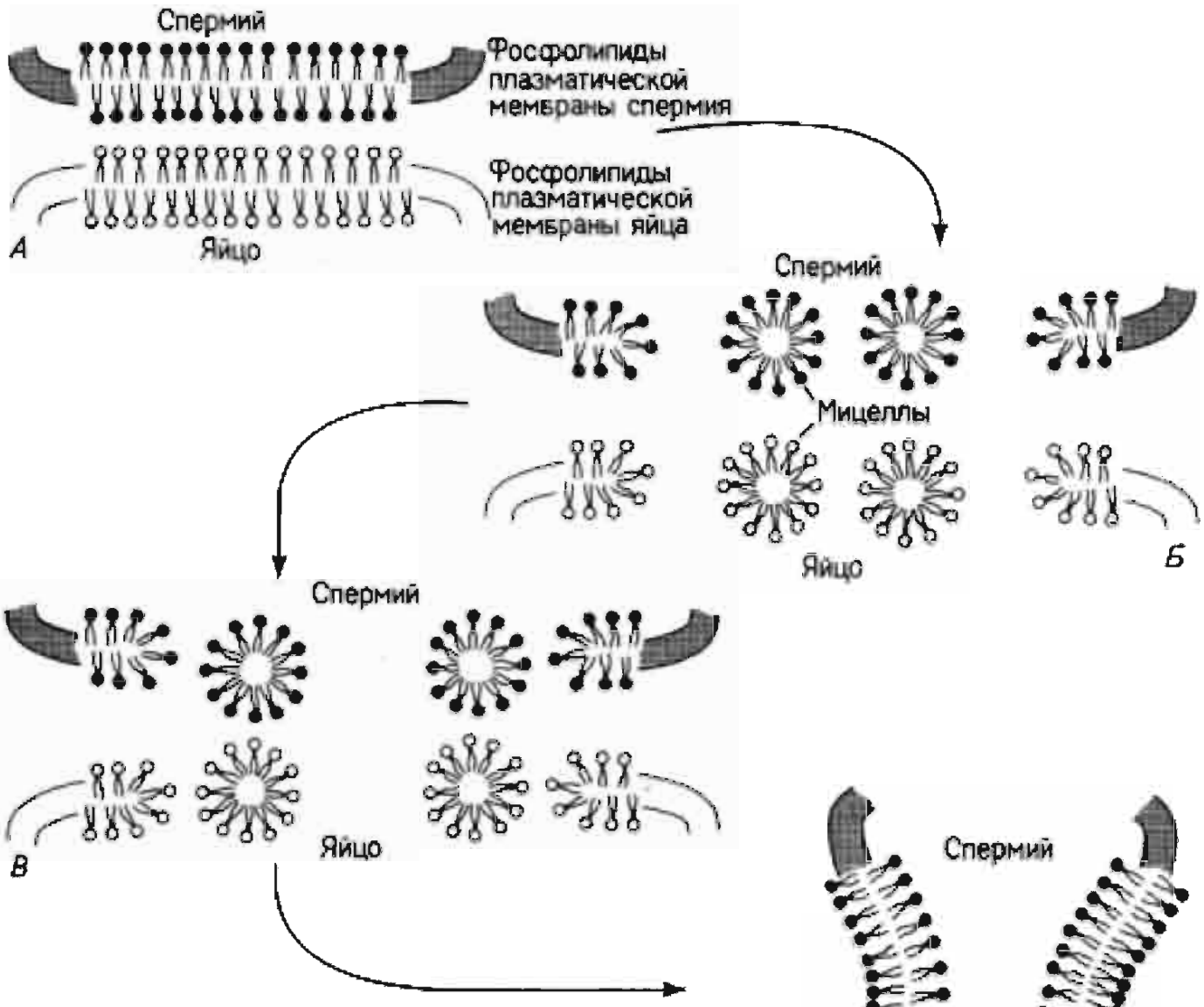


Рис. 2.20. Модель слияния плазматических мембран в месте контакта спермия с яйцом. В процессе оплодотворения слияние мембран происходит трижды: во время акросомной реакции, при контакте спермия с яйцом и во время кортикальной реакции. Во всех трех случаях события на молекулярном уровне, вероятно, одинаковы. *А*. Контактирующие плазматические мембраны образованы двумя слоями фосфолипидов, заряженные группы которых обращены наружу и внутрь клетки. Внутрь каждой мембраны обращены гидрофобные углеводородные цепи. *Б*. Слияние начинается, когда двойной слой липидов нарушается и образуются мицеллы (сферические агрегаты, у которых заряженные группы обращены наружу, а незаряженные гидрофобные цепи — внутрь). При перераспределении этих мицелл (*В*) плазматические мембраны восстанавливаются (*Г*), соединяя две ранее обособленные клетки.

ции актина. Мембраны спермия и яйца сливаются, и материал плазматической мембраны спермия может быть позднее обнаружен в мембране оплодотворенного яйца. Ядро спермия и его хвост проникают через цитоплазматический мостик, который расширяется благодаря полимеризации актина. Лонго (Longo, 1986) высказал предположение, что у морского ежа *Arbacia* мембранный материал для воспринимающего бугорка дают в основном окружающие микроворсинки (которые при этом укорачиваются). Следует отметить, однако, что не все компоненты плазматической мембраны спермия могут входить в состав мембраны оплодотворенного яйца. Часть материала мембраны спермия остается в месте его прикрепления, но не обязательно в составе плазматической мембраны. Была предложена гипотеза (Manes, Barbieri, 1976, 1977), согласно которой локализация компонентов спермия в ограниченной области приводит к возникновению в клетке асимметрии, которая задает определенную направленность плоскости первого деления дробления и движениям компонентов цитоплазмы в яйце.

У морских ежей все области яйца способны к восприятию спермия. У некоторых амфибий и многих беспозвоночных узнавание спермия и слияние с ним происходят лишь в специализированных областях плазматической мембраны яйца (Vacquier, 1979). О механизме слияния гамет известно довольно мало, однако было показано (Hirao, Yanagimachi, 1978), что важную роль в этом процессе играют фосфолипиды плазматической мембраны. Эти данные согласуются с представленной на рис. 2.20 моделью,

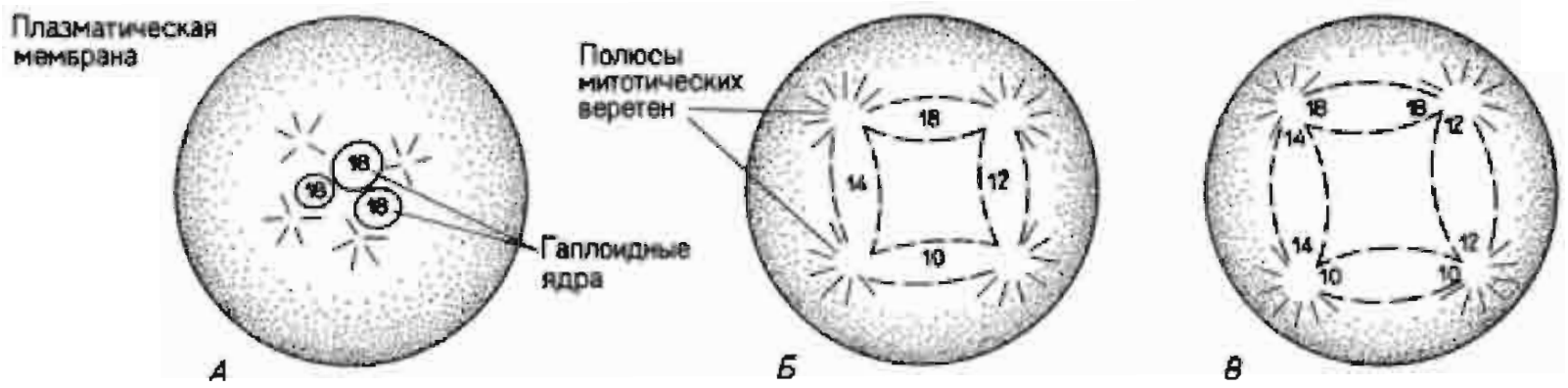


Рис. 2.21. Атипичное развитие диспермного яйца морского ежа. *А*. Слияние трех гаплоидных ядер, каждое из которых содержит 18 хромосом, и разделение двух центриолей спермия с образованием четырех митотических полюсов. *Б*. 54 хромосомы группируются случайным образом на четырех веретенах. *В*. В анафазе первого деления дробления удвоившиеся хромосомы расходятся к четырем полюсам. *Г*. Обособляются четыре дочерние клетки, которые содержат разное число и разные типы хромосом, что приводит к ранней гибели зародыша (*Д*). (По Boveri, 1907.)

иллюстрирующей особую роль липидных молекул в слиянии плазматических мембран гамет.

Слияние представляет собой активный процесс, часто опосредованный специфическими «фузогенными» (fusogenic) белками. Известно, что такие белки, как HA-белок вируса гриппа и F-белок вируса Сендай, способствуют слиянию клеток; не исключено, что биндин относится к белкам именно такого типа. Сравнительно недавно было обнаружено (Glabe, 1985), что биндин морского ежа вызывает слияние фосфолипидных пузырьков между собой и что, подобно вирусным фузогенным белкам, биндин содержит около своего N-конца протяженный участок гидрофобных аминокислот. У брюхоногого моллюска *Haliotis* лизин, растворяющий желточную оболочку, также обладает фузогенной активностью (Hong, Vacquier, 1986), а в головке спермиев морской свинки содержится белок, играющий важную роль в слиянии спермия и яйца у этого вида (Primakoff et al., 1987). Таким образом, один из белков головки спермия, по-видимому, стимулирует слияние плазматических мембран спермия и яйца.

Предотвращение полиспермии

Способность плазматической мембраны яйца к слиянию необходима для его соединения со спермием, однако, как только это слияние произойдет, такая способность становится опасным свойством. У морских ежей, как и у большинства изученных животных, каждый проникающий в яйцо спермий снабжает его гаплоидным ядром и центриолью. При нормальном **моноспермном оплодотворении**, когда в яйцо проникает только один спермий, гаплоидные ядра спермия и яйца соединяются, образуя диплоидное ядро оплодотворенного яйца (**зиготы**); при этом восстанавливается присущее данному виду число хромосом. Внесенная спермием центриоль делится и образует два полюса митотического веретена дробления.

Проникновение множества спермиев — **полиспермия** — у большинства животных приводит к гибельным последствиям. У морских ежей при оплодотворении двумя спермиями возникает триплоидное ядро, в котором каждая хромосома представлена не двумя, а тремя копиями. Такое оплодотворение приводит к вредным последствиям в особенности потому, что вместо нормального процесса — разделения хромосом с помощью биполярного веретена между двумя дочерними клетками — происходит распределение триплоидного набора между четырьмя клетками. А поскольку не существует механизма, который обеспечил бы получение каждой из четырех дочерних клеток нормального числа и всех необходимых типов хромосом, последние распределяются неравномерно: одни клетки получают лишние копии некоторых хромосом, тогда как у других эти хромосомы отсутствуют (рис. 2.21). Теодор

Бовери в 1902 г. показал, что такие клетки либо погибают, либо развиваются атипично.

В процессе эволюции животные выработали разные способы, позволяющие избежать объединения более чем двух гаплоидных ядер. Самый обычный способ заключается в том, чтобы предотвратить проникновение в яйцо более чем одного спермия. В яйце морского ежа имеются два механизма защиты от полиспермии: быстрая реакция, которая осуществляется путем электрических изменений в плазматической мембране, и более медленная реакция, вызванная экзоцитозом кортикальных гранул.

БЫСТРЫЙ БЛОК ПОЛИСПЕРМИИ. Для оплодотворения необходимо, чтобы плазматическая мембрана яйца обладала способностью сливаться с мембраной спермия, однако она должна утрачивать эту способность сразу же после того, как первый спермий вступит с ней в контакт (Just, 1919). Быстрый блок полиспермии достигает этой цели путем изменения электрического потенциала плазматической мембраны яйца.

Клеточная мембрана представляет собой своего рода барьер между цитоплазмой яйца и внешней средой, обладающий свойством избирательности, и концентрация ионов по обе стороны плазматической мембраны сильно различается. Это различие особенно значительно для ионов натрия (Na^+) и калия (K^+). В морской воде концентрация ионов натрия очень велика, тогда как в цитоплазме яйца свободных ионов натрия почти нет. Для ионов калия соотношение обратное. Такое состояние поддерживается плазматической мембраной, которая устойчиво препятствует проникновению натрия в ооцит и утечке ионов калия в окружающую среду. Если один электрод ввести в яйцо, а второй электрод поместить вне его, то можно измерить постоянную разность потенциалов по обе стороны плазматической мембраны. Этот **мембранный потенциал покоя**, как правило, имеет величину, равную примерно 70 милливольт, что обычно выражают как -70 мВ, поскольку содержимое клетки отрицательно заряжено по отношению к внешней среде.

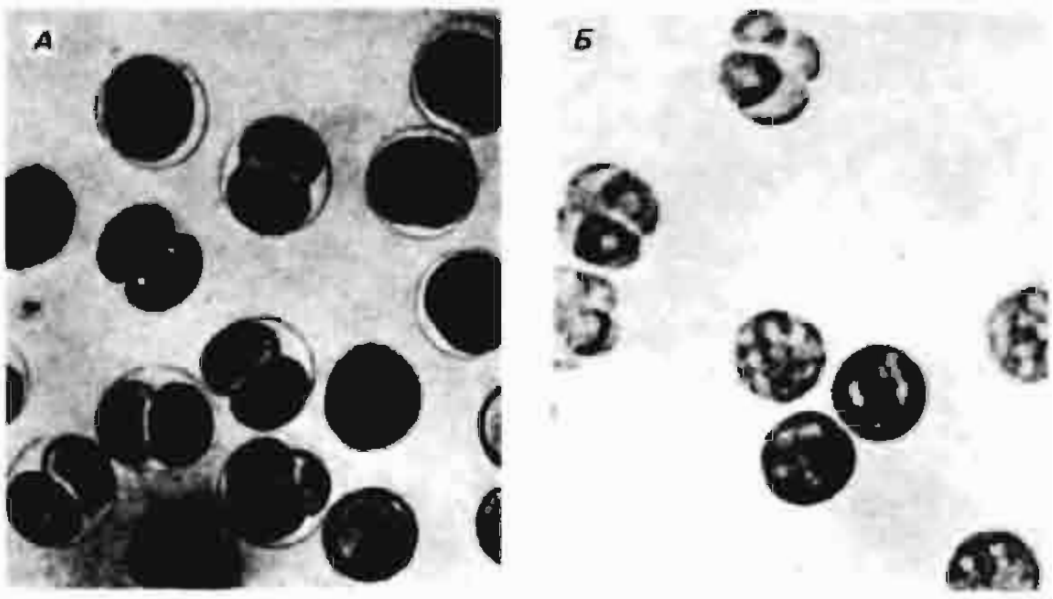
В течение одной десятой секунды после прикрепления первого спермия мембрана деполяризуется и мембранный потенциал достигает положительного уровня. Это результат поступления в яйцо небольшого количества ионов натрия, которое доводит разность потенциалов до 0 или даже $+20$ мВ (рис. 2.22). Спермии способны сливаться с мембранами, обладающими потенциалом покоя -70 мВ, но неспособны сливаться с мембранами, потенциал которых имеет менее отрицательное значение, чем -10 мВ. Неизвестно, каким образом прикрепление или проникновение спермия дает сигнал к открыванию натриевых каналов, однако недавно были получены данные (Gould, Stephano, 1987), которые могут дать ключ к пониманию этого процесса: из спермиев *Urechis* был выделен акросомный белок, способный открывать натриевые каналы в неоплодотворенном яйце *Urechis*. Более того, когда яйца подвергали воздействию этого белка, скорость поступления натрия и возникавшее в результате его поступления смещение мембранного потенциала были сходны с аналогичными изменениями, вызываемыми живыми спермиями. Открывание натриевых каналов в яйце индуцируется, по-видимому, *прикреплением* к нему спермия. При изучении оплодотворения у морского ежа *Lytechinus* с точной регистрацией времени наступления разных процессов было установлено, что натрий поступает в яйцо до слияния плазматических мембран гамет (Longo et al., 1986; Hinkley et al., 1986).



Рис. 2.22. Мембранный потенциал в яйце морского ежа до и после оплодотворения. До добавления спермы разность потенциалов по обе стороны плазматической мембраны составляла около -70 мВ (содержимое клетки имеет больший отрицательный заряд, чем ее окружение). Когда спермий соединяется с яйцом, за 0,1 с потенциал сдвигается в направлении положительных величин. (По Jaffe, 1980.)

Джеф (Jaffe, 1976) и ее сотрудники обнаружили, что можно индуцировать полиспермию путем искусственной фиксации потенциала на уровне -70 мВ и можно, наоборот, предотвратить оплодотворение, искусственно поддерживая потенциал на положительном уровне. Быстрый блок полиспермии можно также предотвратить, снижая концентрацию ионов натрия в воде (рис. 2.23). Если содержание ионов натрия недостаточно для того, чтобы вызвать смещение мембранного потенциала до положительных значений, то наблюдается полиспермия (Gould-Somero et al., 1979; Jaffe, 1980). Электрический блок полиспермии существует также у лягушки (Cross, Elinson, 1980), но его, по-видимому, нет у млекопитающих (Jaffe, Cross, 1983).

МЕДЛЕННЫЙ БЛОК ПОЛИСПЕРМИИ. Яйца морских ежей (и многих других животных) обладают еще одним механизмом для обеспечения моноспермности оплодотворения. Быстрый блок полиспермии действует недолго — мембранный потенциал в яйце морского ежа остается положительным только около одной минуты. Это кратковременное смещение потенциала может быть недостаточным для предотвращения полиспермии; было показано (Carroll, Epel, 1975), что если спермии, прикрепившиеся к жел-



В

[Na], мМ	Доля полиспермных яиц, %
50	100
120	97
360	26
490	22

Рис. 2.23. Полиспермия у морского ежа *L. pictus*, возникшая в результате оплодотворения в морской воде с низким содержанием натрия. *А*. Контрольные яйца, развивающиеся при концентрации Na^+, равной 490 мМ. *Б*. Полиспермия у яиц, оплодотворенных при концентрации Na^+, равной 120 мМ (натрий был замещен холином). Яйца сфотографированы на стадии первого деления дробления. *В*. Таблица, показывающая увеличение процента полиспермии при снижении концентрации ионов натрия. (Из Jaffe, 1980; фотографии любезно предоставлены L. A. Jaffe.)

точной оболочке, не будут удалены, то они могут еще проникнуть в цитоплазму. Удаление прикрепившихся сверхчисленных спермиев осуществляется посредством **кортикальной реакции**, более медленного механического блока полиспермии, который начинает действовать примерно через 1 мин после прикрепления спермия к яйцу.

В яйце морского ежа непосредственно под плазматической мембраной располагается 15 000 гранул диаметром около 1 мкм (рис. 2.6,*Б*). После осуществления контакта спермия с яйцом эти кортикальные гранулы сливаются с плазматической мембраной и выделяют свое содержимое в область между плазматической мембраной и желточной оболочкой. Белки, которые связывали желточную оболочку с поверхностью яйца, растворяются высвободившимися протеолитическими ферментами, а выделенные мукополисахариды создают осмотический градиент, который привлекает воду в пространство между плазматической мембраной и желточной оболочкой. В результате желточная оболочка отделяется от поверхности яйца; с этого момента ее называют **оболочкой оплодотворения**. Существенно, что в процессе кортикальной реакции желточная оболочка претерпевает важные изменения. Во-первых, воздействие протеаз приводит к изменению свойств биндиновых рецепторов или к их отделению вместе с прикрепленными к ним спермиями (Vacquier et al., 1973; Glabe, Vacquier, 1978). Во-вторых, пероксидаза вызывает затвердевание оболочки путем образования поперечных связей между остатками тирозина соседствующих белков (Foerder, Shapiro, 1977). Как видно из рис. 2.24, образование оболочки оплодотворения начинается в месте проникновения спермия и отсюда распространяется по всей поверхности яйца. По мере формирования этой оболочки спермии отделяются от яйца. Этот процесс начинается спустя примерно 20 с после прикрепления оплодотворяющего спермия и завершается к концу первой минуты после этого. Одновременно происходит выделение **гиалина** — белка, запасенного в кортикальных гранулах (Hylander, Summers, 1982), — который образует сплошной слой вокруг яйца. Плазматическая мембрана слипается с этим белком, и гиалиновый слой поддерживает бластомеры в период дробления.

У млекопитающих кортикальная реакция не вызывает образования оболочки оплодотворения, но тем не менее результат ее оказывается таким же, как у морских ежей: выделенные ферменты так изменяют рецепторы спермиев прозрачной оболочки, что они больше не удерживают спермии (Bleil, Wassarman, 1980). Этот процесс изменения свойств рецепторов спермиев носит название **реакции прозрачной оболочки** (**реакции zona pellucida** или, коротко, **реакции зоны** — zona reaction). Было высказано предположение (Florman, Wassarman, 1985), что кортикальные гранулы в яйцах мыши содержат фермент, который отщепляет концевые остатки сахара на ZP3, тем самым отделяя прикрепившиеся к прозрачной оболочке спермии и предотвращая прикрепление к ней новых спермиев.

Механизм кортикальной реакции сходен с механизмом акросомной реакции. В результате увеличения в процессе активации концентрации свободных ионов кальция в клетке мембраны кортикальных гранул сливаются с плазматической мембраной яйца, тем самым вызывая экзоцитоз их содержимого (рис. 2.25). Вслед за слиянием кортикальных гранул с мембраной вокруг места проникновения спермия

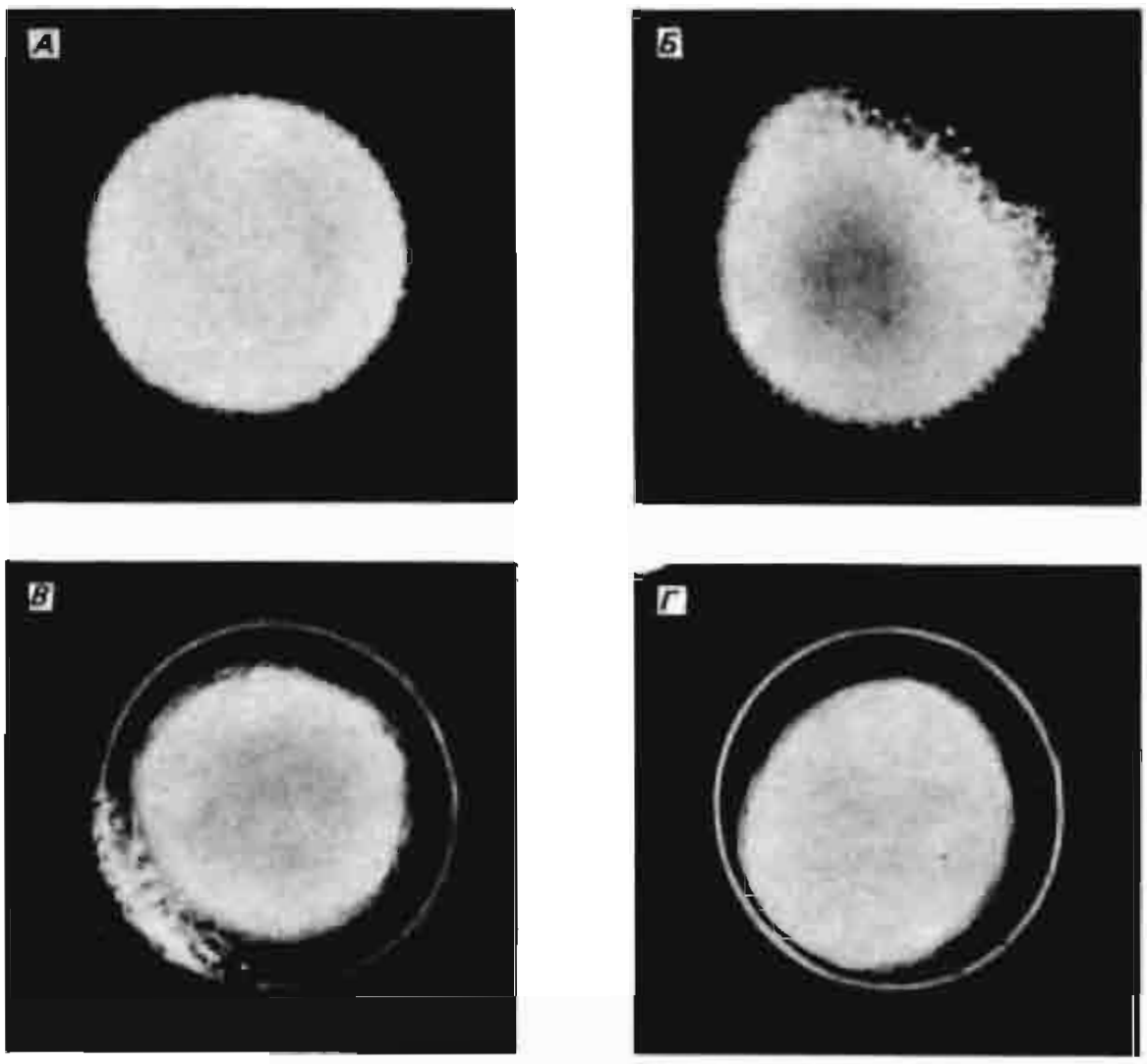


Рис. 2.24. Образование оболочки оплодотворения и удаление избыточных спермиев. Суспензию яиц морского ежа, к которой была добавлена сперма, фиксировали формальдегидом, чтобы исключить дальнейшее взаимодействие между гаметами. *А*. Через 10 с после добавления спермы. Видны спермии, окружающие яйцо. *Б, В*. Через 25 и 35 с после осеменения; вокруг яйца, начиная с места проникновения спермия, образуется оболочка оплодотворения. *Г*. Образование оболочки оплодотворения завершено, избыточные спермии удалены. (Из Vacquier, Payne, 1973; фотографии с любезного разрешения V. D. Vacquier.)

возникает волна экзоцитоза их содержимого, распространяющаяся по кортексу и завершающаяся на противоположной стороне яйца.

Нарастание концентрации свободных ионов кальция может быть визуализировано с помощью красителя экворина. Экворин — это белок, который выделяют из люминесцирующих медуз; при соединении со свободными ионами кальция он испускает свет. Этот белок инъецируют в яйца и затем оплодотворяют их. На рис. 2.26 продемонстрирована поразительная картина волны высвобождения кальция, которая распространяется по яйцу. Возникнув в месте проникновения спермия, светящаяся полоса смещается по поверхности и охватывает все яйцо (Gilkey et al., 1978; Steinhardt et al., 1977). Процесс высвобождения и связывания ионов кальция завершается за 1—2 мин; свободные ионы связываются почти сразу же, как только они высвобождаются.

В целом ряде экспериментов было показано, что ионы кальция непосредственно отвечают за распространение кортикальной реакции и что они запасаются в самом яйце. Первые данные, свидетельствующие об этом, были получены в 1974 г., когда неоплодотворенные яйца обработали ионофором A23187. Это соединение переносит ионы кальция через мембраны и позволяет им проникать через барьеры, непреодолимые иным путем. Помещение яиц морского ежа в морскую воду, содержащую A23187, вызывает кортикальную реакцию и отделение оболочки оплодотворения. Более того, эта реакция может происходить при полном отсутствии ионов кальция в морской воде. Следовательно, A23187 вызывает высвобождение ионов кальция, уже присутствующих в связанном состоянии в органеллах яйца (Charnbers et al., 1974; Steinhardt, Epel, 1974). Данные, полученные позднее (Fulton, Whittingham, 1978; Hollinger, Schuetz, 1976), показали, что ионы кальция, инъецированные в яйца морского ежа, мыши, лягушки, инициируют кортикальную реакцию и что прокаин — анестетик, препятствующий высвобождению связанного кальция, — подавляет кортикальную реакцию в яйце морского ежа.

Внутриклеточные запасы ионов кальция, вероятно, сосредоточены в эндоплазматическом ретикулуме яйца. В яйцах морских ежей и лягушек, у которых происходит кортикальная реакция, в клетке имеется развитый эндоплазматический ретикулум, окружающий кортикальные гранулы (Gardiner, Grey, 1983; Luttmer, Longo, 1985; рис. 2.27). У двухстворчатого моллюска *Spisula*, у которого кортикальной реакции не наблюдается (и у которого для активации яйца используется кальций наружной среды), в кортикальном слое яиц эндоплазматический ретикулум развит слабо. При центрифугировании яиц морского ежа были получены результаты, свидетельствующие о том, что источником ионов кальция является область, содержащая элементы эндоплаз-

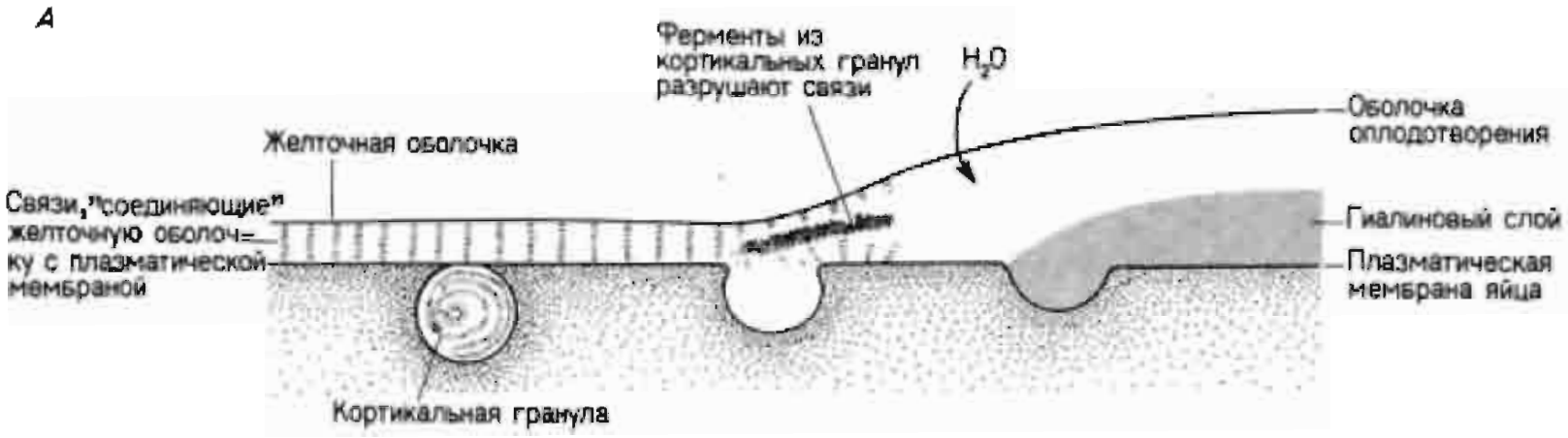


Рис. 2.25. Экзоцитоз кортикальных гранул. *А*. Схематический рисунок, иллюстрирующий последовательность событий при образовании оболочки оплодотворения и гиалинового слоя. При экзоцитозе кортикальных гранул из них высвобождаются пептидазы, которые разрушают связи между желточной оболочкой и плазматической мембраной. Содержавшиеся в кортикальных гранулах мукополисахариды создают осмотический градиент, обусловливающий поступление воды в пространство между желточной оболочкой и плазматической мембраной. Другие ферменты, высвобождающиеся из кортикальных гранул, вызывают затвердевание оболочки оплодотворения и отделение прикрепившихся к ней спермиев. *Б*, *В*. Микрофотографии кортикального слоя неоплодотворенного яйца морского ежа, полученные с помощью просвечивающего (*Б*) и сканирующего (*В*) электронного микроскопа. *Г*, *Д*. Микрофотографии той же области яйца вскоре после оплодотворения, на которых видны отделение оболочки оплодотворения и места, в которых кортикальные гранулы сливались с плазматической мембраной яйца (стрелки на рис. *Г*). Микрофотографии получены с помощью просвечивающего (*Г*) и сканирующего (*Д*) электронного микроскопа. (*А* — по Austin, 1965; *Б*, *В*, *Г* и *Д* — из Chandler, Heuser, 1979; фотографии с любезного разрешения D.E. Chandler.)

матического ретикулума (Eisen, Reynolds, 1985). У *Xenopus* в период созревания яиц объем эндоплазматического ретикулума в кортикальном слое увеличивается в 10 раз; исчезает он из кортикального слоя за одну минуту после того, как волна экзоцитоза кортикальных гранул пройдет через данную область. Эндоплазматический ретикулум кортекса, накапливающий кальций, сравнивают (Jaffe, 1983) с саркоплазматическим ретикулумом скелетных и сердечной мышц. Возникнув, процесс высвобождения кальция распространяется самопроизвольно. Свободный кальций способен вызвать выход связанного каль-

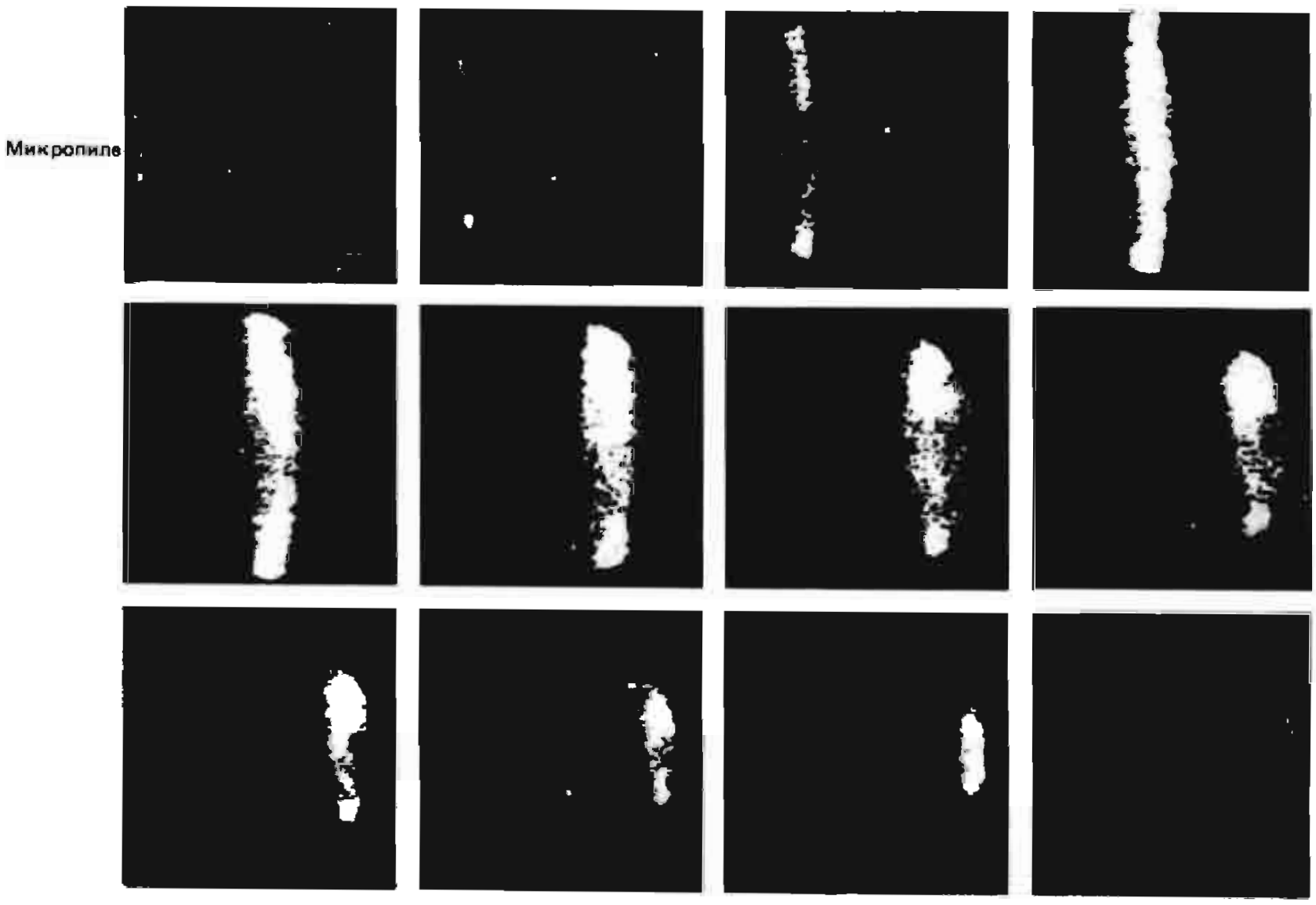


Рис. 2.26. Распространение волны свободных ионов кальция в яйце рыбы медаки. Яйцо, в которое инъецировали экворин, было ориентировано таким образом, что микропиле (место проникновения спермия) оказалось обращенным влево. Фотографии, полученные через 10-секундные интервалы, демонстрируют выход кальция из внутриклеточных депо в последовательно расположенных областях яйца. На последнем кадре представлено положение фронтов 11 волн. (Из Gilkey et al., 1978; фотографии с любезного разрешения L. F. Jaffe.)

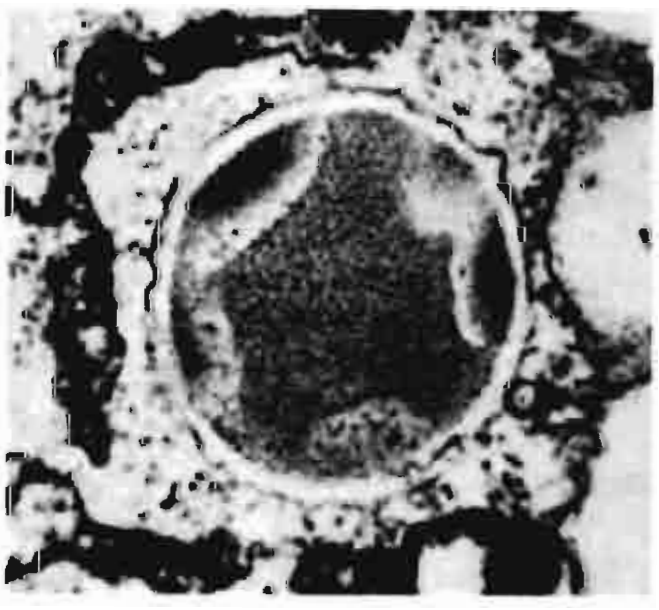


Рис. 2.27. Эндоплазматический ретикулум, окружающий кортикальную гранулу в яйце *Arbacia*. Эндоплазматический ретикулум был окрашен осмием-йодидом цинка, чтобы его можно было визуализировать с помощью просвечивающего электронного микроскопа. (Из Luttmer, Longo, 1985; фотография с любезного разрешения S. Luttmer.)

ция из мест, где он аккумулировался, создавая при этом волну высвобождения ионов кальция и экзоцитоз кортикальных гранул.

В природе существуют разные варианты стратегии защиты от полиспермии. У млекопитающих частота полиспермии бывает минимальной благодаря малому числу сперматозоидов, достигающих места, где происходит оплодотворение (Braden, Austin, 1954). У хомячка плазматическая мембрана яйца способна сливаться со сперматозоидом даже на 4-клеточной стадии (Usui, Yanagimachi, 1976). Блок полиспермии у хомячков и мышей достигается, по-видимому, отделением рецепторов сперматозоидов, находящихся на прозрачной оболочке (Miyazaki, Igusa, 1981; Jaffe et al., 1983). У кроликов же блок полиспермии осуществляется исключительно на уровне плазматической мембраны, и нет сомнений, что этот блок весьма эффективен. Наконец, у некоторых животных имеются механизмы защиты от полиспермии, о которых мы знаем очень мало. Так, в случае богатых желтком яиц некоторых птиц, рептилий и хвостатых ам-

фибий в цитоплазму проникает по нескольку спермиев. Все спермии, за исключением одного, разрушаются после того, как женский пронуклеус сольется с одним мужским пронуклеусом (Elinson, 1986); факторы, вызывающие их разрушение, неизвестны. Каков бы ни был механизм элиминации сверхчисленных спермиев у этих животных, благодаря ему только одно гаплоидное сперматическое ядро получает возможность слиться с гаплоидным ядром яйца.

Слияние генетического материала

У морских ежей головка спермия проникает в яйцо перпендикулярно его поверхности. После слияния плазматических мембран спермия и яйца сперматическое ядро и центриоль отделяются от митохондрий и жгутика. Митохондрии и жгутик спермия разрушаются в цитоплазме яйца, и поэтому в дальнейшем их не удается обнаружить у развивающихся и взрослых организмов (Dawid, Blackler, 1972; Giles et al., 1980). Таким образом, митохондрии передаются зародышу только матерью.

Ядро яйца после завершения второго деления созревания и приобретения им пузыревидной формы называют **женским пронуклеусом**. Сперматическое ядро в цитоплазме яйца деконденсируется и преобразуется в **мужской пронуклеус**. Ядерная оболочка сперматического ядра распадается на мелкие пузырьки, что делает возможным воздействие цитоплазмы яйца на компактный хроматин спермия. Белки, благодаря которым хроматин спермия сохраняет конденсированное неактивное состояние, заменяются на белки сходного типа яйцевого происхождения. Эта замена приводит к деконденсации хроматина спермия (Green, Poccia, 1985). Хроматиновая масса удерживает остатки исходной оболочки сперматического ядра на своей поверхности. Вскоре по периферии этой массы выстраиваются новые мембранные пузырьки, которые соединяются с участками прежней оболочки и образуют новую оболочку мужского пронуклеуса.

После проникновения спермия в цитоплазму яйца мужской пронуклеус совершает поворот на 180°, так что центриоль спермия оказывается расположенной между мужским и женским пронуклеусами. Микротрубочки, отходящие от центриоли спермия, удлиняются и приходят в контакт с женским пронуклеусом, после чего оба пронуклеуса перемещаются навстречу друг другу (Hamaguchi, Hiramoto, 1980; Bestor, Schatten, 1981). У морского ежа в результате слияния пронуклеусов возникает диплоидное **ядро зиготы** (рис. 2.28). Синтез ДНК инициируется либо на стадии пронуклеусов (в период их миграции), либо после образования ядра зиготы.

У млекопитающих процесс сближения пронуклеусов (рис. 2.29; 2.30) продолжается около 12 ч в отличие от морского ежа, у которого он длится 1 ч. Головка спермия у млекопитающих проникает не перпендикулярно поверхности яйца, а почти по касательной к ней, сливаясь при этом с многочисленными микроворсинками. При деконденсации хроматина сперматического ядра его оболочка также разрушается и затем воссоз-

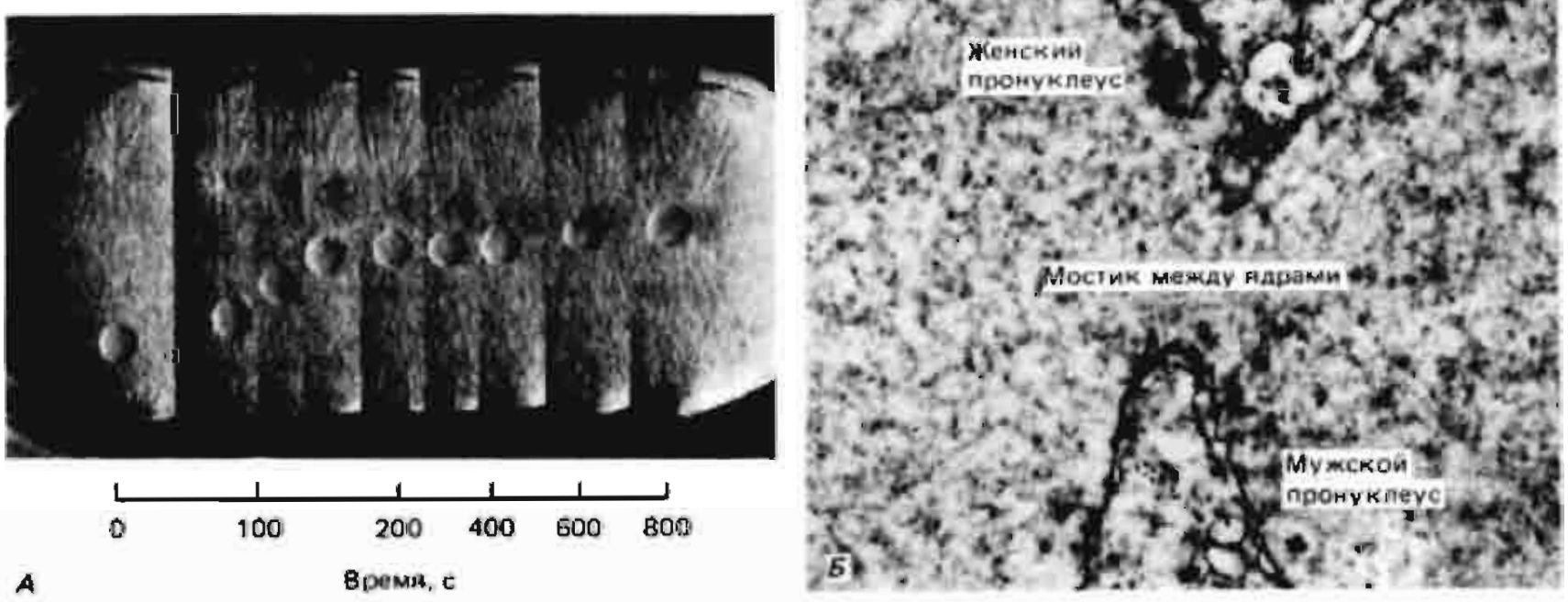


Рис. 2.28. Преобразования в ядре при оплодотворении у морского ежа. *А*. Миграция женского и мужского пронуклеусов в яйце *Clypeaster japonicus*. Мужской пронуклеус окружен микротрубочками спермальной звезды. Стрелки в нижней части рисунка указывают, в какое время производилось фотографирование. *Б*. Слияние пронуклеусов в яйце морского ежа. (*А* — из Hamaguchi, Hiramoto, 1980; фотография с любезного разрешения авторов. *Б* — фотография с любезного разрешения F. J. Longo.)

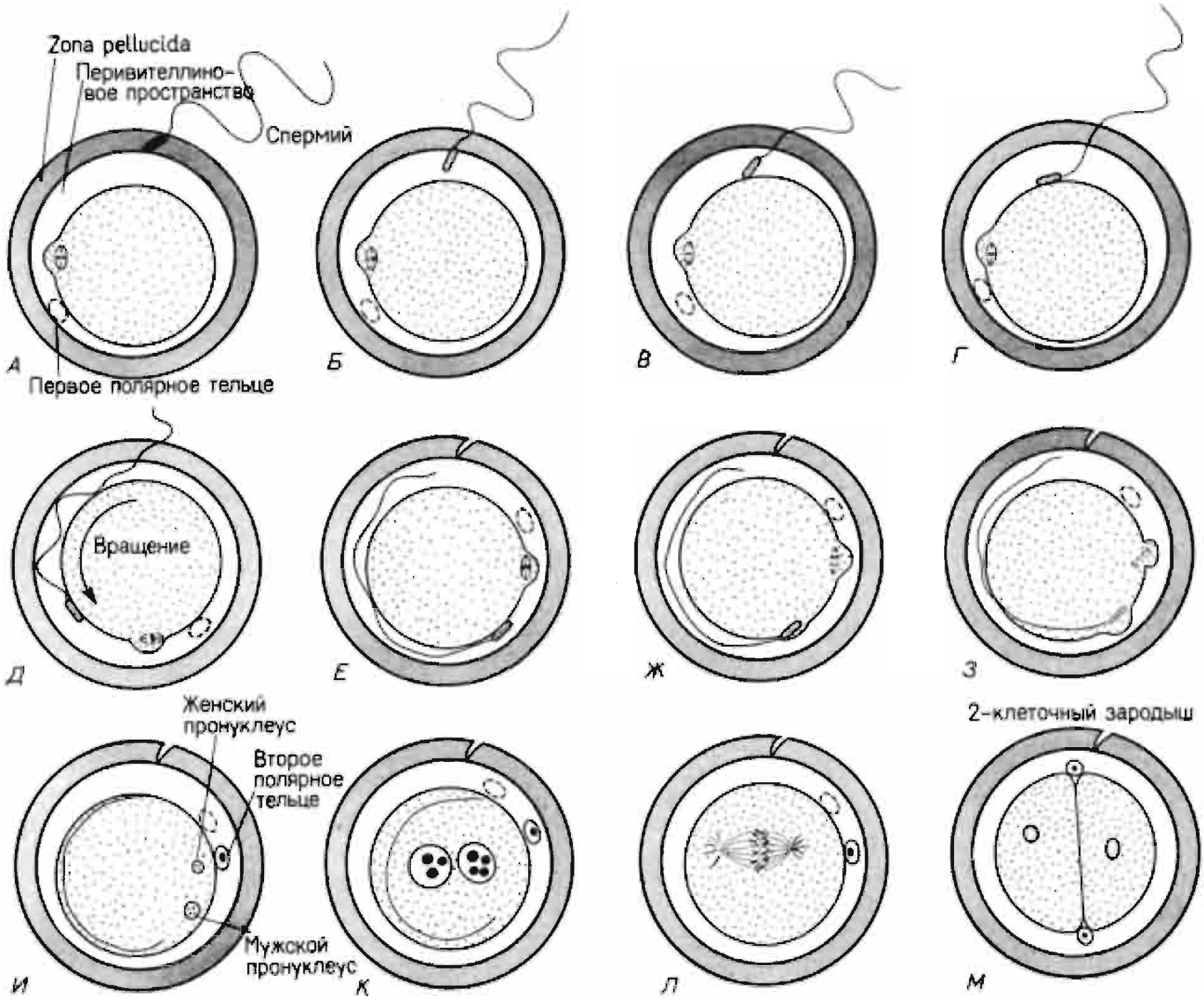


Рис. 2.29. Схема процесса оплодотворения у хомячка. *А*. Спермий прикрепляется к прозрачной оболочке. *Б*. Лизируя материал прозрачной оболочки, спермий прокладывает себе дорогу в перивителлиновое пространство между оболочкой и яйцом. После прикрепления спермия к яйцу (*В*) его головка ложится вдоль плазматической мембраны (*Г*). Прочное прикрепление спермия к яйцу и взмахи его хвоста вызывают вращение яйца (*Д*), причем спермий целиком проникает в перивителлиновое пространство (*Е*). Плазматические мембраны спермия и яйца сливаются (*Ж*), и головка спермия деконденсируется (*З*). После того как оба пронуклеуса набухнут и встретятся в центре яйца (*И*, *К*), их мембраны дезинтегрируются и начинается первое деление дробления (*Л*, *М*). (По Yanagimachi, 1981.)

дается заново путем слияния мембранных пузырьков. Деконденсацию хроматина можно вызвать искусственно путем обработки ядер спермиев кролика веществами, разрушающими дисульфидные мостики, поэтому не исключено, что ооцит содержит некое вещество, которое также разрушает эти связи (Calvin, Bedford, 1971; Kvist et al., 1980).

Пока ядро ооцита млекопитающих завершает второе мейотическое деление, мужской пронуклеус увеличивается в размерах. Затем оба пронуклеуса перемещаются навстречу друг другу, реплицируя ДНК в процессе миграции. Когда пронуклеусы приходят в контакт, их ядерные оболочки разрушаются. Происходит конденсация хроматина с образованием видимых хромосом, которые, как у большинства животных, располагаются на общем митотическом веретене первого деления дробления. Таким образом, у млекопитающих истинно диплоидное ядро впервые появляется не у зиготы, а у двухклеточного зародыша.

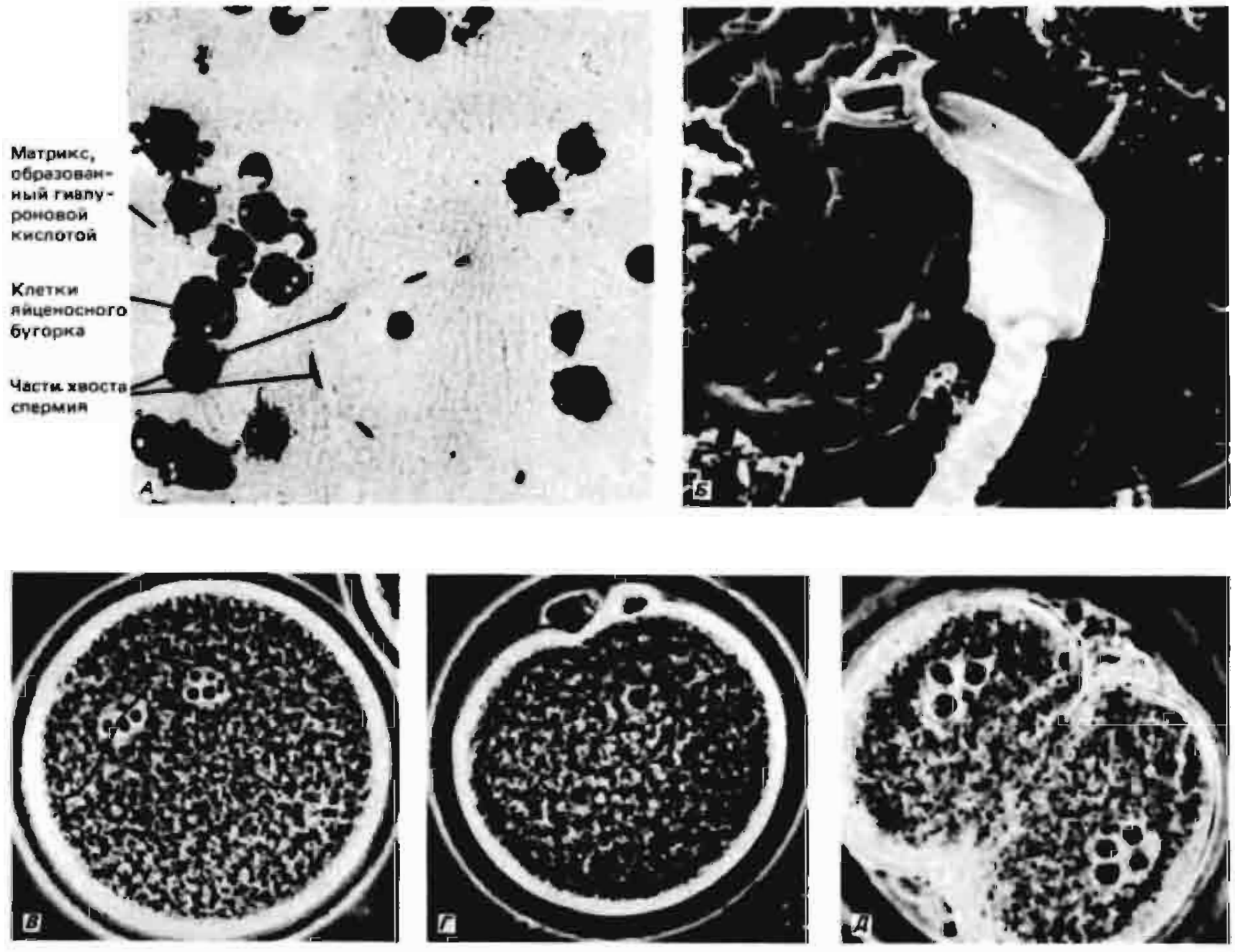


Рис. 2.30. Оплодотворение у хомячка. *А*. Спермий в яйценосном бугорке (видны выросты фолликулярных клеток). *Б*. Прикрепление головки спермия к прозрачной оболочке. *В*. Проникновение спермия в яйцо и набухание мужского пронуклеуса. В яйце можно видеть хвост спермия. *Г*. Установление контакта между мужским и женским пронуклеусами. *Д*. Двухклеточная стадия; видны две клетки одинакового размера с четко очерченными ядрами. В перивителлиновом пространстве находятся разрушающиеся полярные тельца. (*А* — из Yudin et al., 1988; *Б* — из Cherr et al., 1986; *В*—*Д* — из Bavister, 1980; фотографии с любезного разрешения D. Katz, G. Cherr и B. D. Bavister.)

Дополнительные сведения и гипотезы

Неравнозначность пронуклеусов у млекопитающих

Мужской и женский пронуклеусы у млекопитающих можно считать генетически эквивалентными, однако результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что между этими пронуклеусами имеются функциональные различия. У женщин иногда развивается опухоль матки, называемая **хорионаденомой**. В этом образовании плод отсутствует, но имеется гипертрофированная ткань плаценты. Показано, что большинство таких опухолей возникает при оплодотворении гаплоидным спермием безъядерной яйцеклетки. После проникновения спермия в цитоплазму число его хромосом удваивается, благодаря чему восстанавливается диплоидность. Таким образом, в этом случае весь геном оплодотворенного яйца берет начало от спермия (Jacobs et al., 1980; Ohama et al., 1981). Здесь мы встречаемся с ситуацией, при которой клетки выживают, делятся и имеют нормальное число хромосом, но развитие идет аномально.

О неравнозначности пронуклеусов у млекопитающих свидетельствуют также попытки инициировать

развитие яиц без оплодотворения спермием. Способность яйца развиваться без оплодотворения называется **партеногенезом** (от греч. parthénos — девственница и genesis — возникновение). Яйца многих беспозвоночных и некоторых позвоночных животных способны к нормальному развитию, если их активировать искусственно. В этих случаях участие спермия в развитии представляется необязательным. Однако у млекопитающих партеногенеза не наблюдается. Если при мейозе у мыши подавить отделение полярного тельца, то возникнут диплоидные яйца, в которых весь наследственный материал берет начало от матери. Такие клетки делятся и образуют зародышей с хордой, мышцами, скелетом и разными органами, включая бьющееся сердце. Но развитие продолжается недолго, и на 10—11 сут (середина беременности у мыши) между нормальными и партеногенетическими зародышами обнаруживаются глубокие различия (рис. 2.31). Партеногенетические зародыши утрачивают правильную организацию и дегенерируют (Surani et al., 1986). Следовательно, развитие мыши не может осуществляться под контролем только хромосом яйца.

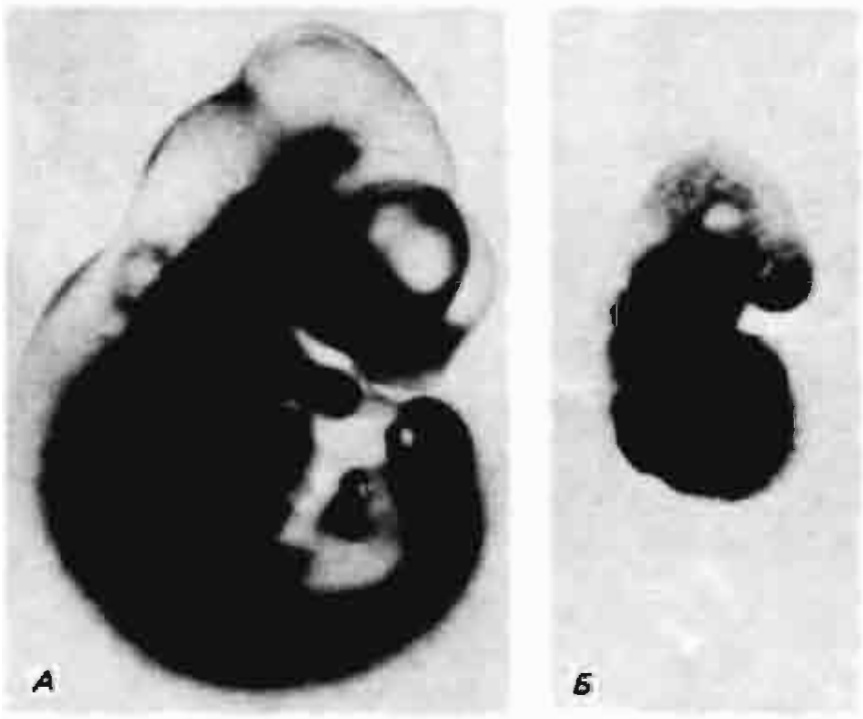
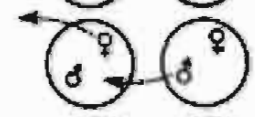
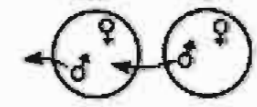


Рис. 2.31. Зародыши мыши на 11-й день беременности: *А* — контрольный, *Б* — партеногенетический (с двумя женскими пронуклеусами). Зародыши развивались в одной и той же самке. Помимо того, что партеногенетические зародыши имеют меньшие размеры и у них выявляются признаки дегенерации, размеры их плацент также значительно меньше. (Из Surani, Barton, 1983; фотографии с любезного разрешения авторов.)

Гипотеза о разных свойствах мужского и женского пронуклеусов находит поддержку также в опытах пересадки пронуклеусов (Surani, Barton, 1983; McGrath, Solter, 1984). Мужской или женский пронуклеусы могут быть извлечены из яйца мыши вскоре после оплодотворения и пересажены в другие только что оплодотворенные яйца. (Эти пронуклеусы можно отличить один от другого, поскольку женский пронуклеус всегда расположен под полярными тельцами.) Таким образом можно получить зиготы с двумя мужскими или двумя женскими пронуклеусами. Эти зиготы дробятся, но развитие зародышей и первого, и второго типа не идет до конца, тогда как некоторые контрольные яйца после операции пересадки пронуклеуса (содержащие один мужской и один женский пронуклеусы из разных зигот) развиваются нормально (табл. 2.1). Более того, развитие мышиных зародышей с двумя женскими или двумя мужскими пронуклеусами прекращается в то же время, что и развитие партеногенетических мышиных зародышей. Таким образом, хотя у многих животных оба пронуклеуса эквивалентны, у млекопитающих между ними имеются важные функциональные различия. Эти различия могут быть обусловлены разными модификациями, претерпеваемыми ДНК в ядрах спермия и яйца (гл. 12). Для завершения развития зародыша млекопитающего необходимы оба пронуклеуса, материнский и отцовский.

Таблица 2.1. Опыты по пересадке пронуклеусов [1]

Тип реконструированных зигот	Операция	Число успешных пересадок	Число выживших зародышей
С двумя материнскими пронуклеусами		339	0
С двумя отцовскими пронуклеусами		328	0
Контроль		348	18

[1] McGrath, Solter, 1984.

Активация метаболизма яйца

До сих пор мы обсуждали механизмы, с помощью которых спермий и яйцо узнают друг друга, сливаются и благодаря которым происходит слияние их гаплоидных ядер. Но для того чтобы оплодотворение привело к развитию яйца, должны произойти изменения в его цитоплазме [1].

Зрелое яйцо морского ежа представляет собой метаболически инертную клетку, которую активирует проникающий в нее спермий. Эта активация является, однако, только стимулом, запускающим запрограммированную цепь метаболических событий. Реакции яйца на воздействие спермия можно подразделить на «ранние», которые осуществляются в течение нескольких секунд после соединения гамет, и «поздние», происходящие спустя несколько минут после этого соединения (табл. 2.2).

Ранние реакции

Как мы видели, контакт между спермием и яйцом запускает два основных механизма блокирования полиспермии: быстрый блок, инициируемый поступлением в клетку натрия, и медленный блок, инициируемый повышением внутриклеточной концентрации ионов кальция. Активация яиц, по-видимому, всегда обусловлена повышением концентрации свободных ионов кальция в цитоплазме. У первичноротых, например у улиток и червей, кальций обычно поступает в яйцо из внешней среды. У вторичноротых, например у рыб, лягушек и морских ежей, активация осуществляется в результате выхода ионов кальция из внутриклеточных депо, причем возникает волна высвобождения ионов кальция, распространяющаяся по поверхности яйца (Jaffe, 1983).

Результаты ряда опытов свидетельствуют о том, что этот выход ионов кальция играет важную роль в активации развития зародыша. Если в яйца инъецировать хелирующее кальций вещество — ЭГТА,— то в них не происходит увеличения концентрации свободных ионов кальция и не наблюдается активации метаболизма. Напротив, яйца можно активировать искусственно, в отсутствие спермиев, посредством воздействий, вызывающих выход свободного кальция в цитоплазму. Было показано (Steinhardt, Epel, 1974), что микромолярные количества кальциевого ионофора A23187 вызывают у большинства яиц реакции, характерные для оплодотворенных яиц: в нормальной последовательности происходят отделение оболочки оплодотворения, повышение внутриклеточного pH, скачкообразное увеличение потребления кислорода, интенсификация синтеза белков и ДНК. Существенно, что такая активация может происходить при полном отсутствии ионов кальция в морской воде. В большинстве случаев развитие таких искусственно активированных яиц останавливается на стадии первого деления дробления, так как они остаются гаплоидными и не содержат центриоли спермия, необходимой для деления.

Выход кальция активирует целый ряд метаболических реакций (рис. 2.32). Одна из них заключается

Таблица 2.2. События, происходящие в процессе оплодотворения яйца морского ежа [1]

Событие	Примерное время после оплодотворения [2]
Прикрепление спермия к яйцу	0 с
Подъем потенциала оплодотворения (быстрое блокирование полиспермии)	менее 3 с
Слияние мембран спермия и яйца	менее 30 с
Выявляемое увеличение концентрации ионов кальция	30 с
Экзоцитоз кортикальных пузырьков (медленное блокирование полиспермии)	30—60 с
Активация НАД-киназы	начинается через 1 мин
Увеличение концентрации НАД·Н и НАДФ·Н	начинается через 1 мин
Увеличение потребления O_2	начинается через 1 мин
Проникновение спермия	1—2 мин
Выделение кислоты	1—5 мин
Увеличение pH (остается высоким)	1—5 мин
Деконденсация хроматина спермия	2—12 мин
Миграция ядра спермия к центру яйца	2—12 мин
Миграция яйцевого ядра по направлению к ядру спермия	5—10 мин
Активация белкового синтеза	начинается через 5—10 мин
Активация транспорта аминокислот	начинается через 5—10 мин
Инициация синтеза ДНК	20—40 мин
Митоз	60—80 мин
Первое деление дробления	85—95 мин

[1] Whitaker, Steinhardt, 1985.

[2] Примерные сроки основаны на данных для *S. purpuratus* (15—17 °), *L. pictus* (16—18 °) и *A. punctulata* (18—20 °).

[1] У некоторых видов хвостатых амфибий функция оплодотворения, заключающаяся в побуждении яйца к развитию, полностью обособилась от его генетической функции. Серебристая амбистома (*Ambystoma platineum*) является видом, представленным только одними самками. Самки производят яйца с нередуцированным числом хромосом. Такие яйца, однако, неспособны к развитию без дополнительной стимуляции. Серебристые амбистомы спариваются с самцами амбистомы Джефферсона (*A. jeffersonianum*). Спермии этих самцов только побуждают яйца к развитию (Uzzell, 1964), не участвуя в формировании генома зародыша.

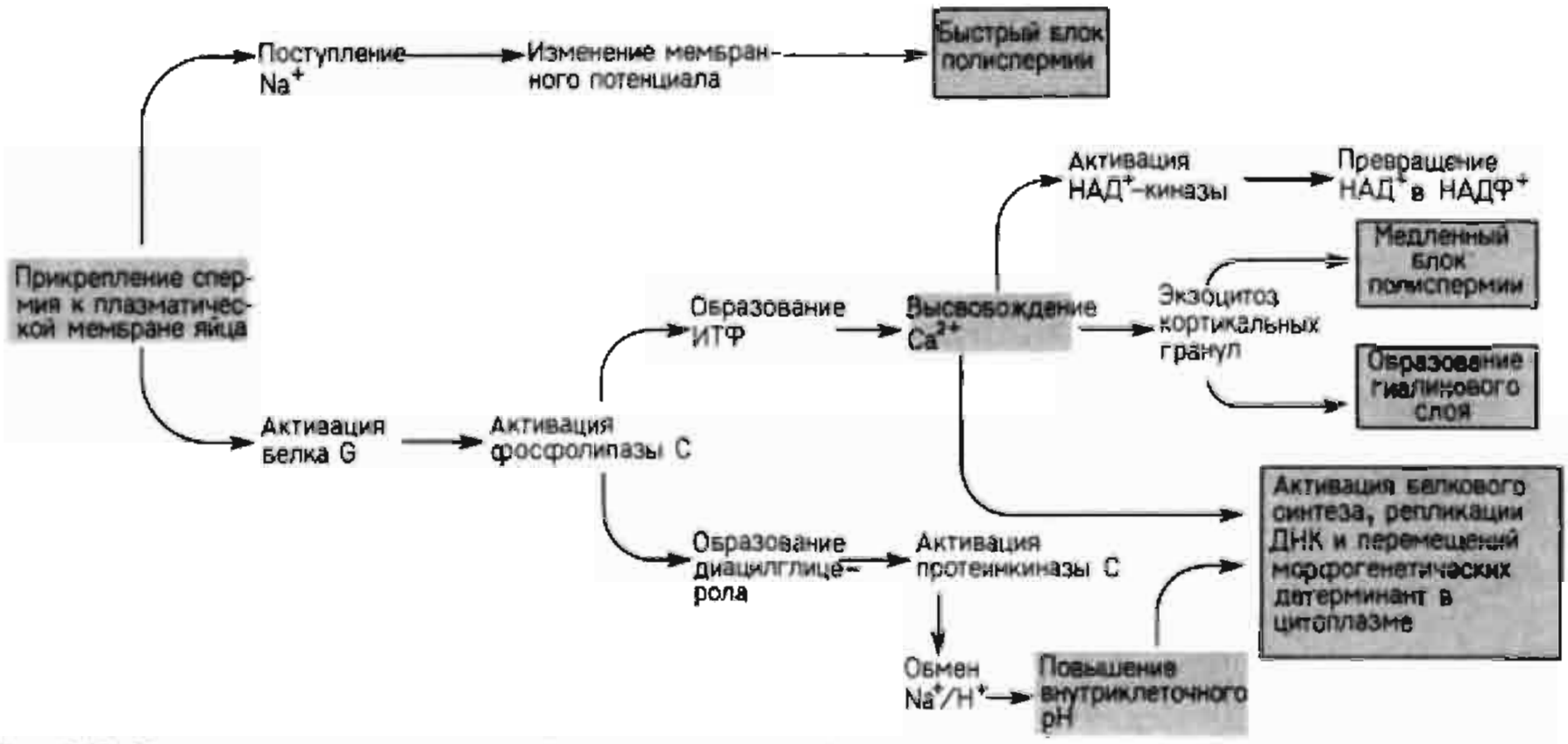


Рис. 2.32. Схема возможных соотношений между разными событиями в процессе оплодотворения у морского ежа. (По Epel, 1980; L. A. Jaffe, личное сообщение.)

в увеличении потребления яйцом кислорода. Удивительно, что этот скачок в использовании кислорода происходит не в митохондриях и, возможно, мало связан (или совсем не связан) с образованием АТФ. Вероятнее всего, кислород используется для окисления различных компонентов яйца, в частности оболочки оплодотворения. Показано (Foerder et al., 1978), что эта оболочка, имеющая полужидкую консистенцию, затвердевает при окислении остатков тирозина, связанных с белками. Одновременно окисляются также разные липиды цитоплазмы (Perry, Epel, 1977).

Другим кальцийзависимым эффектом является активация фермента $НАД^+$-киназы, которая превращает $НАД^+$ в $НАДФ^+$ (Epel et al., 1981). Это превращение может иметь важные последствия для метаболизма клетки: $НАДФ^+$ (но не $НАД^+$) используется в качестве кофермента при биосинтезе липидов. Таким образом, превращение $НАД^+$ в $НАДФ^+$ играет важную роль в создании многих новых компонентов плазматической мембраны, необходимых в процессе дробления.

Поздние реакции

Повышения содержания свободных ионов кальция недостаточно для осуществления всех реакций оплодотворения. Оно сочетается с повышением внутриклеточного pH. Полагают, что сочетание этих двух условий (высокое содержание Ca^{2+} и низкий pH) приводит к осуществлению полного спектра явлений оплодотворения, включая белковый синтез и синтез ДНК (Winkler et al., 1980; Whitaker, Steinhardt, 1982). Повышение внутриклеточного pH начинается в то время, когда наблюдается вторичное поступление ионов натрия в яйцо и обмен между ионами натрия из морской воды и ионами водорода из яйца в отношении 1:1. В яйце морского ежа обмени-

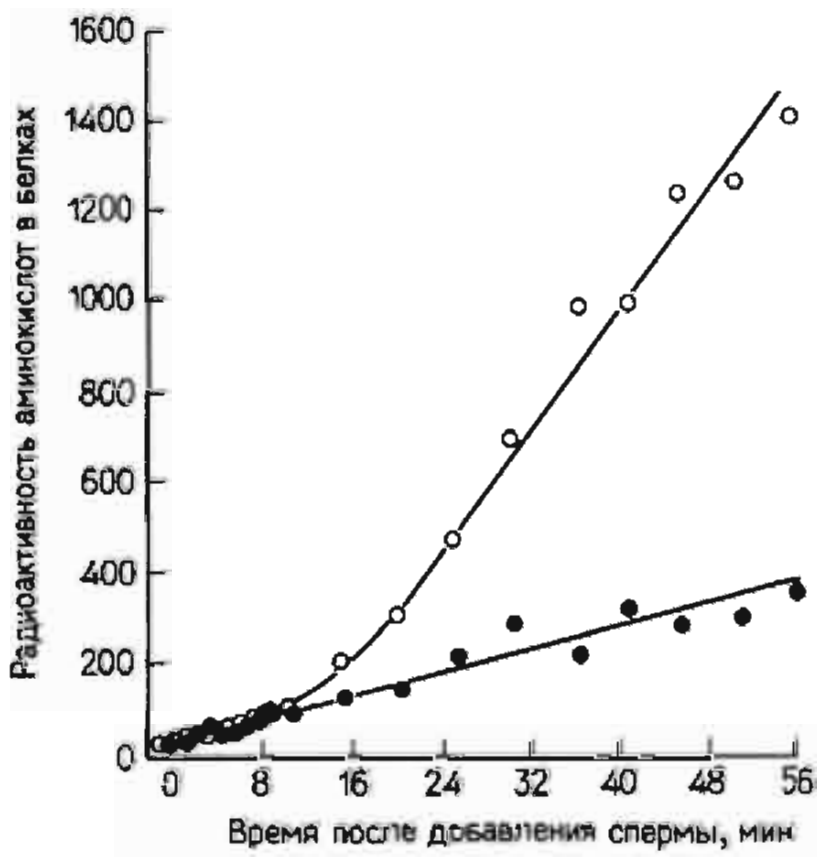


Рис. 2.33. Синтез белка в яйцах морского ежа сразу же после оплодотворения. Включение [^{14}C]-лейцина в белки неоплодотворенных (темные кружки) и оплодотворенных (светлые кружки) яиц. (По Epel, 1967.)

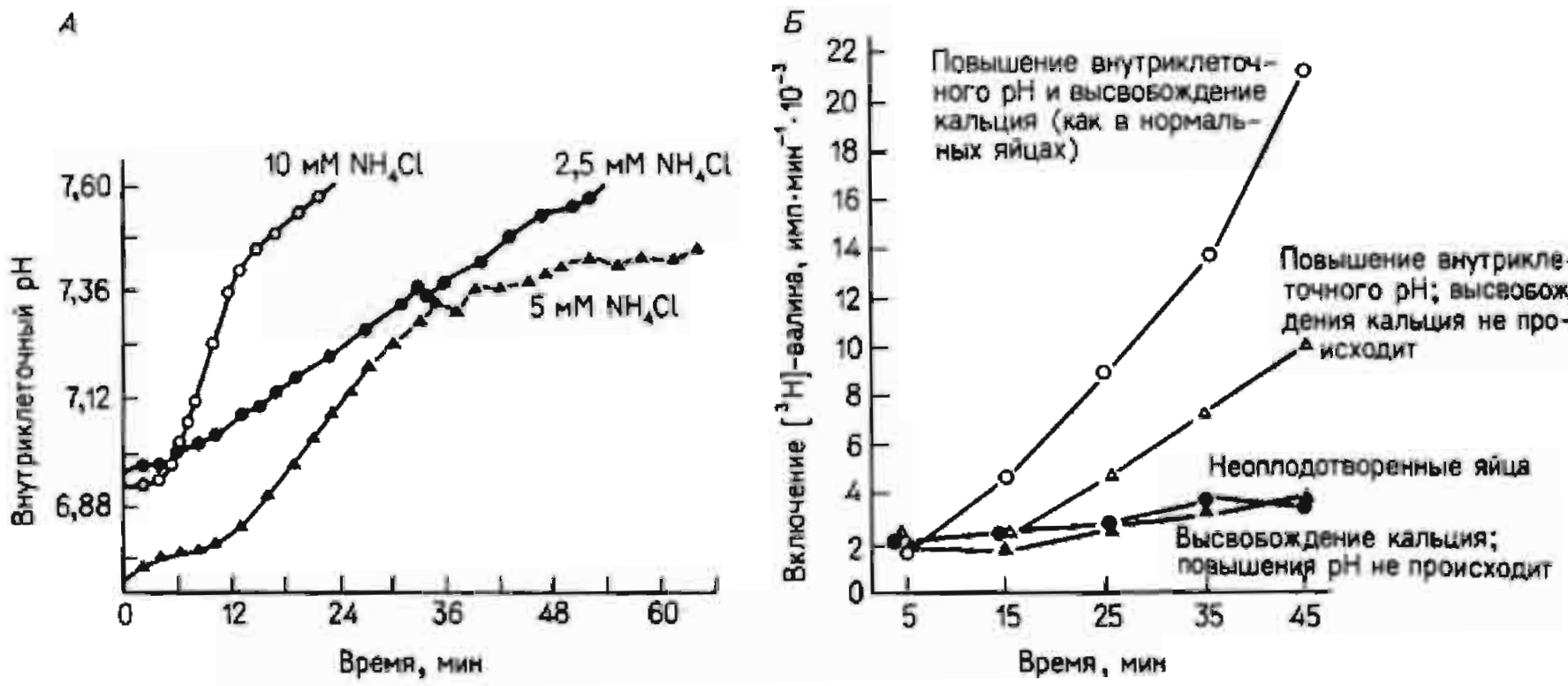


Рис. 2.34. Двойной ионный контроль белкового синтеза при оплодотворении. *А*. Повышение pH цитоплазмы при помощи аммония. Непрерывная регистрация внутриклеточного pH после помещения яиц в воду с разным содержанием NH_4Cl. *Б*. Оценка величины белкового синтеза по включению радиоактивного валина в белки при определенных ионных условиях. Повышение pH тормозилось при оплодотворении яиц в безнатриевой морской воде и при добавлении в воду ионов аммония. Увеличение концентрации свободного кальция подавлялось ЭГТА и возрастало при воздействии A23187. (*А* — по Shen, Steinhardt, 1978; *Б* — по Winkler et al., 1980.)

вается около 75% ионов водорода. Утрата такого количества ионов водорода приводит к повышению pH с 6,8 до 7,2 и к глубоким изменениям физиологии яйца (Shen, Steinhardt, 1978). Принято считать, что эти изменения обусловлены кальцийзависимой реакцией, однако было обнаружено, что многие из поздних реакций оплодотворения могут вызываться повышением внутриклеточного pH любым способом.

Поздние реакции оплодотворения включают активацию синтеза ДНК и белкового синтеза. Резкое повышение белкового синтеза обычно происходит через несколько минут после проникновения спермия и не зависит от синтеза новых мРНК (рис. 2.33). При синтезе новых белков, вероятно, используются мРНК, уже содержащиеся в цитоплазме ооцита. (Более подробно этот вопрос обсуждается в гл. 14.) Подобное скачкообразное увеличение интенсивности белкового синтеза можно вызвать искусственно, помещая неоплодотворенные яйца в раствор, содержащий ионы аммония (Winkler et al., 1980). Эти ионы теряют протоны вне клетки и диффундируют через плазматическую мембрану в виде NH_3; проникнув в клетку, они присоединяют протоны и превращаются в NH_4^+. Отражением происходящей при этом утраты свободных ионов водорода является повышение внутриклеточного pH (рис. 2.34). Таким образом, ионы аммония способны повысить pH цитоплазмы без участия в этом процессе обмена между ионами натрия и водорода. При этом они активируют белковый синтез и синтез ДНК.

Противоположное действие оказывают агенты, блокирующие повышение pH: одновременно они блокируют поздние события оплодотворения. Если яйца сразу после оплодотворения поместить в морскую воду с низким содержанием ионов натрия или если в морскую воду добавить амилорид (вещество, подавляющее транспорт ионов натрия в клетку), то белковый синтез не активируется, женский и мужской пронуклеусы не перемещаются, деления клетки не происходит (Dube et al., 1985).

Дополнительные сведения и гипотезы

Биохимия активации яйца

У морских ежей и позвоночных животных активацию яйца вызывает волна выхода ионов кальция из внутриклеточных депо, таких, как эндоплазматический ретикулум. У морского ежа *Arbacia punctulata* повышение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция впервые обнаруживается через 20—30 с после прикрепления спермия к яйцу, одновременно с инициацией экзоцитоза кортикальных

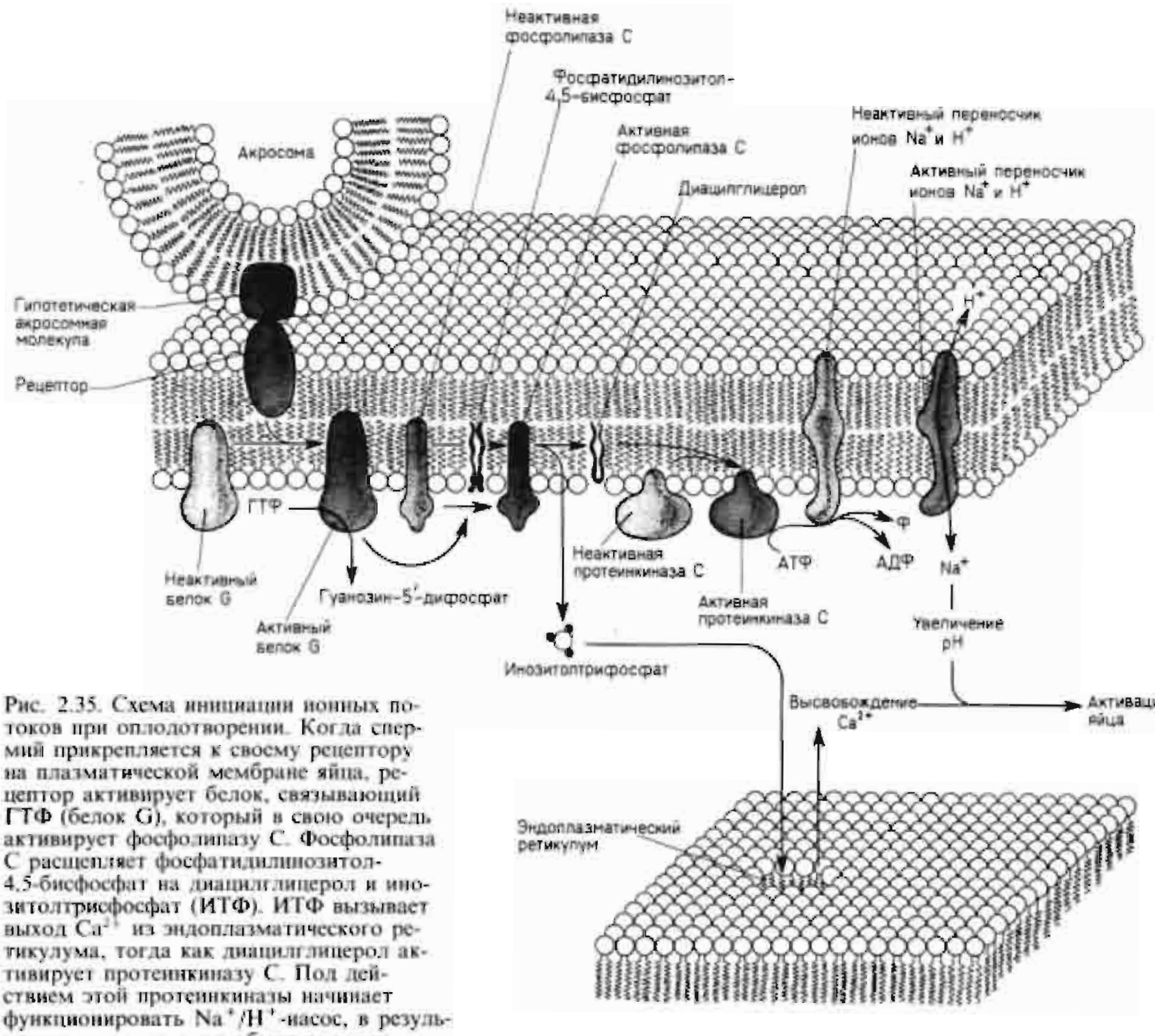


Рис. 2.35. Схема инициации ионных потоков при оплодотворении. Когда спермий прикрепляется к своему рецептору на плазматической мембране яйца, рецептор активирует белок, связывающий ГТФ (белок G), который в свою очередь активирует фосфолипазу С. Фосфолипаза С расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат на диацилглицерол и инозитолтрисфосфат (ИТФ). ИТФ вызывает выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, тогда как диацилглицерол активирует протеинкиназу С. Под действием этой протеинкиназы начинает функционировать Na^+/H^+-насос, в результате чего происходит обмен водородных ионов яйца на внеклеточные ионы натрия; таким образом повышается внутриклеточный pH. (Сходная схема, приводимая в гл. 20, была предложена для начала опухолевого роста.)

гранул (Eisen, Reynolds, 1985). Что же происходит в течение этих 25 с, что приводит к высвобождению связанных ионов кальция?

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что прикрепление спермия к плазматической мембране яйца запускает ряд реакций, осуществляющихся с помощью заключенных в мембране ферментов. Эти ферменты синтезируют вещество, способное диффундировать в цитоплазму. Таким веществом, как было показано, является **инозитол-1,4,5-трисфосфат** (ИТФ), вызывающий высвобождение связанного кальция в клетках разного типа (Berridge, 1985; Swann, Whitaker, 1986). В яйцах морского ежа сразу после оплодотворения синтез ИТФ возрастает (Ciapa, Whitaker, 1986). Образование ИТФ сопровождается выходом ионов кальция. Инъекции ИТФ непосредственно в яйца морского ежа и лягушки вызывают высвобождение ионов кальция и кортикальную реакцию (Whitaker, Irvine, 1984; Busa et al., 1985). Процесс выхода кальция из внутриклеточных депо при этом неотличим от реакции, наблюдаемой при нормальном оплодотворении. Кроме того, эти ИТФ-зависимые эффекты можно предотвратить, инъецируя в неоплодотворенные яйца вещества, образующие хелаты кальция (Turner et al., 1986); это подтверждает представление о том, что ИТФ вызывает выход кальция из внутриклеточных депо.

Ферментом, ответственным за синтез ИТФ, является **фосфолипаза С**. Этот фермент, входящий в состав плазматической мембраны, расщепляет **фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат** на **диацилглицерол** и ИТФ (рис. 2.35). Если ИТФ вызывает выход кальция из внутриклеточных депо, то диацилглицерол,

по-видимому, активирует другой содержащийся в мембране фермент, **протеинкиназу С**, которая в свою очередь активирует Na^+,H^+-переносчик, осуществляющий обмен ионов натрия на ионы водорода (Swann, Whitaker, 1985; Shen, Burgart, 1986). Таким образом, расщепление фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата может вызвать как волну высвобождения кальция, так и повышение внутриклеточного pH — два процесса, необходимые для активации яйца и его деления.

Но почему прикрепление спермия к яйцу приводит к образованию ИТФ и диацилглицерола? Имеются данные, что в некоторых клетках-мишенях гормонов соединение рецептора гормона с фосфолипазой С опосредовано белком, связывающим ГТФ (**G-белок**, см. Berridge, 1985).

Тернер и др. (Turner et al., 1986) показали, что то же самое происходит, по-видимому, в случае яиц морского ежа. Когда в яйцо инъецировали аналог ГТФ, стабилизирующий G-белок в активной конфигурации, кортикальные гранулы выделяли свое содержимое в отсутствие спермия. Если же в яйцо инъецировали конкурирующий ингибитор ГТФ, то вызываемый спермием нормальный процесс экзоцитоза кортикальных гранул подавлялся. Это подавляющее действие можно было предотвратить, инъецируя в неоплодотворенное яйцо ИТФ. Схема начальных биохимических событий при активации яйца представлена на рис. 2.32 и 2.35. Прикрепление спермия к неидентифицированному рецептору на плазматической мембране яйца изменяет конформацию этого рецептора таким образом, что он активирует G-белок. G-белок в свою очередь активирует фосфолипазу С, которая расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат на два внутриклеточных посредника, диацилглицерол и инозитолтрисфосфат. Диацилглицерол активирует протеинкиназу С; последняя фосфорилирует белок-переносчик Na^+ и H^+, тем самым делая его способным функционировать (при стимуляции ионами кальция), что приводит к повышению внутриклеточного pH. Поскольку ИТФ вызывает выход кальция из эндоплазматического ретикулума, диффузия ИТФ приводит к распространению волны выхода кальция по всему кортикальному слою яйца. Таким образом, прикрепление спермия к плазматической мембране вызывает определенные изменения внутри яйца.

Превобразования цитоплазмы яйца

Оплодотворение может также вызывать радикальные перемещения компонентов цитоплазмы. Эти перемещения часто играют решающую роль при последующем развитии в процессах клеточной дифференцировки. Как мы увидим в гл. 7 и 8, цитоплазма яйца нередко содержит **морфогенетические детерминанты**, которые сегрегируются в процессе дробления и попадают в определенные клетки. Эти детерминанты в конечном счете приводят к активации или репрессии специфических генов; в результате клетки, содержащие такие детерминанты, приобретают определенные свойства. Правильное пространственное распределение морфогенетических детерминантов является решающим условием нормального развития.

У некоторых видов благодаря присутствию пигментных гранул можно проследить перемещение таких детерминантов в соответствующую область. Одним из примеров может служить яйцо асцидии *Styela partita* (Conklin, 1905). Неоплодотворенное яйцо этого животного представлено на рис. 2.36,*А*. Серая цитоплазма центральной части яйца окружена кортикальным слоем, содержащим желтые липидные включения. Во время мейоза разрушение ядерной оболочки освобождает светлый ядерный материал, который накапливается в анимальном (верхнем) полушарии яйца. В течение 5 мин после проникновения спермия внутренняя светлая и кортикальная желтая цитоплазма перетекает в вегетативное (нижнее) полушарие яйца. Когда затем мужской пронуклеус мигрирует от вегетативного полюса к экватору по будущей задней стороне зародыша, липидные включения перемещаются вместе с ним. В результате этой миграции возникает **желтый серп**, занимающий пространство от вегетативного полюса до экватора (рис. 3.36,*Б—Г*), и желтая цитоплазма оказывается в области, где позднее у личинки образуются мышечные клетки.

Перемещения цитоплазмы наблюдаются и в ооцитах амфибий. У многих видов бесхвостых амфибий единственный спермий может проникнуть в любом месте анимального полушария; после этого события распределение цитоплазматических компонентов яйца изменяется. Наиболее заметны изменения в пигментированном поверхностном слое цитоплазмы. Первоначально слой темного меланинового пигмента покрывает все анимальное полушарие. После проникновения спермия поверхностный слой цитоплазмы смещается примерно на 30° по отношению к внутренней цитоплазме (Manes, Elinson, 1980; Vincent et al., 1986), в результате чего у некоторых бесхвостых амфибий (например, у лягушек рода *Rana*) вблизи экватора против места проникновения спермия появляется серповидная слабо пигментированная область (рис. 2.37) (Roux, 1887, Ancel, Vintenberger, 1948). Эту слабо пигментированную область назвали **серым серпом.** Как мы увидим в последующих главах, серый серп соответствует области, в ко-

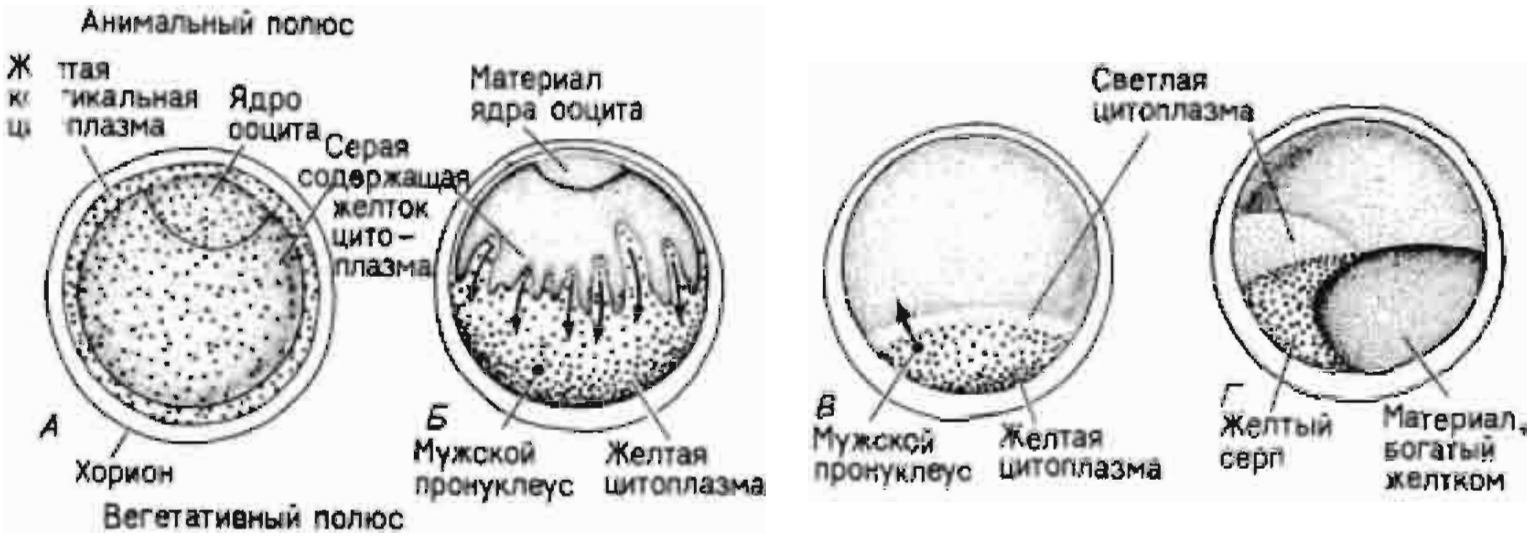


Рис. 2.36. Перемещение цитоплазматических масс в яйце асцидии *Styela partita*. *А*. До оплодотворения желтая кортикальная цитоплазма окружает серую цитоплазму, содержащую желток. *Б*. В момент проникновения спермия желтая кортикальная цитоплазма и светлая цитоплазма из области, где произошло разрушение ядра ооцита, перетекают в вегетативное полушарие по направлению к спермию. *В*. Когда мужской пронуклеус мигрирует в анимальном направлении к женскому пронуклеусу, желтая цитоплазма и светлая цитоплазма перемещаются вместе с ним. *Г*. Окончательное положение светлой цитоплазмы и желтой цитоплазмы. Оно соответствует областям, в которых будут расположены клетки, дающие начало соответственно мезенхиме и мышцам. (По Duechar, 1975.)

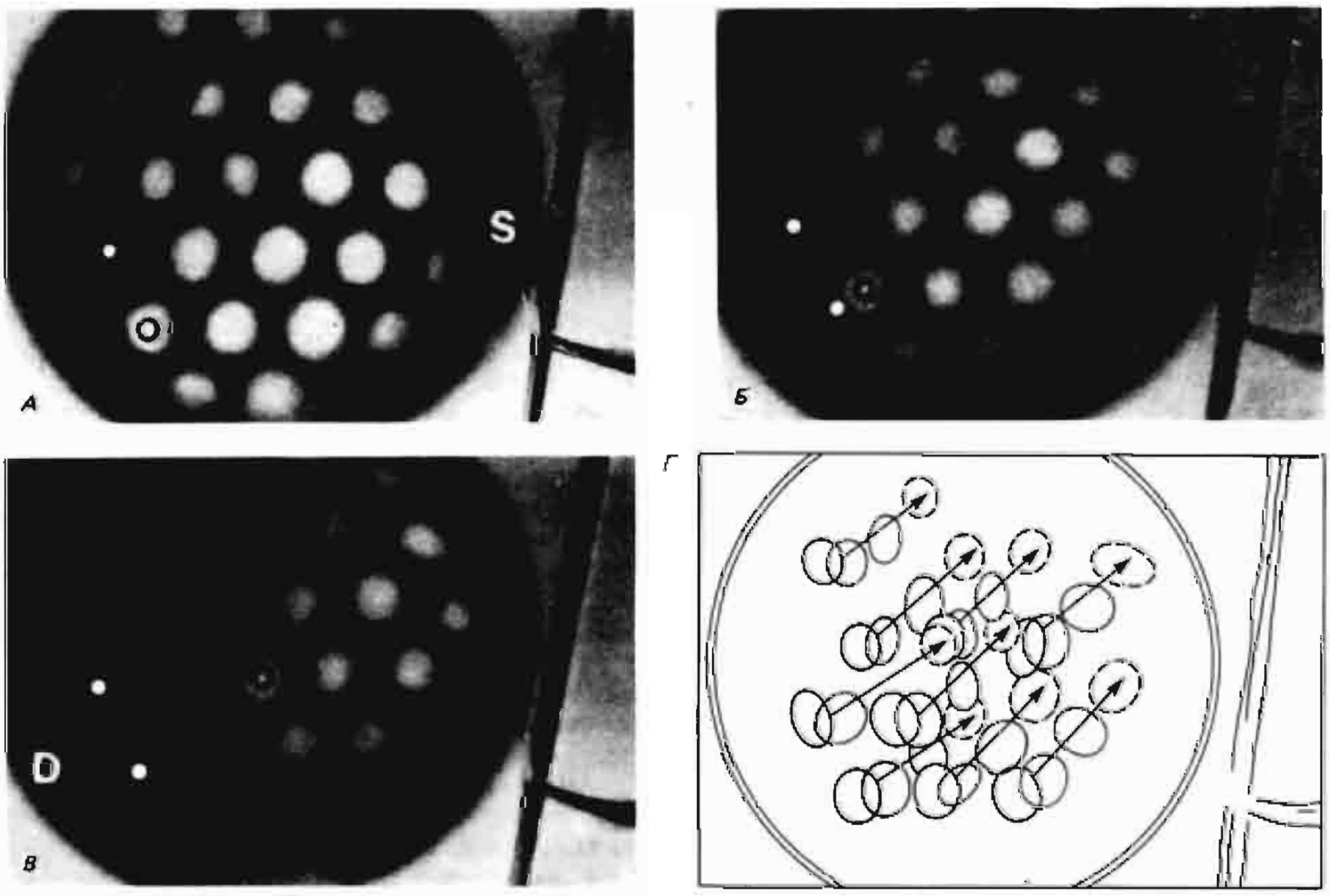


Рис. 2.37. Фотографии, на которых прослеживается поворот субкортикальной цитоплазмы относительно кортикального слоя в яйце *Xenopus*. В яйцах сразу после оплодотворения маркировали субкортикальный слой, отпечатывая гексагональную решетку. Для этого использовали краситель нильский голубой, который окрашивает липиды желточных пластинок. Кортикальный слой иммобилизировали, заключая яйца в желатину. Первоначальное положение светлых пятен отмечали на поверхности яйца (кружки на рис. *А*). В течение первого клеточного цикла светлые пятна смещались относительно наружного иммобилизованного слоя приблизительно на 30° (рис. *Б*, *В*). Отмечены место проникновения спермия (S) и положение будущей спинной поверхности зародыша (D). На рис. *Г* суммированы данные о перемещении цитоплазмы в вегетативной (нижней) области яйца. (Из Vincent et al., 1986; фотографии с любезного разрешения J.C. Gerhart.)

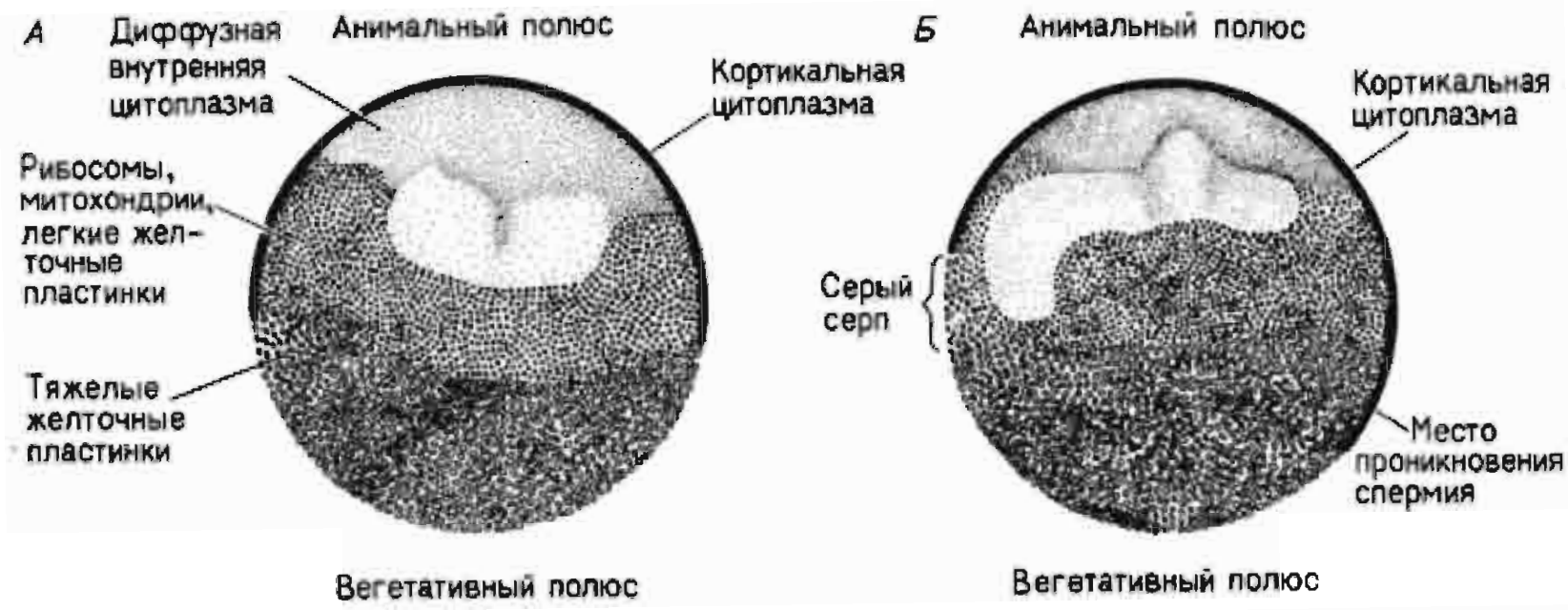


Рис. 2.38. Перемещение областей цитоплазмы, сопровождающее оплодотворение у лягушки *Discoglossus pictus*. Срезы яиц были приготовлены через разные сроки после оплодотворения. *А*. Схематическое изображение среза яйца через 15 мин после оплодотворения. *Б*. Яйцо через 135 мин после оплодотворения. (Первое деление дробления у этого вида начинается через 150 мин.) Наблюдается смещение кортикальной цитоплазмы относительно внутренней цитоплазмы; положение компонентов последней также изменилось. (По Klag, Ubbels, 1975.)

торой у зародышей амфибий инициируется гаструляция.

У других бесхвостых амфибий, например у *Xenopus*, у которых серый серп неразличим, поворот кортикального слоя относительно внутренней, субкортикальной цитоплазмы тоже происходит. Это было продемонстрировано следующим образом (Vincet et al., 1986): гексагональную решетку красителя (нильского голубого) отпечатывали на субкортикальной цитоплазме, тогда как на поверхности наносили пятна другим красителем (лектином, связанным с флуоресцеином). Яйцо иммобилизировали, заключая его в желатину. Светлые пятна в решетке нильского голубого смещались на 30° относительно флуоресцирующих пятен лектина (рис. 2.37). В случае интактных, неиммобилизованных яиц смещается, вероятно, поверхностный слой, тогда как субкортикальная цитоплазма, которая загружена желточными пластинками, не меняет своего положения, удерживаемая силой тяжести.

Эти цитоплазматические перемещения играют решающую роль для дальнейшего развития зародыша. Как мы увидим в гл. 4 и 8, перемешивание цитоплазматических масс, которое происходит при таких перемещениях, инициирует цепь реакций, определяющих положение дорсовентральной (спинно-брюшной) оси зародыша лягушки. Первоначальная организация цитоплазмы яйца претерпевает глубокие изменения, особенно в будущей спинной области зародыша (которая у отдельных видов отличима по присутствию серого серпа), причем часть вегетативного материала яйца увлекается к анимальному полюсу (Klag, Ubbels, 1975; Gerhart et al., 1983; рис. 2.38).

Имеется определенная зависимость между распределением компонентов цитоплазмы и тем, как протекает дробление — процесс, отделяющий оплодотворение от эмбриогенеза. У асцидий первое деление дробления разделяет яйцо на две зеркальные половины. Начиная с этой стадии, каждому делению по одну сторону от первой борозды соответствует деление по другую ее сторону, являющееся его «зеркальным отражением». Положение первой борозды не случайно и обнаруживает некоторую зависимость от места проникновения спермия и последующего поворота цитоплазмы. Согласованность между плоскостью деления и перемещениями цитоплазмы, вероятно, опосредована микротрубочками спермальной звезды. Когда яйца амфибий инкубируют в присутствии веществ, препятствующих сборке микротрубочек, например колхицина, звезды не образуются и перемещения цитоплазматических масс не происходит. Таким образом, центриоли спермия не только участвуют в создании митотического аппарата, но и способствуют реорганизации цитоплазмы зиготы (Manes et al., 1978; Gerhart et al., 1981; Elinson, 1985). Перераспределение цитоплазматических масс произошло, пронуклеусы встретились, ДНК реплицируется, новые белки транслируются. Достигнута стадия, с которой может начинаться развитие многоклеточного организма.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Afzelius B. A. (1976). A human syndrome caused by immotile cilia. Science **193**, 317—319.

Amos L. A., Klug A. (1974). Arrangement of subunits in flagellar microtubules. J. Cell Sci. **14**, 523—549.

Ancel P., Vintenberger P. (1948). Recherches sur le determinisme de la symmetrie bilatérale dans l'oeuf des amphibiens. Bull. Biol. Fr. Belg. [Suppl.] **31**, 1—182.

Austin C. R. (1965). Fertilization. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Bavister B. D. (1980). Recent progress in the study of early events in mammalian fertilization. Devel. Growth Differ. **22**, 385—402.

Bedford J. M. (1968). Ultrastructural changes in the sperm head during fertilization in the rabbit. Am. J. Anat. **123**, 329—357.

Bentley J. K., Shimomura H., Garbers D. L. (1986). Retention of a functional resact receptor in isolated sperm plasma membranes. Cell **45**, 281—288.

Berridge M. J. (1985). The molecular basis of communication with the cell. Sci. Am. **253**, 142—152.

Berridge M. J., Irvine R. F. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature **312**, 315—321.

Bestor T. M., Schatten G. (1981). Anti-tubulin immunofluorescence microscopy of microtubules present during the pronuclear movements of sea urchin fertilization. Dev. Biol. **88**, 80—91.

Bleil J. D., Wassarman P. M. (1980). Mammalian sperm and egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse-egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. Cell **20**, 873—882.

Bleil J. D., Wassarman P. M. (1986). Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm. J. Cell Biol. **102**, 1363—1371.

Boveri T. (1902). On multipolar mitosis as a means of analysis of the cell nucleus. (Translated by S. Gluecksohn-Waelsch.) In: B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, 1974.

Boveri T. (1907). Zellenstudien VI. Die Entwicklung dispermer Seeigeleier. Ein Beiträge zur Befruchtungslehre und zur Theorie des Kernes. Jena Zeit. Naturwiss. **43**, 1—292.

Braden A. W. H., Austin C. R. (1954). The number of sperm about the eggs in mammals and its significance for normal fertilization. Aust. J. Biol. Sci. **7**, 543—551.

Busa W. B., Ferguson J. E., Joseph S. K., Williamson J. R., Nuccitelli R. (1985). Activation of frog (*Xenopus laevis*) eggs by inositol triphosphate. I. Characterization of Ca^{2+} release from intracellular stores. J. Cell Biol. **100**, 677—682.

Calvin H. I., Bedford J. M. (1971). Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Reprod. Fertil. [Suppl.] **13**, 65—75.

Carroll E. J., Epel D. (1975). Isolation and biological activity of the proteases released by sea urchin eggs following fertilization. Dev. Biol. **44**, 22—32.

Chambers E. L., Pressman B. C., Rose B. (1974). The activity of sea urchin eggs by the divalent ionophores A23187 and X-537A. Biochem. Biophys. Res. Commun. **60**, 126—132.

Chandler D. E., Heuser J. (1979). Membrane fusion during secretion: Cortical granule exocytosis in sea urchin eggs as studied by quick-freezing and freeze fracture. J. Cell Biol. **83**, 91—108.

Cherr G. N., Lambert H., Meizel S., Katz D. F. (1986). In vitro studies of the golden hamster sperm acrosomal reaction: Completion on zona pellucida and induction by homologous zonae pellucidae. Dev. Biol. **114**, 119—131.

Ciapa B., Whitaker M. (1986). Two phases of inositol polyphosphate and diacylglycerol production at fertilization. FEBS Lett. **195**, 347—351.

Clermont Y., Leblond C. P. (1955). Spermiogenesis of man, monkey, and other animals as shown by the "periodic acid-Schiff" technique. Am. J. Anat. **96**, 229—253.

Colwin A. L., Colwin L. H. (1963). Role of the gamete membranes in fertilization in *Saccoglossus kowalevskii* (Enteropneustra). I. The acrosome reaction and its changes in early stages of fertilization. J. Cell Biol. **19**, 477—500.

Colwin L. H., Colwin A. L. (1960). Formation of sperm entry holes in the vitelline membrane of *Hydroides hexagonis* (Annelida) and evidence of their lytic origin. J. Biophys. Biochem. Cytol. **7**, 315—320.

Conklin E. G. (1905). The orientation and cell-lineage of the ascidian egg. J. Acad. Nat. Sci. Phila. **13**, 5—119.

Cross N. L., Elinson R. P. C. (1980). A fast block to polyspermy in frogs mediated by changes in the membrane potential. Dev. Biol. **75**, 187—198.

Dan J. C. (1967). Acrosome reaction and lysins. In: C. B. Metz and A. Monroy (eds.), Fertilization, Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 237—367.

Davis B. K. (1981). Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as determinant of capacitation interval. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 7560—7564.

Davis B. K., Byrne R., Bedigan K. (1980). Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during in vitro incubation of rat sperm cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 1546—1550.

Dawid T. B., Blackler A. W. (1972). Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondria in *Xenopus*. Dev. Biol. **29**, 152—161.

De Robertis E. D. P., Saez F. A., De Robertis E. M. F. (1975). Cell Biology, 6th Ed., Saunders, Philadelphia.

Dube F., Schmidt T., Johnson C. H., Epel D. (1985). The hierarchy of requirements for an elevated pH during early development of sea urchin embryos. Cell **40**, 657—666.

Deuchar E. (1975). Cellular Interactions in Animal Development. Halstead, New York.

Eisen A., Reynolds G. T. (1985). Sources and sinks for the calcium release during fertilization of single sea urchin eggs. J. Cell Biol. **100**, 1522—1527.

Elinson R. P. (1985). Changes in levels of polymeric tubulin associated with activation and dorsoventral polarization of the frog egg. Dev. Biol. **109**, 224—233.

Elinson R. P. (1986). Fertilization in amphibians: The ancestry of the block to polyspermy. Int. Rev. Cytol. **101**, 59—100.

Epel D. (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: A "late" response to fertilization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **57**, 899—906.

Epel D. (1977). The program of fertilization. Sci. Am. **237(5)**, 128—138.

Epel D. (1980). Fertilization. Endeavour N.S. **4**, 26—31.

Epel D., Patton C., Wallace R. W., Cheung W. Y. (1981). Calmodulin activates NAD kinase of sea urchin eggs: An early response. Cell **23**, 543—549.

Florman H. M., Bechtol K. B., Wassarman P. M. (1984). Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm. Dev. Biol. **106**, 243—255.

Florman H. M., Storey B. T. (1982). Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro. Dev. Biol. **91**, 121—130.

Florman H. M., Wassarman P. M. (1985). O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. Cell **41**, 313—324.

Foerder C. A., Shapiro B. M. (1977). Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. Proc. Natl, Acad. Sci. USA **74**, 4214—4218.

Foerder C. A., Kubanoff S. J., Shapiro B. M. (1978). Hydrogen peroxide production, chemoluminescence, and the respiratory burst at fertilization: Interrelated events in early sea urchin development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 3183—3187.

Franklin L. E. (1970). Fertilization and the role of the acrosomal reaction in non-mammals. Biol. Reprod. [Suppl.] **2**, 159—176.

Fulton B. P., Whittingham D. G. (1978). Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. Nature **273**, 149—151.

Gardiner D. M., Grey R. D. (1983). Membrane junctions in *Xenopus* eggs: Their distribution suggests a role in calcium regulation. J. Cell Biol. **96**, 1159—1163.
Gerhart J., Black S., Gimlich R., Scharf S. (1983). Control of polarity in the amphibian egg. In: W. R. Jeffery and R. A. Raff (eds.), Time, Space, and Pattern in Embryonic Development. Alan R. Liss, New York, pp. 261—286.
Gerhart J., Ubbels G., Black S., Hara K., Kirschner M. (1981). A reinvestigation of the role of the grey crescent in axis formation in *Xenopus laevis*. Nature **292**, 511—516.
Giles R. E., Blanc H., Cann H. M., Wallace D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 6715—6719.
Gilkey J. C., Jaffe L. F., Ridgway E. G., Reynolds G. T. (1978). A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. J. Cell Biol. **76**, 448—466.
Glabe C. G. (1985). Interaction of the sperm adhesive protein, bindin, with phospholipid vesicles. II. Bindin induces the fusion of mixed-phase vesicles that contain phosphatidylcholine and phosphatidylserine in vitro. J. Cell Biol. **100**, 800—806.
Glabe C. G., Lennarz W. J. (1979). Species-specific sperm adhesion in sea urchins: A quantitative investigation of bindin-mediated egg agglutination. J. Cell Biol. **83**, 595—604.
Glabe C. G., Vacquier V. D. (1977). Species-specific agglutination of eggs by bindin isolated from sea urchin sperm. Nature **267**, 836—838.
Glabe C. G., Vacquier V. D. (1978). Egg surface glycoprotein receptor for sea urchin sperm bindin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 881—885.
Gould M., Stephano J. L. (1987). Electrical response of eggs to acrosomal protein similar to those induced by sperm. Science **235**, 1654—1656.
Gould-Somero M., Jaffe L. A., Holland L. Z. (1979). Electrically mediated fast polyspermy block in eggs of the marine worm, *Urechis caupo*. J. Cell Biol. **82**, 426—440.
Green G. R., Poccia E. L. (1985). Phosphorylation of sea urchin sperm H1 and H2B histones precedes chromatin decondensation and H1 exchange during pronuclear formation. Dev. Biol. **108**, 235—245.
Gwatkin R. B. L. (1976). Fertilization. In: G. Poste and G. L. Nicolson (eds.), The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development. Elsevier North-Holland, New York, pp. 1—53.
Hamaguchi M. S., Hiramoto Y. (1980). Fertilization process in the heart-urchin, *Clypaester japonicus*, observed with a differential interference microscope. Dev. Growth Differ. **22**, 517—530.
Hansbrough J. R., Garbers D. L. (1981). Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. J. Biol. Chem. **256**, 1447—1452.
Hartsoeker N. (1694). Essai de dioptrique. Paris.
Hertwig O. (1876). Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung, und Theilung des theirischen Eies. Morphol. Jahr. **1**, 347—452.
Hinkley R. E., Wright B. D., Lynn J. W. (1986). Rapid visual detection of sperm—egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. Dev. Biol. **118**, 148—154.
Hirao Y., Yanagimachi R. (1978). Effects of various enzymes on the ability of hamster egg plasma membrane to fuse with spermatozoa. Gamete Res. **1**, 3—12.
Hollinger T. G., Schuetz A. W. (1976). "Cleavage" and cortical granule breakdown in *Rana pipiens* oocytes induced by direct microinjection of calcium. J. Cell Biol. **71**, 395—401.
Hong K., Vacquier V. D. (1986). Fusion of liposomes induced by a cationic protein from the acrosomal granule of abalone spermatozoa. Biochemistry **25**, 543—549.
Hylander B. L., Summers R. G. (1982). An ultrastructural and immunocytochemical localization of hyaline in the sea urchin egg. Dev. Biol. **93**, 368—380.
Jacobs P. A., Wilson C. M., Sprenkle J. A., Rosenshein N. B., Migeon B. R. (1980). Mechanism of origin of complete hydatidiform moles. Nature **286**, 714—716.
Jaffe L. A. (1976). Fast block to polyspermy in sea urchins is electrically mediated. Nature **261**, 68—71.
Jaffe L. A. (1980). Electrical polyspermy block in sea urchins: Nicotine and low sodium experiments. Dev. Growth Differ. **22**, 503—507.
Jaffe L. A., Cross N. L. (1983). Electrical properties of vertebrate oocyte membranes. Biol. Reprod. **30**, 50—54.
Jaffe L. A., Sharp A. P., Wolf D. P. (1983). Absence of an electrical polyspermy block in the mouse. Dev. Biol. **96**, 317—323.
Jaffe L. F. (1983). Sources of calcium in egg activation: A review and hypothesis. Dev. Biol. **99**, 265—276.
Just E. E. (1919). The fertilization reaction in *Echinarachnius parma*. Biol. Bull. **36**, 1—10.
Klag J. J., Ubbels G. A. (1975). Regional morphological and cytochemical differentiation of the fertilized egg of *Discoglossus pictus* (Anura). Differentiation **3**, 15—20.
Kolliker A. von (1841). Beiträge zur Kenntnis der Geschlectverhältnisse und der Samenflüssigkeit wirbelloser Thiere, nebst einem Versuch über Wesen und die Bedeutung der sogenannten Samenthiere (Berlin).
Kvist U., Afzelius B. A., Nilsson L. (1980). The intrinsic mechanism of chromatin decondensation and its activation in human spermatozoa. Dev. Growth Differ. **22**, 543—554.
Leeuwenhoek A. van (1685). Letter to the Royal Society of London. Quoted in Ruestow E. G. (1983). Images and ideas: Leeuwenhoek's pereception of the spermatozoa. J. Hist. Biol. **16**, 185—224.
Levine A. E., Walsh K. A., Fodor E. J. B. (1978). Evidence of an acrosin-like enzyme in sea urchin sperm. Dev. Biol. **63**, 299—306.
Longo F. J. (1986). Surface changes at fertilization: Integration of sea urchin (*Arbacia punctulata*) sperm and oocyte plasma membranes. Dev. Biol. 116, 143—159.
Longo F. J., Lynn J. W., McCulloh D. H., Chambers E. L., So F. (1986). Correlative ultrastructural and electrophysiological studies of sperm—egg interactions of the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. Dev. Biol. **118**, 155—166.
Lopez L. C., Bayna E. M., Litoff D., Shaper N. L., Shaper J. H., Shur B. D. (1985). Receptor function of mouse sperm surface galactosyltransferase during fertilization. J. Cell Biol. **101**, 1501—1510.
Luttmer S., Longo F. J. (1985). Ultrastructural and morphometric observations of cortical endoplasmic reticulum in *Arbacia*, *Spisula*, and mouse eggs. Dev. Growth Differ. **27**, 349—359.
Manes M. E., Barbieri F. D. (1976). Symmetrization in the amphibian egg by disrupted sperm cells. Dev. Biol. **53**, 138—141.
Manes M. E., Barbieri F. D. (1977). On the possibility of sperm aster involvement in dorso-ventral polarization and pronuclear migration in the amphibian egg. J. Embryol. Exp. Morphol. **40**, 187—197.
Manes M. E., Elinson R. P. (1980). Ultraviolet light inhibits gray crescent formation in the frog egg. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **189**, 73—76.
Manes M. E., Elinson R. P., Barbieri F. D. (1978). Formation of the amphibian gray crescent: Effects of colchicine and cytochalasin-B. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **185**, 99—104.
McGrath J., Solter D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genome. Cell **37**, 179—183.
Meizel S. (1984). The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. Biol. Rev. **59**, 125—157.
Metz C. B. (1978). Sperm and egg receptors involved in fertilization. Curr. Top. Dev. Biol. **12**, 107—148.

Miller R. L. (1978). Site-specific agglutination and the timed release of a sperm chemoattractant by the egg of the leptomedusan, *Orthopyxis caliculata*. J. Exp. Zool. **205**, 385—392.
Miller R. L. (1985). Sperm chemo-orientation in the metazoa. In: C. B. Metz, Jr. and A. Monroy (eds.), Biology of Fertilization. Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 275—337.
Miyazaki S., Igusa Y. (1981). Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. Nature **290**, 702—704.
Moy G. W., Vacquier V. D. (1979). Immunoperoxidase localization of bindin during the adhesion of sperm to sea urchin eggs. Curr. Top. Dev. Biol. **13**, 31—44.
Ogawa K., Mohri T., Mohri H. (1977). Identification of dynein as the outer arms of sea urchin sperm axonemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5006—5010.
Ohama K., Kajii T., Okamoto E., Fukada Y., Imaizumi K., Tsukahara M., Kobayashi K., Hagiwara K. (1981). Dispermic origin of XV hydatidiform moles. Nature **292**, 551—552.
Perry G., Epel D. (1977). Calcium stimulation of a lipoxygenase activity accounts for the respiratory burst fertilization of the sea urchin egg. J. Cell Biol. **75**, 40a.
Prevost J. L., Dumas J. B. (1824). Deuxieme mémoire sur la génération. Ann. Sci. Nat. **2**, 129—149.
Primakoff P., Hyatt H., Tredick-Kline J. (1987). Identification and purification of a sperm cell surface protein with a potential role in sperm—egg membrane fusion. J. Cell Biol. **104**, 141—149.
Rossignol D. P., Earles B. J., Decker G. L., Lennarz W. J. (1984). Characterization of the sperm receptor on the surface of eggs of *Strongylocentrotus purpuratus*. Dev. Biol. **104**, 308—321.
Roux W. (1887). Beitrage zur Entwicklungsmechanik des Embryo. Arch. Mikrosk. Anat. **29**, 157—212.
Sofing P. M., Sowinski J., Storey B. T. (1979). An ultrastructural study of epididymal mouse spermatozoa binding to zonae pellucida in vitro: Sequential relationship to acrosome reaction. J. Exp. Zool. **209**, 229—238.
Saunders J. W., Jr. (1970). Principles and Patterns of Animal Development. Macmillan, New York.
Schackmann R. W., Eddy E. M., Shapiro B. M. (1978). The acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus* sperm: Ion requirements and movements. Dev. Biol. **65**, 483—495.
Schackmann R. W., Shapiro B. M. (1981). A partial sequence of ionic changes associated with the acrosome reaction of *Strongylocentrotus purpuratus*. Dev. Biol. **81**, 145—154.
Schatten G., Mazia D. (1976). The penetration of the spermatozoan through the sea urchin egg surface at fertilization: Observations from the outside on whole eggs and from the inside on isolated surface. Exp. Cell Res. **98**, 325—337.
Schatten G., Schatten H. (1983). The energetic egg. The Sciences **23(5)**, 28—35.
Schatten H., Schatten G. (1980). Surface activity at the plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin-B sensitivity: Scanning electron micrography and time-lapse video microscopy during fertilization of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. Dev. Biol. **78**, 435—449.
Schroeder T. E. (1979). Surface area change at fertilization: Resorption of the mosaic membrane. Dev. Biol. **70**, 306—326.
SeGall G. K., Lennarz W. J. (1979). Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. Dev. Biol. **71**, 33—48.
Shen S. S., Burgart L. J. (1986). 1,2-Diacylglycerols mimic phorbol 12-myristate 13-acetate activation of the sea urchin egg. J. Cell Physiol. **127**, 330—340.
Shen S. S., Steinhardt R. A. (1978). Direct measurement of intracellular pH during metabolic depression of the sea urchin egg. Nature **272**, 253—254.
Shur B. D., Hall N. G. (1982a). Sperm surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation. J. Cell Biol. **95**, 567—573.
Shur B. D., Hall N. G. (1982b). A role for mouse sperm surface galactosyltransferase in sperm binding for the egg zona pellucida. J. Cell Biol. **95**, 574—579.
Stambaugh R., Buckley U. (1960). Identification and subcellular localization of the enzymes effecting penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa. J. Reprod. Fertil. **19**, 423—432.
Stambaugh R., Mastroianni L. (1980). Stimulation of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) proacrosin activation by oviduct fluid. J. Reprod. Fertil. **59**, 479—484.
Steinhardt R. A., Epel D. (1974). Activation of sea urchin eggs by a calcium ionophore. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 1915—1919.
Steinhardt R., Zucker R., Schatten G. (1977). Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. Dev. Biol. **58**, 185—196.
Summers R. G., Hylander B. L. (1975). Species-specificity of acrosome reaction and primary gamete binding in echinoids. Exp. Cell Res. **96**, 63—68.
Summers R. G., Hylander B. L., Colwin L. H., Colwin A. L. (1975). The functional anatomy of the echinoderm spermatozoon and its interaction with the egg at fertilization. Am. Zool. **15**, 523—551.
Surani M. A. H., Barton S. C. (1983). Development of gynogenetic eggs in the mouse: Implications for parthenogenetic embryos. Science **222**, 1034—1036.
Surani M. A. H., Barton S. C., Norris M. L. (1986). Nuclear transplantation in the mouse: Hereditable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome. Cell **45**, 127—136.
Swann K., Whitaker M. (1985). Stimulation of the Na/H exchanger of sea urchin eggs by phorbol ester. Nature **314**, 274—277.
Swann K., Whitaker M. (1986). The part played by inositol trisphosphate and calcium in the propagation of the fertilization wave in sea urchin eggs. J. Cell Biol. **103**, 2333—2342.
Talbot P. (1985). Sperm penetration through oocyte investments in mammals. Am. J. Anat. **174**, 331—346.
Talbot P., DiCarlantonio G., Zao P., Penkala J., Haimo L. T. (1985). Motile cells lacking hyaluronidase can penetrate the hamster oocyte cumulus complex. Dev. Biol. **108**, 387—398.
Tilney L. G., Bryan J., Bush D. J., Fujiwara K., Mooseker M. S., Murphy D. B., Snyder D. H. (1973). Microtubules: Evidence for thirteen protofilaments. J. Cell Biol. **59**, 267—275.
Tilney L. G., Kiehart D. P., Sardet C., Tilney M. (1978). Polymerization of actin. IV. Role of Ca^{2+} and H^+ in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm. J. Cell Biol. **77**, 536—560.
Tombes R. M., Shapiro B. M. (1985). Metabolite channeling: A phosphocreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. Cell **41**, 325—334.
Turner P. R., Jaffe L. A., Fein A. (1986). Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs by inositol 1,4,5-trisphosphate and GTP-binding protein. J. Cell Biol. **102**, 70—76.
Usui N., Yanagimachi R. (1976). Behaviour of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various stages of maturation, fertilization and early development. J. Ultrastruct. Res. **57**, 276—288.
Uzzell T. M. (1964). Relation of the diploid and triploid species of the *Ambystoma jeffersonianum* complex. Copeia **1964**, 257—300.
Vacquier V. D. (1979). The interaction of sea urchin gametes during fertilization. Am. Zool. **19**, 839—849.
Vacquier V. D., Moy G. W. (1977). Isolation of bindin: The pro-

tein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 2456—2460.

Vacquier V. D., Payne J. E. (1973). Methods for quantitating sea urchin sperm in egg binding. Exp. Cell Res. **82**, 227—235.

Vacquier V. D., Tegner M. J., Epel D. (1973). Protease release from sea urchin eggs at fertilization alters the vitelline layer and aids in preventing polyspermy. Exp. Cell Res. **80**, 111—119.

Vincent J. P., Oster G. F., Gerhart J. C. (1986). Kinematics of gray crescent formation in *Xenopus* eggs. The displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. Dev. Biol. **113**, 484—500.

von Kolliker A. (1841). Beiträge zur Kenntnis der Geseclectuerhältnisse und der Samenfluüssigheist wirbelloger Thiere, nebst einem Versuch über Wesen und die Bedeutung der sogenannten Samenthiere. Berlin.

Ward G. E., Brokaw C. J., Garbers D. L., Vacquier V. D. (1985). Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, a peptide from the egg jelly layer. J. Cell Biol. **101**, 2324—2329.

Wassarman P. (1987). The biology and chemistry of fertilization. Science **235**, 553—560.

Whitaker M., Irvine R. F. (1984). Inositol 1, **4**, 5-triphosphate microinjection activates sea urchin eggs. Nature **312**, 636—639.

Whitaker M., Steinhardt R. (1982). Ionic regulation of egg activation. Q. Rev. Biophys. **15**, 593—666.

Whitaker M. J., Steinhardt R. (1985). Ionic signalling in the sea urchin egg at fertilization. In: C. B. Metz and A. Monroy (eds.), Biology of Fertilization, Vol. 3. Academic Press, Orlando, Florida, pp. 167—221.

Williams W. L. (1972). Biochemistry of capacitation of spermatozoa. In: K. S. Moghissi and E. E. S. Hafez (eds.), Biology of Mammalian Fertilization and Implantation. Charles Thomas, Springfield, Illinois.

Wincek T. J., Parrish R. F., Polakoski K. L. (1979). Fertilization: A uterine glycosaminoglycan stimulates the conversion of sperm proacrosin to acrosin. Science **203**, 553—554.

Winkler M. M., Steinhardt R. A., Grainger J. L., Minning L. (1980). Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. Nature **287**, 558—560.

Yanagimachi R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. In: L. Mastroianni and J. D. Biggers (eds), Fertilization and Embryonic Development In Vitro. Plenum, New York, pp. 81—182.

Yanagimachi R., Noda Y. D. (1970). Electron microscope studies of sperm incorporation into the golden hamster egg. Am. J. Anat. **128**, 429—462.

Yanagimachi R., Usui N. (1974). Calcium dependence of the acrocome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp. Cell Res. **89**, 161—174.

Yudin A., Cherr G., Katz D. (1988). The structure of the cumulus matrix and zona pellucida: A new view of sperm interaction with oocyte-associated extracellular matrices. Cell Tiss. Res., in press.

Zaneveld L. J. D., Williams W. L. (1970). A sperm enzyme that disperses the corona radiata and its inhibition by decapitation factor. Biol. Reprod. **2**, 363—368.

Глава 3

Дробление: создание многоклеточности

Следует выказывать величайшее уважение по отношению к любому явлению, которое возрастает экспоненциально, как бы незначительно оно ни было.

ГАРРЕТ ХАРДИН (1968)

История развития человека в течение девяти месяцев, предшествующих его рождению, вероятно, гораздо интереснее и содержит события более грандиозные, чем все последующие семьдесят лет его жизни.

СЭМЮЕЛЬ ТЕЙЛОР КОПРИДЖ (1834)

Введение

Оплодотворение играет чрезвычайно важную роль в развитии, но оно — лишь только первая его ступень. Зигота с ее новым генетическим потенциалом и новым распределением цитоплазмы приступает к созданию многоклеточного организма. У всех известных животных это начинается с процесса, носящего название **дробления** — серии митотических делений, в результате которых огромный объем цитоплазмы яйца разделяется на многочисленные содержащие ядро клетки меньшего размера. Такие клетки, образующиеся в период дробления, называют **бластомерами**.

У большинства видов в период дробления объем зародыша не увеличивается. Это вызывает удивление, поскольку в большинстве других случаев клеточной пролиферации в период между митозами происходит рост клеток; клетка увеличивается в объеме почти вдвое и затем делится. Такой рост приводит к четкому увеличению общего объема клеток при сохранении относительно постоянного отношения объема ядра к объему цитоплазмы. Однако в период дробления зиготы объем цитоплазмы не возрастает: огромная масса цитоплазмы зиготы разделяется на все более мелкие клетки. Сначала яйцо разделяется на две половины, затем — на четыре части, восемь частей и т. д. Это деление цитоплазмы яйца, не сопровождающееся ростом, осуществляется путем выпадения интерфазного периода роста между делениями, тогда как деления ядер следуют друг за другом с такой большой скоростью, которая никогда не наблюдается в дальнейшем (даже у опухолевых клеток). Так, например, яйцо лягушки может разделиться на 37 000 клеток за 43 ч, а у дрозофилы в период дробления митозы в течение 2 ч происходят каждые 10 мин.

Скорость увеличения числа клеток в период дробления можно оценить, сравнив ее со скоростью увеличения их числа на других стадиях развития. На рис. 3.1 представлены изменения логарифма числа клеток у зародыша лягушки в зависимости от времени (Sze, 1953). Он иллюстрирует резкое изменение интенсивности клеточных делений при переходе от дробления к гаструляции. Одним из последствий высокой интенсивности делений в процессе дробления является постепенное уменьшение отношения объема цитоплазмы к объему ядра. Изменение скорости, с которой происходит снижение отношения объема цитоплазмы к объему ядра, у многих типов зародышей является решающим фактором, определяющим время активации некоторых генов.

У *Xenopus laevis* активация транскрипции новых матриц происходит лишь после 12 делений дробления. В это время снижается интенсивность делений дробления, бластомеры приобретают подвижность и в ядре начинают транскрибироваться гены. Полагают, что интенсивность дробления бластомеров за-

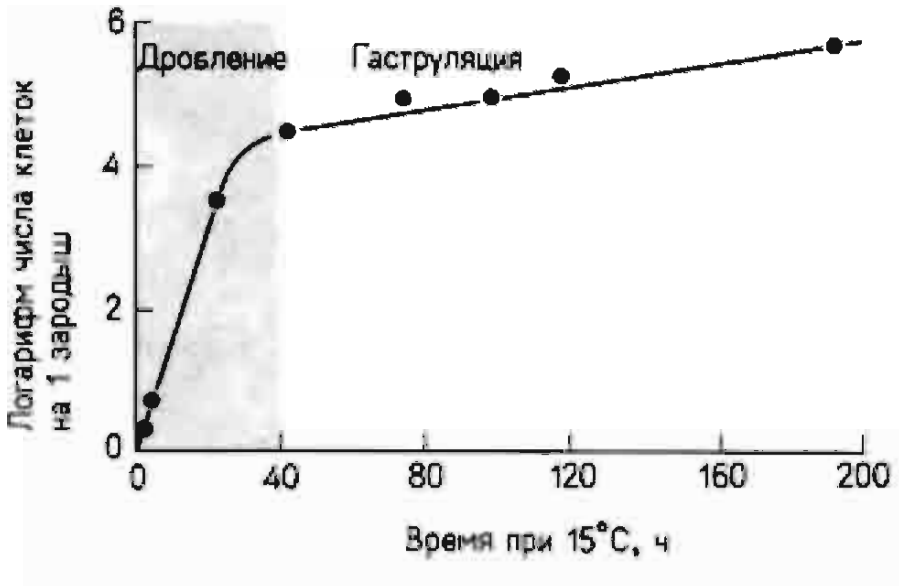


Рис. 3.1. Образование новых клеток в процессе раннего развития лягушки *Rana pipiens*. (По Sze, 1953.)

висит от какого-то фактора, синтез которого зависит от новообразованного хроматина, поскольку время перехода к следующей стадии развития может быть смещено путем изменения плоидности: чем больше хроматина содержит зародыш, тем раньше наступает переход. Если количество хроматина вдвое превышает нормальное, то переход осуществляется на одно деление раньше, чем в норме (Newport, Kirschner, 1982a, b). Таким образом, дробление начинается вскоре после оплодотворения и заканчивается, когда у зародыша достигается новое равновесие между ядром и цитоплазмой.

ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДРОБЛЕНИЯ ЗАРОДЫША

Дробление — строго координированный процесс, находящийся под генетическим контролем. Видовые особенности процесса дробления определяются двумя основными параметрами: 1) количеством и распределением желточных белков в цитоплазме и 2) присутствующими в цитоплазме факторами, которые влияют на ориентацию митотического веретена и время его образования.

Если желток в яйце распределен неравномерно, то в области, содержащей меньше желтка (**анимальном полушарии**), клеточные деления проходят с большей скоростью, чем в противоположной, богатой желтком области (**вегетативном полушарии**). Ядро зиготы часто бывает смещено к анимальному полюсу. В табл. 3.1 дана классификация типов дробления и показано влияние желтка на симметрию дробления и его характер. В общей форме можно сказать, что желток подавляет дробление. У зигот, содержащих относительно мало желтка (изолецитальные и мезолецитальные яйца), дробление бывает **голобластическим**, что означает, что борозды дробления проходят через все яйцо. Зиготы, содержащие большие запасы белков желтка, претерпевают **меробластическое дробление**, при котором делятся не полностью. Борозды дробления не проникают в богатую желтком область цитоплазмы. Меробластическое дробление может быть **дискоидальным** (у птиц) или **поверхностным** (у насекомых) в зависимости от того, сосредоточены ли запасы желтка у одного полюса (телолецитальные яйца) или в центре цитоплазмы (центролецитальные яйца).

Желток является эволюционным приспособлением, позволяющим зародышу развиваться без поступления пищи извне. Животные, яйца которых не содержат больших запасов желтка, как, например, морские ежи, обычно достигают стадии личинки за короткий срок. Их свободноплавающие личинки способны к самостоятельному питанию и продол-

Таблица 3.1. Классификация типов дробления

Тип дробления	Тип яиц по количеству и распределению желтка	Симметрия дробления	Типичные представители
Голобластическое (полное дробление)	Изолецитальные (олиголецитальные) (одиночные желточные включения распределены равномерно)	Радиальное	Иглокожие, ланцетник
		Спиральное	Большинство моллюсков, плоских, круглых и кольчатых червей
		Билатеральное	Асцидии
		Асинхронное	Млекопитающие
	Мезолецитальные (умеренно телолецитальные)	Радиальное	Амфибии
Меробластическое (частичное дробление)	Телолецитальные (плотное скопление желтка у одного полюса яйца)	Билатеральное	Головоногие моллюски
		Дискоидальное (билатеральное)	Рыбы, рептилии, птицы
	Центролецитальные (желток сосредоточен в центре яйца)	Поверхностное	Большинство членистоногих

жают дальнейшее развитие. Яйца млекопитающих, которые также не содержат больших количеств желтка, прибегают к стратегии иного рода, а именно — образуют плаценту. Как мы увидим ниже, у млекопитающих в начале дифференцировки зародыша происходит обособление клеток, которые будут участвовать в образовании плаценты. Этот орган будет снабжать зародыша пищей и кислородом на протяжении длительного периода внутриутробного развития.

Другую крайность представляют яйца рыб, рептилий и птиц. Бóльшую часть этих яиц занимает желток. Запасы желтка должны быть достаточными для того, чтобы обеспечить питание зародыша на протяжении длительного периода, так как они не имеют плаценты и в своем развитии могут не проходить личиночной стадии. Корреляция между большой концентрацией желтка и отсутствием личиночных форм обнаруживается у некоторых видов лягушек. У таких тропических лягушек, как, например, *Liopelma* и *Arthroleptella*, отсутствует стадия головастика. Яйца этих лягушек снабжены огромным количеством желтка (Lutz, 1947) и не нуждаются в том, чтобы их откладывали в воду, поскольку стадия головастика выпала из их развития. Явление прямого развития у амфибий будет подробнее рассматриваться в гл. 19.

Однако желток — только один из факторов, оказывающих влияние на характер дробления. Существуют также унаследованные особенности клеточных делений, которые накладываются на влияние желтка. Это легко увидеть на примере изолецитальных яиц, содержащих очень мало желтка. При отсутствии большого количества желтка наблюдаются четыре основных типа дробления: радиальное голобластическое, спиральное голобластическое, билатеральное голобластическое и асинхронное голобластическое.

Радиальное голобластическое дробление

Морской огурец *Synapta*

Наиболее простой пример для описания процесса дробления — это дробление радиального голобластического типа. Такой тип дробления присущ иглокожим и представителю бесчерепных — ланцетнику. Борозды при этом типе дробления ориентированы параллельно и перпендикулярно анимально-вегетативной оси яйца. На рис. 3.2 представлено дробление морского огурца *Synapta digita*. После соединения пронуклеусов ось первого митотического веретена ориентируется перпендикулярно анимально-вегетативной оси яйца. Следовательно, первая борозда дробления проходит непосредственно через анимальный и вегетативный полюсы и приводит к образованию двух дочерних клеток одинаковых размеров. Такое деление называют меридиональным, поскольку борозда проходит через два полюса подобно меридиану на глобусе. Митотические веретена второго деления дробления располагаются под прямыми углами к первому веретену, но так же, как и это веретено, они ориентированы перпендикулярно анимально-вегетативной оси яйца. Борозды дробления появляются одновременно в обоих бластомерах и также проходят через два полюса. Таким образом, два первых деления дробления меридиональны

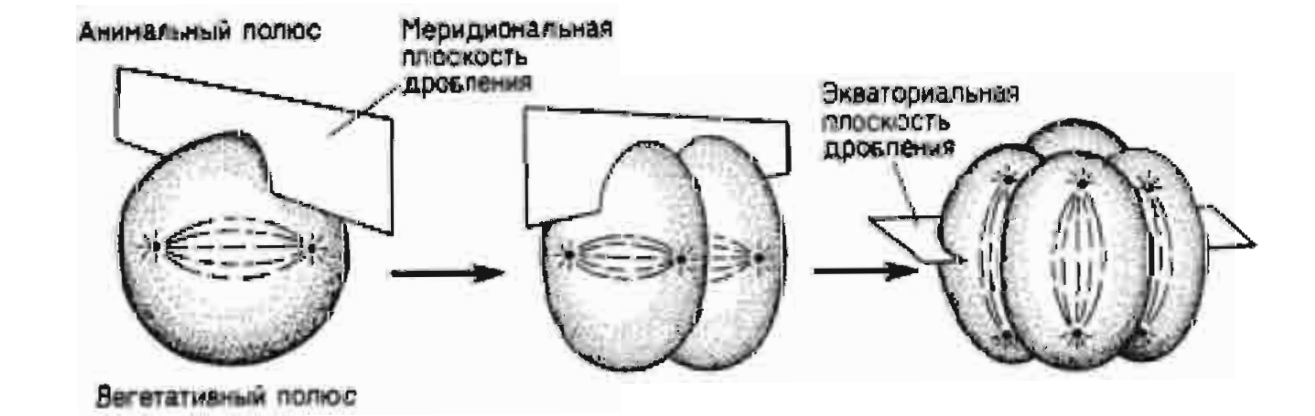


Рис. 3.2. Голобластическое дробление иглокожего *Synapta digita*, приводящее к образованию полой бластулы, которая изображена в разрезе во втором ряду справа. (По Saunders, 1982.)

и перпендикулярны друг другу. Третье деление бывает экваториальным: митотические веретена в каждом бластомере располагаются параллельно анимально-вегетативной оси, и возникающие борозды отделяют полюсы один от другого, причем зародыш разделяется на восемь бластомеров равной величины. Каждый бластомер анимальной половины зародыша теперь располагается непосредственно над бластомером вегетативной половины.

Четвертое деление бывает снова меридиональным и приводит к образованию двух ярусов по 8 клеток в каждом; пятое экваториальное деление дает начало четырем ярусам, в каждом из которых содержится по 8 клеток. Далее наблюдается чередование меридиональных и экваториальных делений, приводящих к образованию 64, 128 и 256 клеток. В результате возникает зародыш, у которого бластомеры располагаются горизонтальными рядами вдоль центральной полости. На обоих полюсах зародыша бластомеры сближаются, и возникает полый шар, стенка которого образована одним слоем клеток. Такой полый шар называют **бластулой**, а его центральную полость — **бластоцелем**.

Если провести разрез через зародыш *Synapta* в плоскости любого меридиана на любой стадии дробления, то этот разрез разделит его на две зеркальные половины. Такой тип симметрии присущ шару или цилиндру и носит название радиальной симметрии. Соответственно мы говорим, что у *Synapta* дробление радиальное голобластическое.

Морские ежи

Для морских ежей также характерно радиальное голобластическое дробление, но с некоторыми существенными модификациями. Первое и второе деления дробления очень сходны с такими же делениями у *Synapta*: оба они меридиональные и перпендикулярны друг другу. Третье деление также экваториальное и отделяет полюсы один от другого (рис. 3.3).

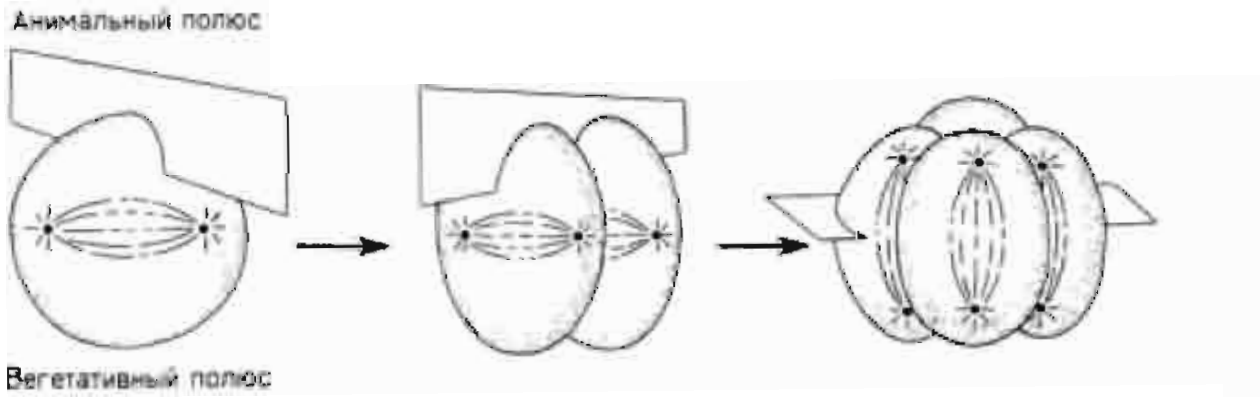
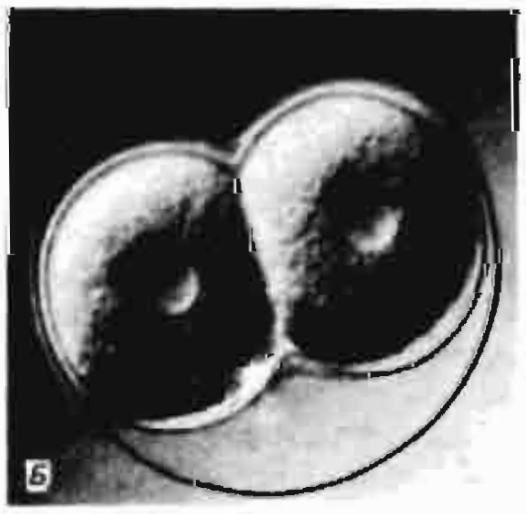
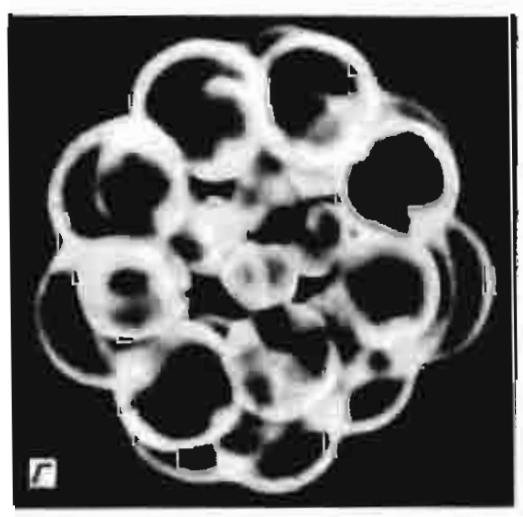


Рис. 3.3. Дробление у морского ежа. *А*. Плоскости деления при первых трех делениях дробления и образование отдельных ярусов клеток при 3—6 делениях. *Б*—*Г*. Микрофотографии живых зародышей морского ежа *Lytechinus pictus*, вид со стороны анимального полюса. *Б* — 2-клеточная и *В* — 4-клеточная стадии развития морского ежа. *Г*. 32-клеточная стадия представлена без оболочки оплодотворения, что позволяет различить мезомеры анимального полюса, центральные макромеры и вегетативные микромеры, которые видны в центре. (Фотографии с любезного разрешения G. Watchmaker.)







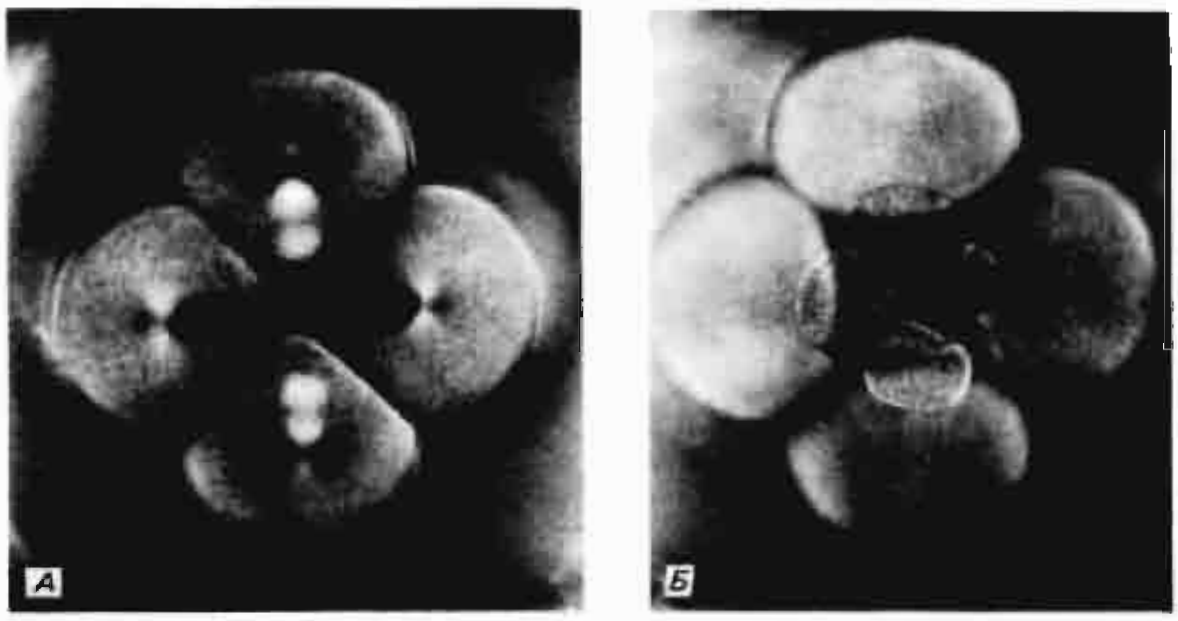


Рис. 3.4. Образование микромеров при четвертом делении у зародышей морского ежа. Вид на вегетативный полюс зародышей снизу. *А*. Положение и ориентация митотического веретена в нижней части вегетативных клеток при рассматривании живого зародыша в поляризованном свете. *Б*. Деление в соответствии с асимметричным расположением веретен привело к образованию микромеров и макромеров. (Из Inoué, 1982; фотографии с любезного разрешения S. Inoué.)

Четвертое деление, однако, происходит иначе, чем у *Synapta*. Четыре клетки анимального яруса разделяются меридионально на восемь бластомеров одинаковой величины. Эти клетки называют **мезомерами**. Вегетативный ярус претерпевает неравное экваториальное деление, в результате которого образуются четыре крупные клетки — **макромеры** и четыре клетки меньшего размера — **микромеры** у вегетативного полюса (рис. 3.4). При следующем делении восемь мезомеров 16-клеточного зародыша делятся экваториально и образуют два «анимальных» яруса, $ан_1$ и $ан_2$, расположенные один над другим. Макромеры делятся меридионально, образуя восьмиклеточный ярус ниже $ан_2$. Микромеры также делятся; возникшая маленькая группа клеток примыкает к более крупным клеткам расположенного выше яруса. При шестом делении все борозды ложатся экваториально, при седьмом — меридионально. В результате седьмого деления возникает 128-клеточная бластула.

Свен Герстадиус (Hörstadius, 1939) проделал простой опыт, который показал, что время появления борозд дробления у морского ежа и их ориентация не зависят от предыдущих делений. Когда он подавлял первые одно, два или три деления, встряхивая яйца или помещая их в гипотоническую морскую воду, то неравное (четвертое) деление дробления, приводящее к образованию микромеров, все равно наступало в положенное время (рис. 3.5). На этом основании Герстадиус пришел к заключению, что существуют три фактора, которые детерминируют деление 8-клеточного зародыша: 1) «прогрессивные изменения цитоплазмы, которые определяют ориентацию веретен, образующихся спустя определенные интервалы времени после оплодотворения»; 2) в цитоплазме вегетативной области должен существовать особый материал, образующий микромеры; и 3) должен существовать какой-то механизм, который в соответствующий момент активирует материал, образующий микромеры (Hörstadius, 1973).

Природа «микромерных часов» до сих пор не выяснена. Однако Икеда (Ikeda, 1965) получил данные, согласно которым клетка может вести отсчет событий, происходящих при дроблении, благодаря циклическим изменениям в цитоплазме. Он обнаружил, что освобождение сульфгидрильных (– SH) групп белков происходит циклически. Чередование окисленной (—S—S—) и восстановленной (HS—SH) конформаций, вероятно, отражает глубокие изменения в клеточном метаболизме. Икеда показал, что свободные сульфгидрильные группы в наибольшем числе имеются в делящихся бластомерах и в наименьшем — в то время, когда клетки не делятся (рис. 3.6, *А*). Воздействия, которые предотвращают деления дробления, не оказывают влияния на этот цикл восстановления—окисления. Отделение микромеров всегда происходит на четвертом —SH-пике после оплодотворения независимо от того, какое число делений дробления было предварительно подавлено (рис. 3.6, *Б*). Напротив, если подавить возникновение сульфгидрильного пика (путем добавления к морской воде эфира), то отделение микромеров запаздывает. Возможно, что циклические процессы восстановления и окисления играют какую-то роль во внутриклеточном отсчете времени. Из яиц морского ежа был выделен белок (Sakai, 1966, 1968), который сокращается при окислении его свободных сульфгидрильных групп. Подобные белки, возможно, и обусловливают такие циклические изменения.

Стадия бластулы при развитии морского ежа начинается тогда, когда число клеток зародыша достигнет 128. Эти клетки образуют стенку полого шара, которая окружает центрально расположенный бластоцель (рис. 3.7). Каждая клетка находится в контакте с богатой белками жидкостью бластоцеля и с гиалиновым слоем. В это время контакт между клетками становится более тесным. Анализ этого процесса у морской звезды показал (Dan-Sohkawa, Fujisawa, 1980), что образование полого

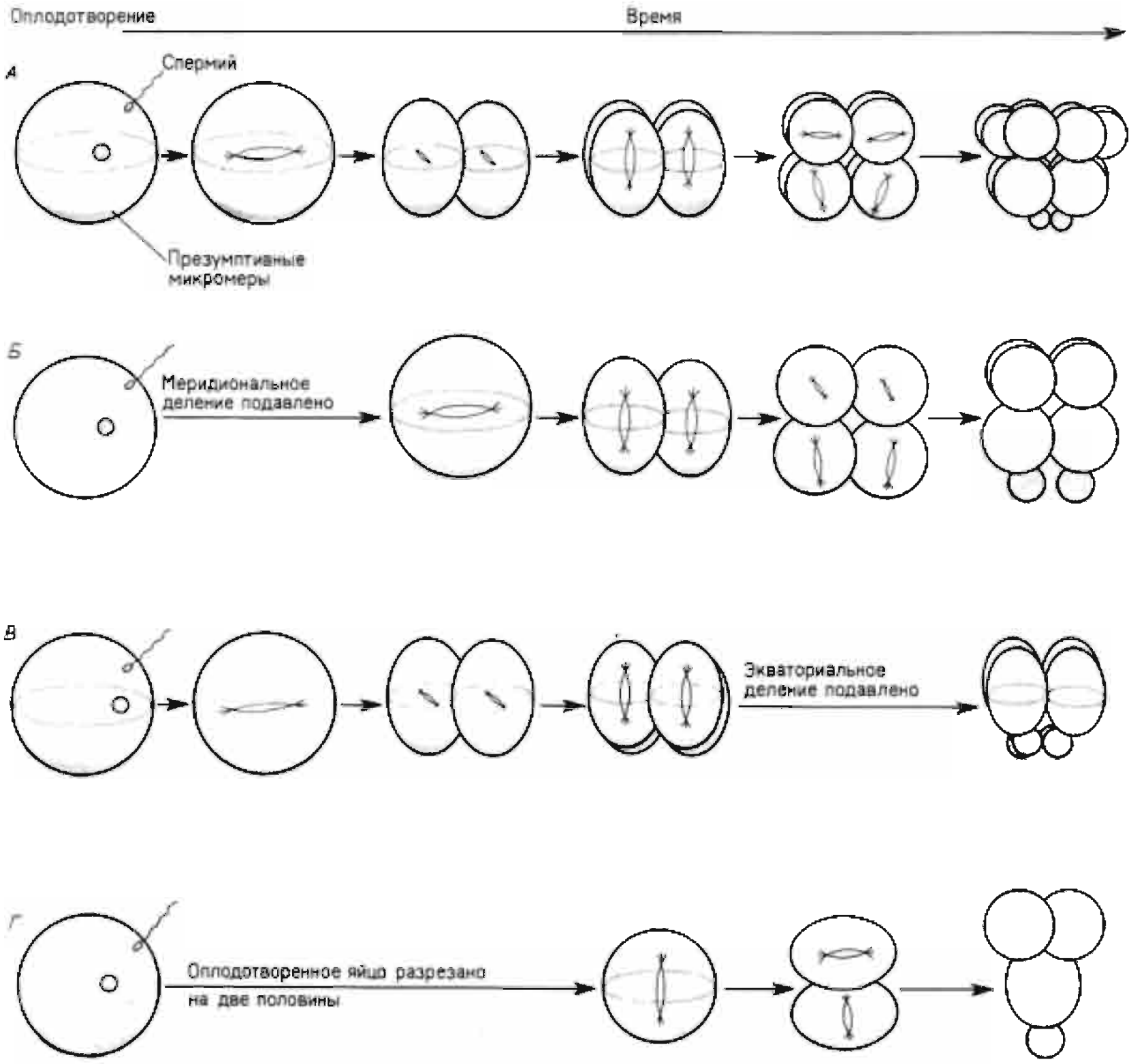
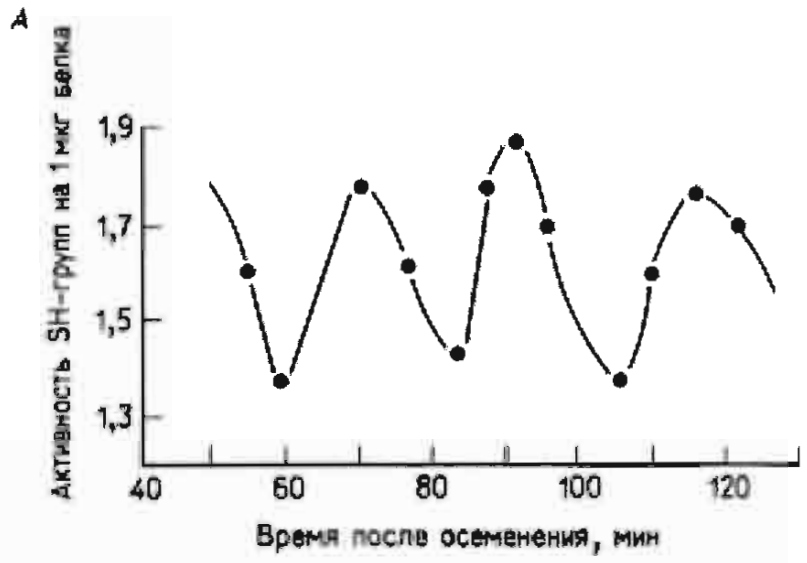


Рис. 3.5. Образование микромеров зависит от продолжительности развития, а не от числа делений. *А*. Нормальная последовательность делений дробления у морского ежа; микромеры образуются при четвертом делении. *Б*, *В*. Первое или третье деление подавлено воздействием гипотонической морской воды. *Г*. Оплодотворенное яйцо разрезано пополам в меридиональной плоскости, что привело к образованию половины структур, возникающих при нормальном дроблении. Во всех случаях микромеры (выделены серым цветом) появляются приблизительно в одно и то же время независимо от числа предшествующих делений. (По Horstadius, 1939).

шара происходит одновременно с возникновением плотных контактов между бластомерами. Эти контакты объединяют слабо связанные между собой клетки в ткань и изолируют бластоцель от окружающей среды (рис. 3.8). Поскольку клетки продолжают делиться, поверхность клеточного пласта увеличивается и этот пласт утончается. На протяжении всего периода существования бластулы ее стенка сохраняет однослойность.

Для обьяснения сопряженности процессов увеличения поверхности стенки бластулы и формирования бластоцеля были предложены две гипотезы. Согласно одной из них (Dan, 1960), первый процесс осуществляется под действием сил, исходящих от самого бластоцеля. Поскольку бластомеры секретируют в бластоцель белки, содержащаяся в бластоцеле жидкость становится вязкой. Эта жидкость поглощает большие количества воды путем осмоса, ее объем увеличивается, и она изнутри оказывает давление на бластомеры. Давление жидкости приводит также к тому, что длинная ось каждой клетки ориентируется определенным образом — так, что деление



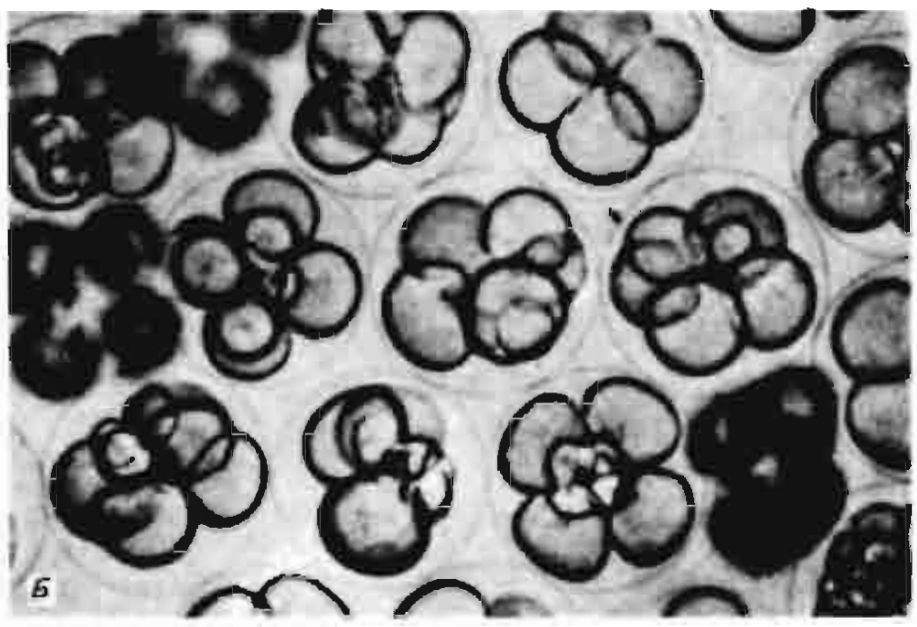


Рис. 3.6. *А*. Циклическая изменчивость числа свободных сульфгидрильных групп в белках. Максимумы совпадают с серединой митотического цикла делений дробления и наблюдаются независимо от того, было ли деление подавлено или не было. *Б*. Образование микромеров в 8-клеточных зародышах морского ежа после подавления деления ультрафиолетовым облучением. (По Ikeda, 1965.)

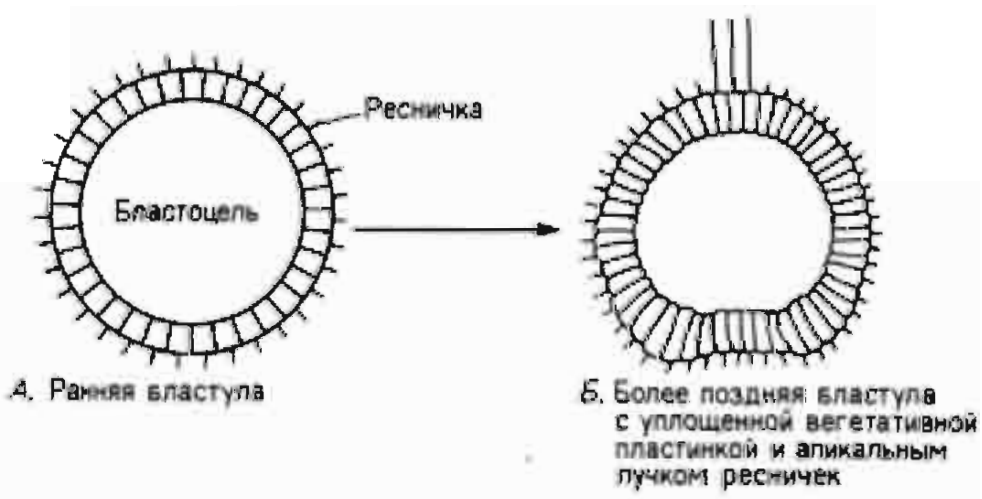


Рис. 3.7. Бластула морского ежа. *А*. Ранняя бластула морского ежа образована одним слоем клеток, имеющих округлую форму в окружающих обширный бластоцель. *Б*. По мере продолжения клеточных делений в форме клеток бластулы появляются различия: клетки в области вегетативной пластинки удлиняются. (По Giudice, 1973.)

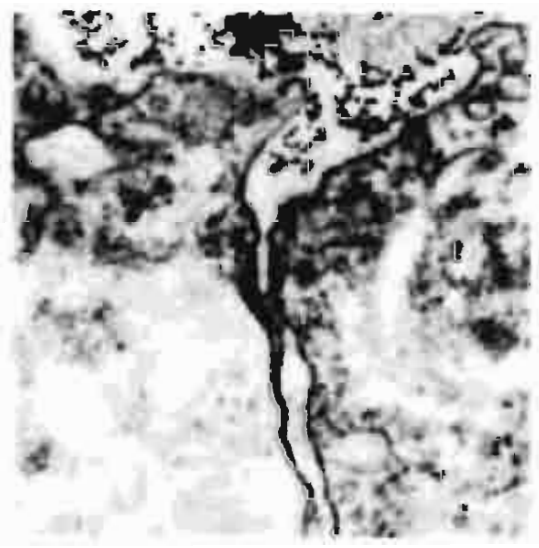


Рис. 3.8. Область контакта двух соприкасающихся клеток в 1024-клеточной бластуле морской звезды. Между плазматическими мембранами обеих клеток в области таких контактов не имеется свободного пространства; это так называемый плотный (замыкающий) контакт. (Из Dan-Sohkawa, Fujisawa, 1980; фотография с любезного разрешения авторов.)



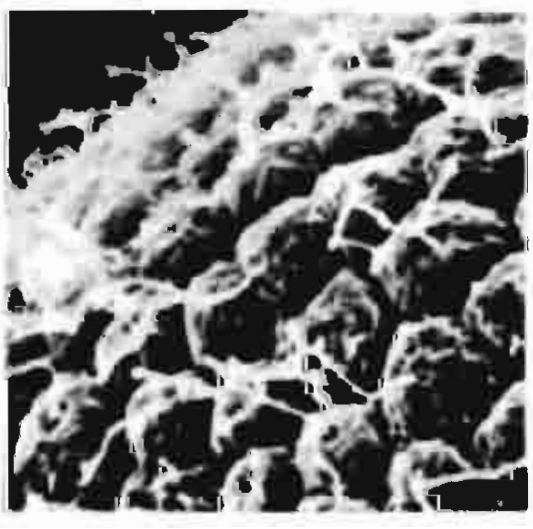


Рис. 3.9. Клетки бластулы, имеющие ресничку. Каждая клетка обладает одной ресничкой. (Фотографии с любезного разрешения W. J. Humphreys.)

этих клеток никогда не бывает направлено в сторону бластоцеля; такая ориентация клеточной популяции в одной плоскости способствует ее дальнейшему распространению вширь. Согласно другому предположению (Wolpert, Gustafson, 1961; Wolpert, Mercer, 1963), давление жидкости бластоцеля не является необходимым условием получения наблюдаемого эффекта. Авторы этой гипотезы придают особое значение разной адгезивности клеток по отношению друг к другу и к гиалиновому слою. Предполагается, что, пока клетки остаются прочно связанными с гиалиновым слоем, единственной возможностью для них остается расширение поверхности клеточного пласта. Формирование бластулы является скорее следствием этой экспансии, чем какого-либо другого процесса.

На наружной поверхности клеток бластулы образуются реснички (рис. 3.9), что позволяет бластуле вращаться внутри оболочки оплодотворения. Вскоре клетки секретируют **фермент вылупления**, который переваривает оболочку. Зародыш вылупляется и становится свободноплавающей бластулой.

Амфибии

Дробление у зародышей большинства бесхвостых и хвостатых амфибий радиально-симметричное и голобластическое, как у иглокожих. Однако яйцо амфибий содержит гораздо больше желтка. Этот желток, сосредоточенный в вегетативном полушарии, затрудняет дробление. Так, первое деление начинается на анимальном полюсе и медленно распространяется вниз на вегетативную область (рис. 3.10). У хвостатой амфибии аксолотля борозда дробления распространяется в анимальной области со скоростью, близкой к 1 мм/мин. Ниже области серого серпа скорость ее распространения снижается и при приближении к вегетативному полюсу достигает 0,02—0,03 мм/мин (Hara, 1977).

На рис. 3.11, *А* представлена микрофотография яйца лягушки на стадии первого деления дробления, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Можно видеть складки в борозде дробления и различия между бороздами в анимальном и вегетативном полушариях. В то время, когда борозда первого деления дробления еще не завершила разделения богатой желтком цитоплазмы вегетативного полушария, борозды второго деления уже закладываются вблизи от анимального полюса. Борозды этого деления располагаются под прямыми углами к первой борозде и ложатся, так же, как и она, меридионально (рис. 3.11, *Б*). Третье деление, как это можно было ожидать, бывает экваториальным. Однако из-за большой концентрации желтка в вегетативной области борозды третьего деления дробления располагаются значительно ближе к анимальному полюсу. Они разделяют зародыш лягушки на четыре анимальных бластомера меньшего размера и четыре более крупных бластомера в вегетативной области (рис. 3.11, *В*). В результате этого **неравного голобластического деления** возникают область быстро делящихся бластомеров вблизи анимального полюса и область более медленно делящихся бластомеров. На последующих стадиях

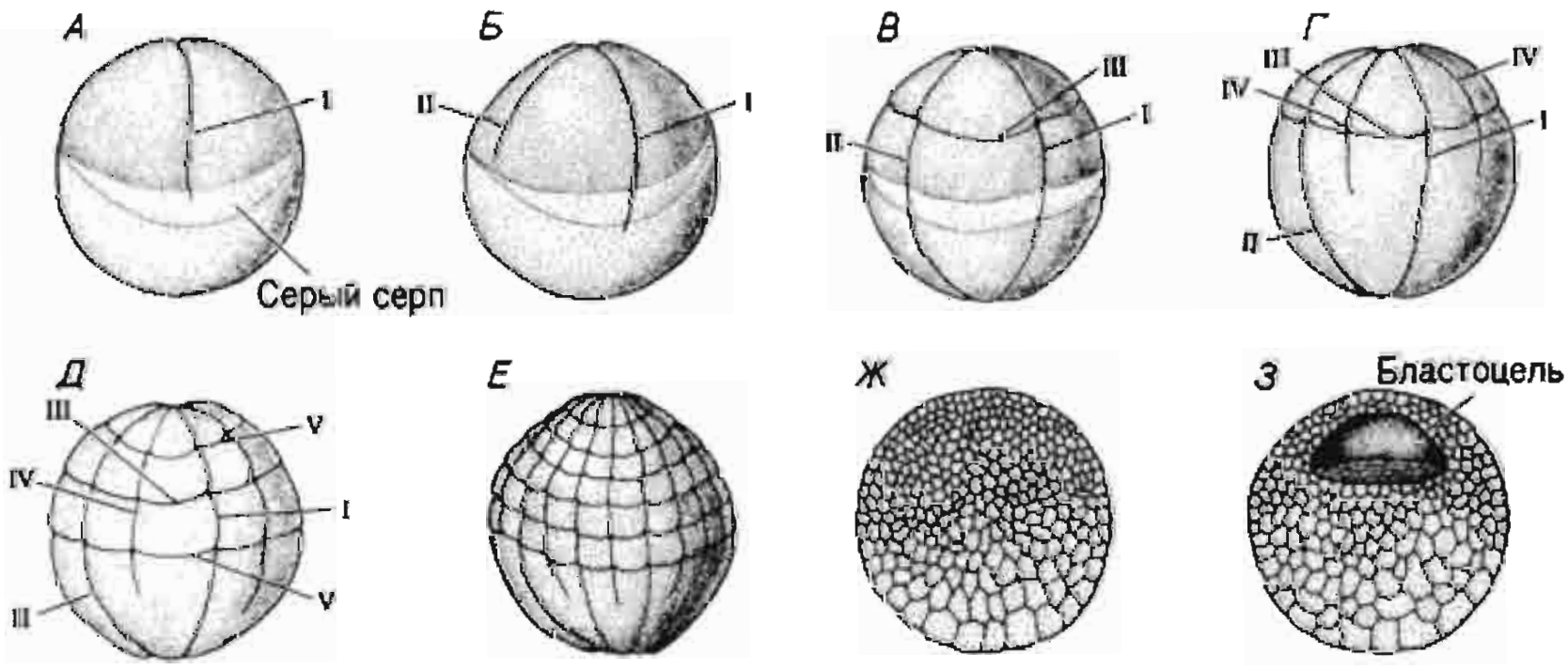


Рис. 3.10. Дробление яйца лягушки. Борозды дробления обозначены римскими цифрами в порядке их появления. *Б*. Желток, сконцентрированный в вегетативном полушарии, затрудняет дробление; поэтому второе деление дробления начинается в анимальной области яйца раньше, чем первая борозда разделит цитоплазму вегетативной области. *В*. Борозды третьего деления смещены в направлении анимального полюса. *Г—Ж*. После ряда последовательных делений в анимальном полушарии образуется большое число мелких бластомеров, а в вегетативном полушарии — меньшее число более крупных бластомеров. *З*. Поперечный разрез бластулы. (По Carlson, 1981.)

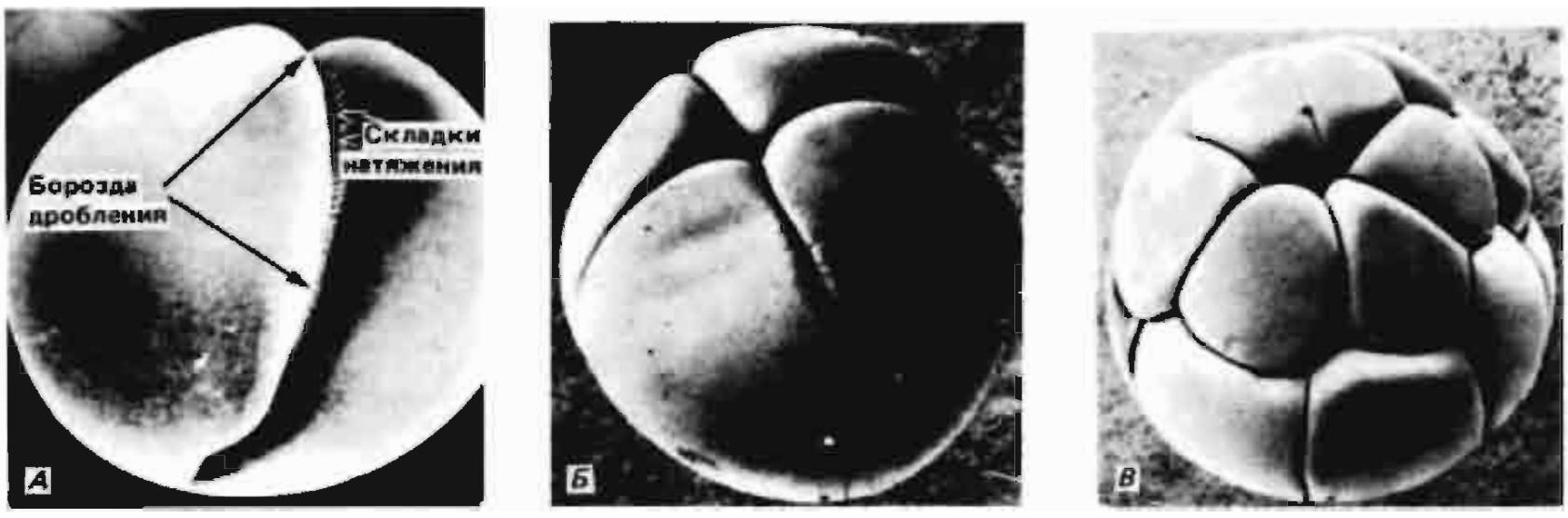


Рис. 3.11. Микрофотографии дробящегося яйца лягушки, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. Первое (*А*), второе (*Б*) и четвертое (*В*) деления дробления. На последней фотографии (стадия 16 клеток) отчетливо видны различия в размерах анимальных и вегетативных клеток, возникших при третьем делении. (*А* — из Beams, Kessel, 1976; *Б*, *В* — из L. Biedler; фотографии с любезного разрешения авторов.)

дробления анимальная область содержит многочисленные мелкие клетки, тогда как в вегетативной области имеется лишь относительно небольшое число крупных богатых желтком бластомеров (рис. 3.10).

Зародыш амфибий, содержащий от 16 до 64 клеток, обычно называют **морулой** (от латинского названия тутовой ягоды, на которую он отдаленно похож). На 128-клеточной стадии появляется хорошо различимый бластоцель, и принято считать, что в это время зародыш достиг стадии бластулы. На самом деле образование бластоцеля прослеживается с самого первого деления дробления. Показано (Kalt, 1971), что у *Xenopus laevis* первая борозда дробления в анимальном полушарии образует расширение, причем между бластомерами возникает маленькая полость, изолированная от наружной среды плотными межклеточными контактами (рис. 3.12). Эта полость при последующих делениях расширяется и преобразуется в бластоцель.

Бластоцель, вероятно, выполняет две основные функции. Во-первых, он представляет собой полость, которая дает возможность клеткам при гаструляции мигрировать внутрь зародыша. Во-вторых, существование бластоцеля предотвращает преждевременное взаимодействие между клетками, которые находятся выше и ниже его. Когда Ньюкуп (Nieuwkoop, 1973) брал у зародыша тритона клетки из крыши бластоцеля и помещал их вблизи богатых желтком вегетативных клеток дна бластоцеля, то из

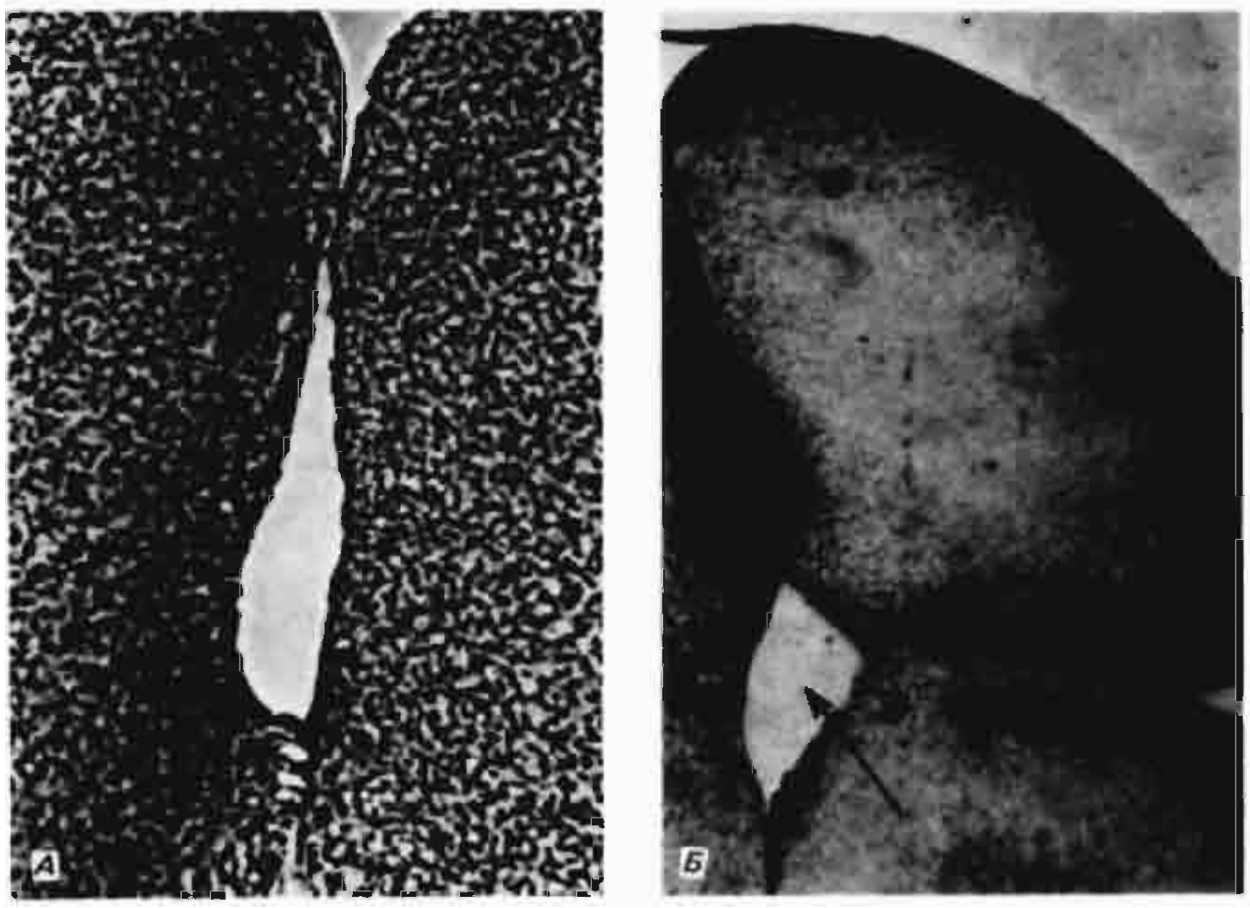


Рис. 3.12. Образование бластоцеля в яйце лягушки. *А*. Плоскость первого деления дробления; видно небольшое расширение, которое позднее превратится в бластоцель. *Б*. 8-клеточный зародыш с бластоцелем небольших размеров (указан стрелкой) в месте пересечения трех плоскостей дробления. (Из Kalt, 1971; фотографии с любезного разрешения M. R. Kalt.)

этих анимальных клеток развивались не производные эктодермы, а мезодермальная ткань. Поскольку в норме мезодерму образуют анимальные клетки, которые прилежат к предшественникам энтодермы, предетавляется вероятным, что вегетативные бластомеры оказывают влияние на прилежащие клетки, побуждая их дифференцироваться в мезодермальные ткани (см. гл. 4). Таким образом, наличие бластоцеля обеспечивает сохранение клетками, предназначенными для образования покровного эпителия и нервной системы, своих исходных свойств.

Спиральное голобластическое дробление

Спиральное дробление характерно для нескольких групп червей (кольчатых, турбеллярий, немертин) и всех моллюсков, за исключением головоногих. Оно во многих отношениях отличается от радиального дробления. Во-первых, яйца не делятся параллельно или перпендикулярно анимально-вегетативной оси. Плоскости делений дробления ориентированы наклонно, что приводит к «спиральному» расположению дочерних бластомеров. Во-вторых, число контактов между клетками больше, чем при радиальном дроблении. Фактически они принимают расположение, наиболее стабильное в термодинамическом отношении, подобное расположению контактирующих мыльных пузырьков (рис. 3.13). В-третьих, зародыши со спиральным типом дробления проходят меньше делений до начала гаструляции. Это позволило проследить судьбу каждой отдельной клетки бластулы. Когда сопоставили судьбы отдельных клеток зародышей кольчатых червей, плоских червей и моллюсков, то оказалось, что у клеток, занимающих одно и то же положение, судьба в принципе одинакова (Wilson, 1898). Возникающие таким образом бластулы не имеют бластоцеля и носят название **стерробластул**.

На рис. 3.14 и 3.15 показано дробление зародыша моллюска. Первые два деления почти меридиональны и приводят к образованию четырех крупных макромеров (обозначенных A, B, C и D). У многих видов эти бластомеры различаются по своим размерам (причем D бывает самым крупным) — это позволяет идентифицировать отдельные бластомеры. При последующих делениях каждый макромер на своем анимальном полюсе отделяет маленький микромер. Каждый последовательно появляющийся квартет микромеров смещается вправо или влево относительно сестринских макромеров, что приводит к характерному для данного типа дробления расположению бластомеров по спирали. Если смотреть на зародыш со стороны анимального полюса, то можно видеть, что верхние концы митотических веретен бывают наклонены поочередно то по часовой стрелке, то против нее. В результате микромеры оказываются смещенными по отношению к отделяющим их макромерам то влево, то вправо. При третьем делении макромер A дает две дочерние клетки — макромер 1A и микромер 1a. Бластомеры B, C и D ведут себя сходным образом, формируя первый квартет микромеров. Если на этой стадии смотреть на дробящееся яйца со стороны анимального полюса, то у большинства видов микромеры оказываются смещенными вправо по отношению к отделившим их макромерам (дексиотропная спираль) в противоположность леотропной спирали при их смещении влево. При четвертом делении макромер 1A делится на макромер 2A и микромер 2a, а микромер 1a — на два микромера, $1a^1$ и $1a^2$. При последующем делении макромер 2A дает бластомеры 3A и 3a, а такие микромеры, как $1a^2$, дает клетки $1a^{21}$ и $1a^{22}$.

Смещение плоскости дробления влево или вправо контролируется цитоплазматическими факторами. Это было установлено путем изучения мутаций закручивания раковин у улиток. У некоторых улиток устье, которым открывается спираль раковины, находится с правой стороны от ее завитка, тогда как у других устье располагается слева. Обычно направление закручивания бывает одинаковым у всех особей данного вида. Однако иногда встречаются мутанты. Например, среди представителей видов с устьем, расположенным справа, встречаются особи, у которых оно расположено слева. Результаты

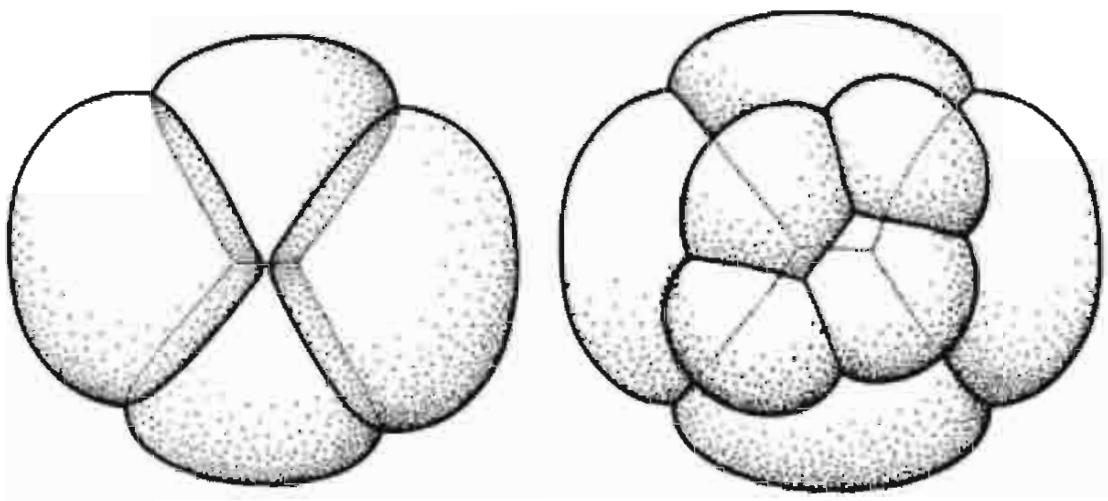


Рис. 3.13. Схематический рисунок, показывающий расположение четырех и восьми мыльных пузырьков в широком сосуде со слегка вогнутым дном. В соответствии с законами термодинамики пузырьки располагаются так, что площадь контакта между ними оказывается максимальной; такая картина очень напоминает картину спирального дробления зародышей.

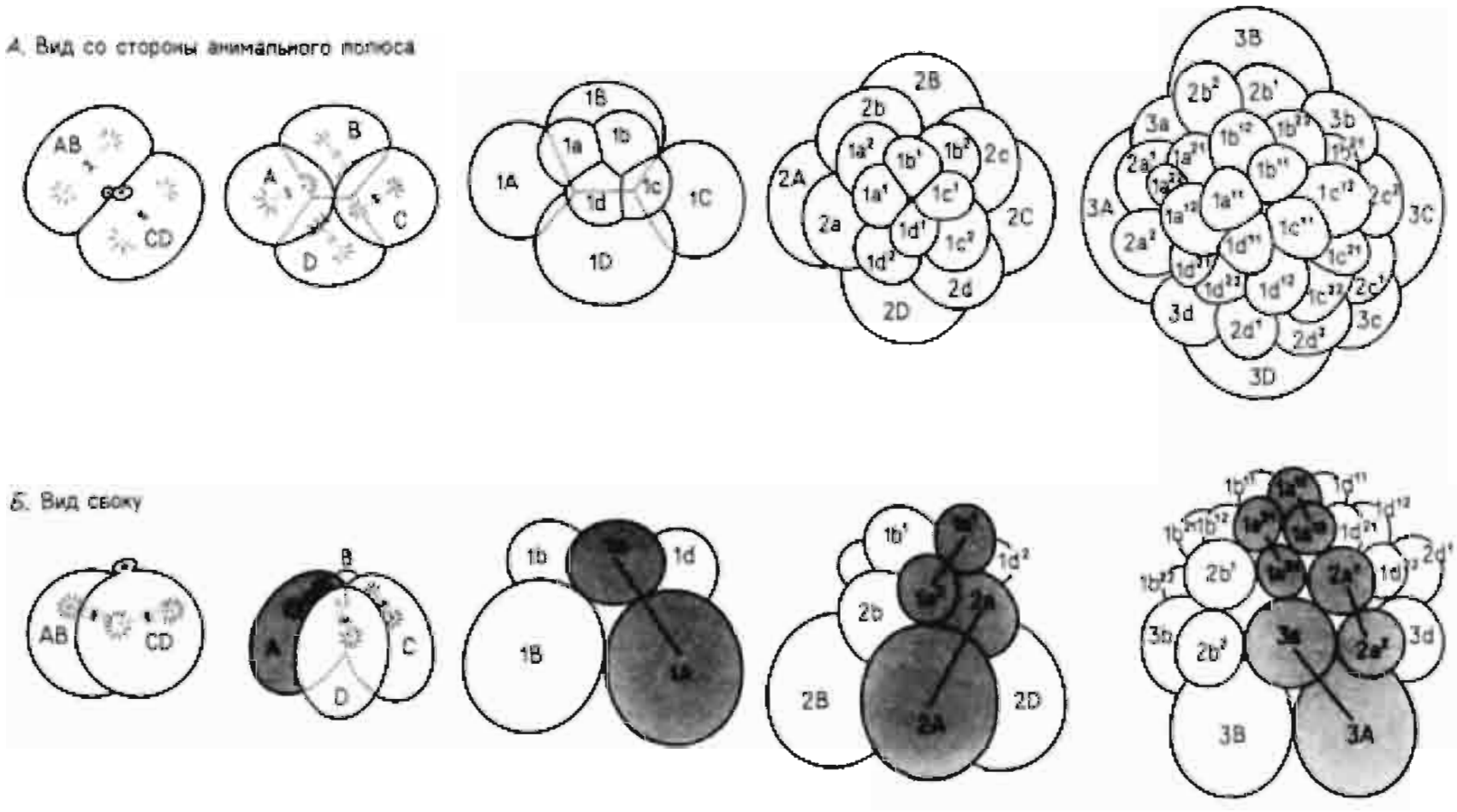


Рис. 3.14. Спиральное дробление у *Trochus* (*А* — вид со стороны анимального полюса; *Б* — вид сбоку). На рис. *Б* клетки — потомки бластомера А — выделены серым цветом. Митотические веретена, изображенные на ранних стадиях, разделяют клетки на неравные части и под углом к вертикальной и горизонтальной осям.

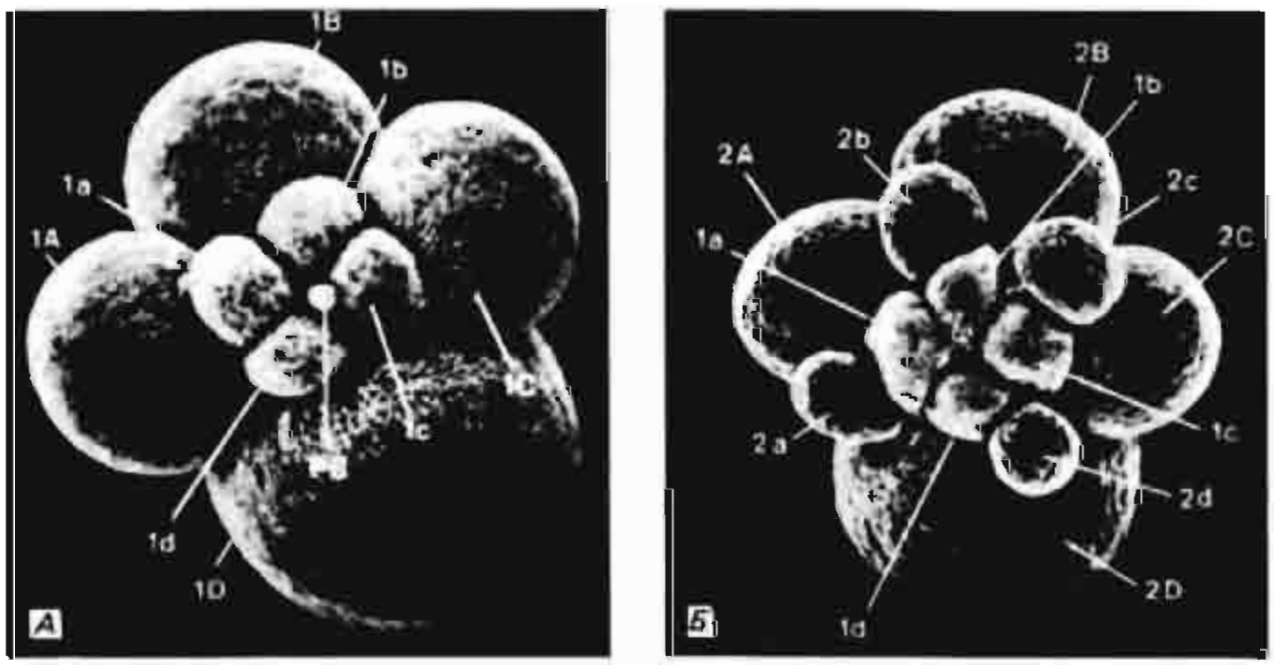


Рис. 3.15. Спиральное дробление яйца улитки *Ilyanassa*. Бластомер D больше остальных, что позволяет идентифицировать каждую клетку. Дробление дексиотропное. *А*. 8-клеточная стадия. *Б*. Стадия незавершенного четвертого деления, на которой макромеры уже разделились на крупные и мелкие спирально расположенные клетки. (Из Craig, Morrill, 1986; фотографии с любезного разрешения авторов.)

изучения зародышей таких улиток с уклоняющимся строением (Crampton, 1894) показали, что процесс дробления у них отличается от нормального. Положение клеток после второго деления дробления было у них иным (рис. 3.16). Это являлось следствием другой ориентации митотического аппарата у левозакрученных (леотропных) улиток. Все последующие деления леотропных зародышей были зеркальным отражением картин, наблюдающихся у дексиотропных зародышей. На рис. 3.16 можно видеть, что положение бластомера 4d (который играет важную роль, поскольку его потомки образуют мезодермальные органы) различно у зародышей с разным направлением спирализации. В конечном счете формируются две улитки, тела которых располагаются по разные стороны от устья.

Направление закручивания раковины улиток контролируется одной парой генов (Sturtevant, 1923; Boycott et al., 1930). У улитки *Limnaea peregra* большинство особей дексиотропные. Изредка встречающиеся леотропные мутанты были скрещены с улитками дикого типа. Эти скрещивания показали, что

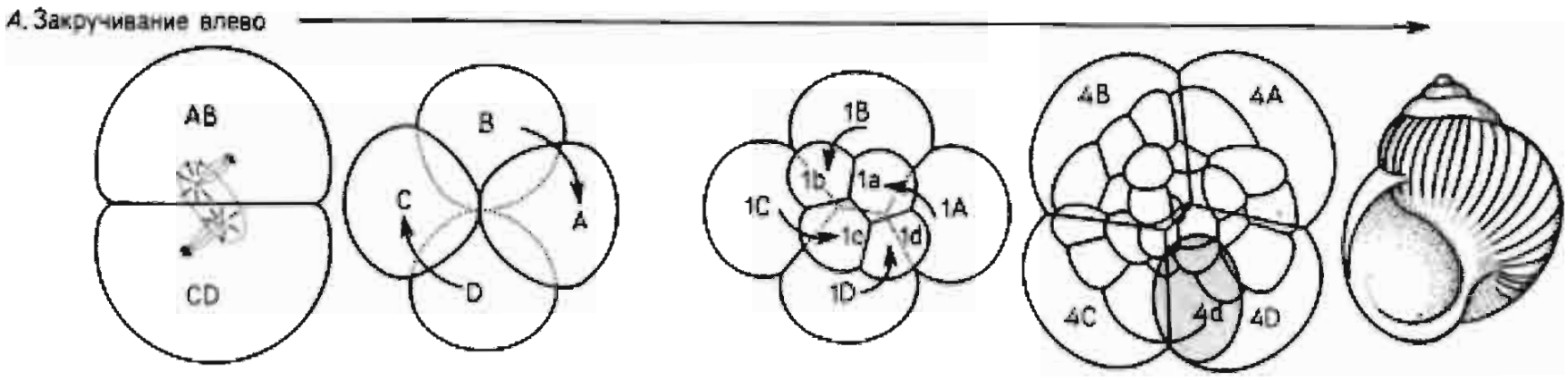


Рис. 3.16. Правозакрученная и левозакрученная улитки (вид со стороны анимального полюса). Направление закручивания раковины направо или налево может быть определено по ориентации митотического веретена на стадии второго деления. Левозакрученная (*А*) и правозакрученная (*Б*) улитки развиваются как зеркальное отражение одна другой. (По Morgan, 1927.)

имеется «правовращающий» аллель (*D*), доминантный по отношению к «левовращающему» (*d*). Однако направление смещения бластомеров при дроблении определяется не генотипом развивающейся улитки, а генотипом ее матери. Самка улитки *dd* может производить только левозакрученных потомков, даже если они имеют генотип *Dd*. Таким образом, особь *Dd* будет леотропной или дексиотропной в зависимости от материнского генома.

Скрещивания дают следующие результаты:

DD (самка)	×	*dd* (самец)	→ *Dd* (все правозакрученные)
DD (самец)	×	*dd* (самка)	→ *Dd* (все левозакрученные)
Dd	×	*Dd*	→ 1*DD* : 2*Dd* : 1*dd* (все правозакрученные)

Приведенные данные свидетельствуют о том, что генетические факторы, обусловливающие направление закручивания раковины у улиток, передаются зародышу через цитоплазму ооцита. Направление смещения бластомеров при дроблении определяется генотипом яичника, в котором развивается ооцит. Если в яйца матерей *dd* инъецировали небольшое количество цитоплазмы от дексиотропных улиток (Freeman, Lundelius, 1982), то развивавшиеся зародыши оказывались правозакрученными. Цитоплазма от леотропных улиток не влияла на дексиотропных зародышей. Это подтверждает представление, согласно которому матери дикого типа передают яйцам какой-то фактор, который у матерей *dd* отсутствует или дефектен.

Дополнительные сведения и гипотезы

Адаптация путем изменения процесса дробления зародыша

Эволюция осуществляется в результате наследственных изменений эмбрионального развития. (Когда мы говорим, что современная трехпалая лошадь произошла от пятипалого предка, мы имеем в виду, что в ходе эволюции лошади процесс закладки костей у зародыша претерпел изменения, и это привело к возникновению трехпалого организма.) Иногда мы можем установить, какая именно моди-

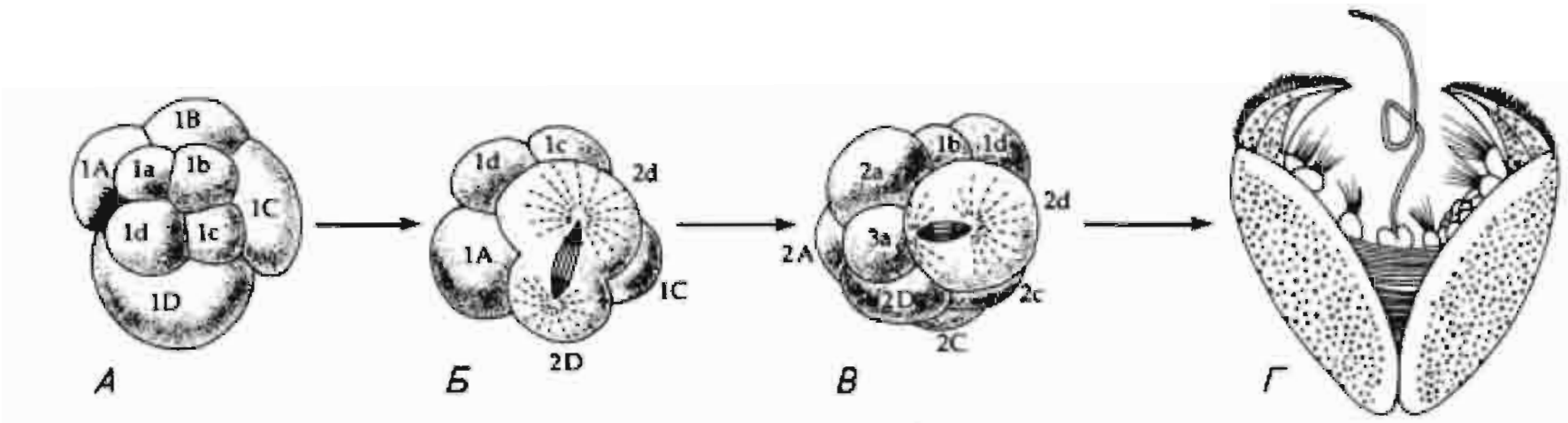


Рис. 3.17. Образование личинки моллюсков глохидия путем модификации спирального дробления. После того как сформировался 8-клеточный зародыш (*А*), положение митотического веретена приводит к тому, что бо́льшая часть цитоплазмы бластомера 1D попадает в бластомер 2d (*Б*). Крупный бластомер 2d делится (*В*) и в конечном счете образует массивную раковину личинки, построенную по типу «медвежьего капкана» (*Г*).

фикация морфогенеза позволила особи выжить в условиях, которые, не произойди такое изменение, были бы для нее крайне неблагоприятными. Одна из модификаций такого рода, открытая Фрэнком Лилли (Lillie, 1898), заключается в изменении типичного хода спирального дробления в семействе двустворчатых моллюсков Unionidae.

В отличие от большинства двустворчатых моллюсков *Unio* и родственные формы живут в реках с быстрым течением. Такие условия обитания обычно создают проблему расселения личинок: поскольку взрослые особи ведут оседлый образ жизни, свободноплавающие личинки должны были бы всегда сноситься течением вниз. Эти моллюски, однако, решили проблему расселения, осуществив два изменения в своем развитии. Первое из них касается дробления зародыша. При типичном для моллюсков дроблении либо все макромеры имеют одинаковые размеры, либо бластомер 2D является самой крупной клеткой на стадии 16 бластомеров. Однако в процессе дробления яиц *Unio* при переходе к этой стадии наибольшее количество цитоплазмы получает бластомер 2d (рис. 3.17). Эта клетка делится, и ее потомки образуют бо́льшую часть структур личинки, в том числе железу, способную образовать массивную раковину. Такая личинка (называемая **глохидием**) напоминает медвежий капкан в миниатюре. Глохидии имеют чувствительные волоски, которые вызывают захлопывание створок раковины, как только они прикоснутся к жабрам или плавникам проплывающей мимо рыбы. Глохидии занимаются «хич-хайкингом» (от англ. hitch-hike — путешествовать бесплатно на попутных машинах) с помощью рыбы, пока не достигнут стадии, на которой они готовы отделиться и метаморфизировать во взрослых моллюсков. Таким способом они могут расселяться вверх по течению.

У некоторых видов глохидии высвобождаются из выводковой камеры самки и просто ожидают, чтобы рыба подплыла близко к ним. Некоторые другие виды, как, например, *Lampsilis ventricola*, повысили вероятность встречи личинок с рыбой, осуществив еще одну модификацию развития (Welsh, 1969). У многих моллюсков развивается тонкая мантия, которая колышется около раковины и окружает выводковую камеру (marsupium). У некоторых унионид форма выводковой камеры и волнообразные движения мантии создают впечатление плывущей рыбы. Чтобы сделать иллюзию более полной, у них развивается черное «пятно-глаз» на одном конце и выступающий «хвост» на другом. «Рыба», которую мы видим на рис. 3.18, на самом деле не рыба, а выводковая ка-



Рис. 3.18. Имитация «рыбы» у двустворчатого моллюска из семейства Unionidae *Lampsilis ventricosa*. На самом деле «рыба» является выводковой камерой и мантией моллюска. (Фотография с любезного разрешения J. H. Welsh.)

мера и мантия моллюска, находящегося внизу. Когда соблазненная видом «добычи» хищная рыба подплывает достаточно близко, моллюск выбрасывает глохидии из выводковой камеры.

Изменив таким образом ход развития, моллюски из семейства Unionidae сумели выжить в условиях, которые без таких модификаций были бы для них неблагоприятными.

При изучении дробления у моллюсков было сделано еще одно интереснейшее открытие, а именно что некоторые бластомеры сообщаются между собой. У моллюсков, имеющих на 4-клеточной стадии бластомеры одинаковых размеров, определение того, какой из них даст начало клетке-предшественнице мезодермы, происходит между пятым и шестым делениями. В это время макромер 3D образует направленное внутрь выпячивание, которое приходит в контакт с микромерами анимального полюса. Без такого контакта бластомер 4d, отделяемый макромером 3D, не образует мезодермы (Biggelaar, Guerrier, 1979)[1]. Де Лаат и др. (de Laat et al., 1980) показали, что в то время, когда осуществляется контакт (но не раньше), между макромером 3D и центральными микромерами может происходить обмен молекулами небольших размеров. Эти исследователи инъецировали в один из макромеров краситель люцифер желтый (молекулярная масса 457). При введении красителя до 32-клеточной стадии он остается в этом единственном макромере и его потомках. Однако при инъекции красителя в бластомер 3D в начале 32-клеточной стадии в желтый цвет окрашивается первый квартет микромеров (рис. 3.19). Низкомолекулярное вещество передается от одной клетки к другой именно в то время, когда микромеры изменяют проспективные потенции бластомера 3D. Исследование с помощью просвечивающего электронного микроскопа показывает, что в это время на поверхности клеток появляются **щелевые контакты**. Такие изменения плазматической мембраны облегчают межклеточный обмен небольшими молекулами и ионами, и они встречаются во многих тканях как зародышей, так и взрослых организмов. (Ультраструктура этих контактов будет рассмотрена в гл. 15.)

[1] Не думайте, что мы забыли о зародышах моллюсков, у которых на 4-клеточной стадии бластомеры различаются по размерам. Им будет уделено достаточно внимания в гл. 7.

Билатеральное голобластическое дробление

Билатеральное голобластическое дробление встречается главным образом у асцидий (оболочники). На рис. 3.20 представлены стадии дробления у асцидии *Styela partita*. Наиболее замечательная особенность этого типа дробления заключается в том, что плоскость первого деления устанавливает единственную плоскость симметрии зародыша. Каждое последующее деление ориентируется по отношению к этой плоскости симметрии, так что половина зародыша по одну сторону от первой борозды представляет собой зеркальное отражение половины зародыша по другую ее сторону. Второе деление так же, как и первое, меридиональное, но в отличие от

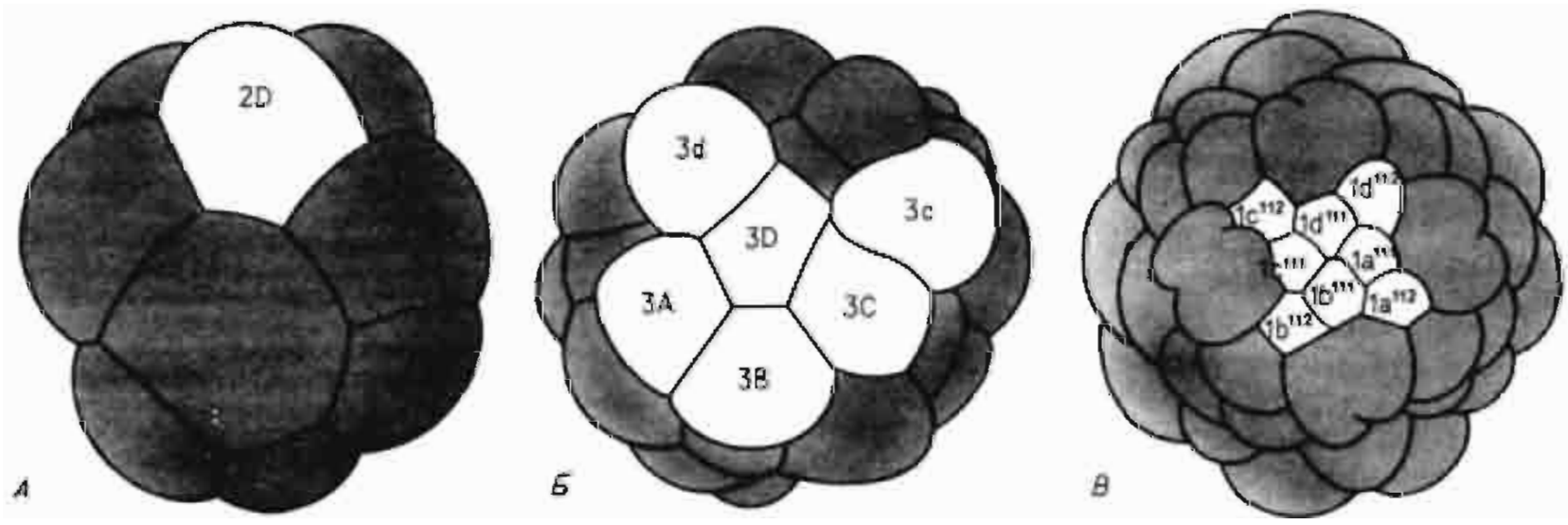


Рис. 3.19. Межклеточные связи при дроблении у моллюсков. На схематических рисунках показано, насколько широко распространяется краситель люцифер желтый (белая область) после инъекции в определенные макромеры у *Patella vulgata*. *А*. Положение метки через 20 мин после инъекции в 2D-макромер 16-клеточного зародыша свидетельствует о том, что краситель не переходит в соседние клетки. *Б*. Вид 32-клеточного зародыша с вегетативной стороны после инъекции красителя в 3D макромер; видно, что краситель перешел в соседние клетки (за исключением $2d^{22}$). *В*. Вид того же зародыша со стороны анимального полюса приблизительно через 45 мин после инъекции; краситель перешел из макромера 3D в центральную группу анимальных микромеров. (По de Laat et al., 1980.)

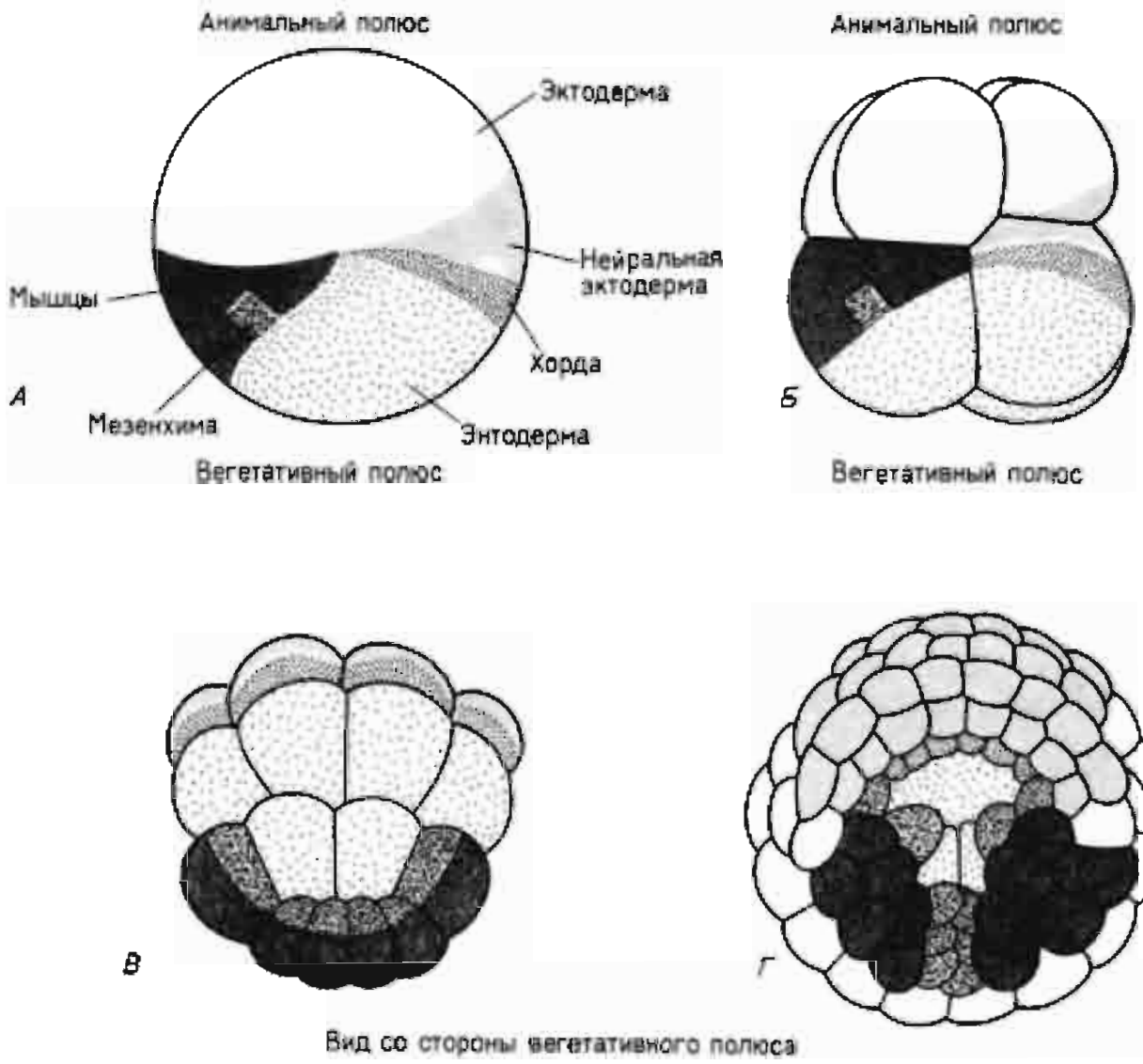


Рис. 3.20. Билатеральная симметрия яйца оболочника. *А*. Недробящееся яйцо. *Б*. 8-клеточный зародыш; изображены бластомеры и указана судьба различных клеток. Этот зародыш можно рассматривать как две 4-клеточные половины; начиная с этой стадии, каждое деление на правой стороне зародыша имеет зеркальное отражение слева. *В, Г*. Зародыши на более поздних стадиях (вид со стороны вегетативного полюса). (Области цитоплазмы, предназначенные для формирования отдельных органов, на всех рисунках обозначены одинаково.) (По Balinsky, 1981.)

первого борозды не проходят через центр яйца. В результате этого деления возникают две крупные передние клетки (A и D) и две задние меньшего размера (B и C). На каждой стороне теперь имеются один крупный и один небольшой бластомер. При трех последующих делениях различия в размерах и форме бластомеров подчеркивают билатеральную симметрию зародышей. На 32-клеточной стадии формируется небольшой бластоцель, и начинается гаструляция.

Как указывалось в предыдущей главе, у некоторых оболочников, как, например, у *S. partita*, в яйце имеются окрашенные области цитоплазмы. Эти окрашенные области распределены в соответствии с билатеральной симметрией зародыша по обе стороны от плоскости симметрии. При дроблении они распределяются между разными клетками. Существенно, что тип цитоплазмы, который получают клетки, предопределяет их окончательную судьбу. Клетки, в которые попадает светлая цитоплазма, образуют эктодерму; те, которые получают желтую цитоплазму, дают начало мезодермальным клеткам; клетки с серо-голубыми включениями становятся эктодермой, а с материалом светло-серого серпа образуют первую трубку и хорду.

Чередующееся (rotational) голобластическое дробление

Неудивительно, что труднее всего изучать дробление у млекопитающих. Яйца млекопитающих относятся к числу самых мелких в животном царстве, что делает затруднительной экспериментальную работу с ними. Диаметр зиготы человека, например, составляет всего лишь 100 мкм, и ее объем меньше одной тысячной объема яйца шпорцевой лягушки. Кроме того, по количеству зигот, которые могут быть получены от одной особи, млекопитающие несравнимы с морскими ежами или лягушками. Обычно у самки млекопитающего одновременно овулирует менее 10 яиц, так что получить достаточное количество материала для биохимических исследований весьма затруднительно. И последняя трудность заключается в том, что развитие млекопитающих происходит в организме матери, а не во внешней среде. Только недавно появилась возможность воспроизводить некоторые из условий, имеющихся в организме, и наблюдать за развитием зародыша in vitro.

Преодоление всех этих трудностей для изучения дробления млекопитающих было оправданно, так как оказалось, что этот процесс резко отличается от того, как делится большинство эмбриональных кле-

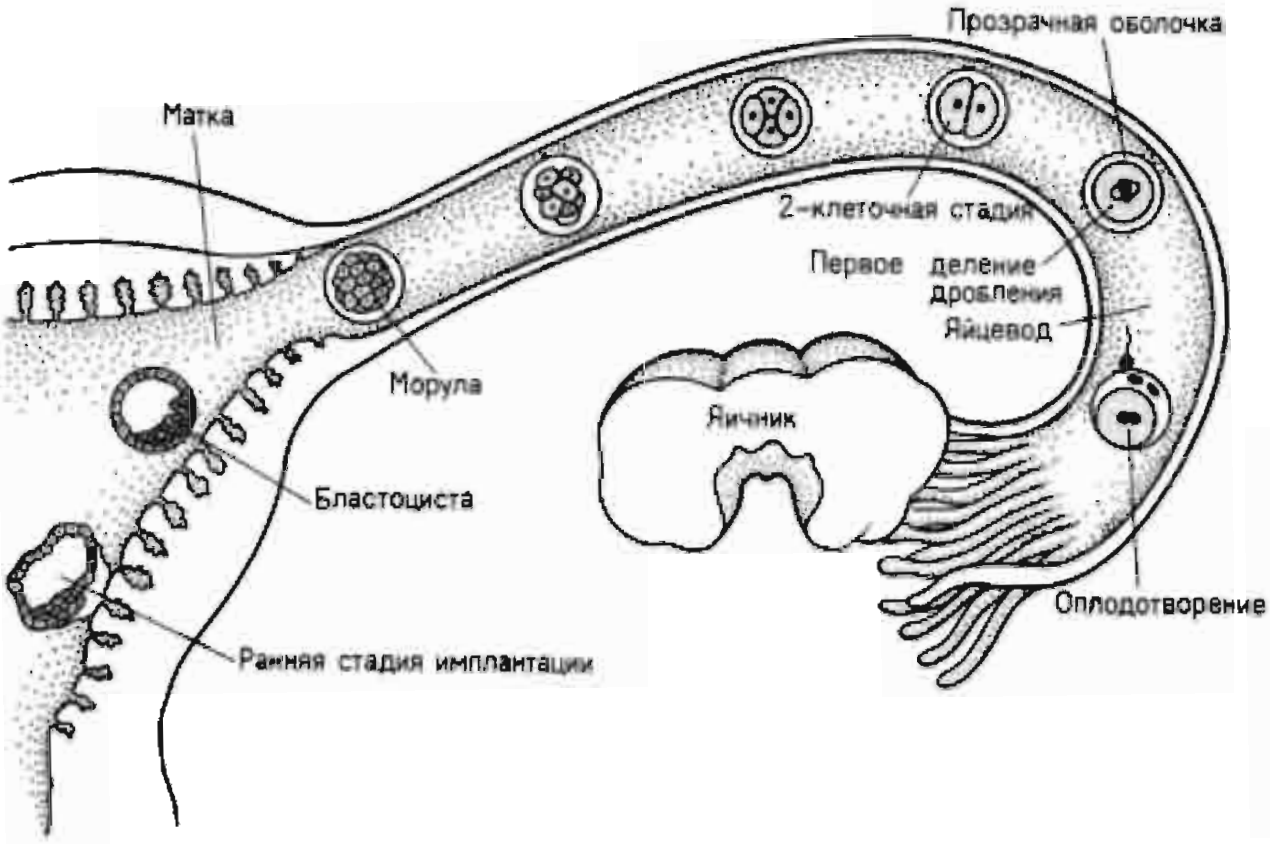


Рис. 3.21. Развитие зародыша человека от оплодотворения до имплантации. Яйцо освобождается от прозрачной оболочки (zona pellucida) по достижении матки. Эта оболочка, вероятно, предотвращает прилипание делящихся клеток к стенке яйцевода, и не тормозит продвижение зародыша к матке. (По Tuchmann-Duplessis et al., 1972.)

ток. Ооцит млекопитающих, высвобождаясь из яичника, попадает в яйцевод (рис. 3.21). Оплодотворение происходит в ампуле яйцевода — его отделе, расположенном вблизи яичника. В это время мейоз завершается, и приблизительно через сутки начинается первое деление дробления.

Деления дробления у млекопитающих относятся к числу самых медленных, встречающихся в животном царстве. Каждое из них продолжается от 12 до 24 ч. Тем временем ресички слизистой яйцевода продвигают зародыш по направлению к матке; первые деления происходят в время перемещения яйца по яйцеводу.

Дробление у млекопитающих отличается от других типов дробления по многим признакам. Первая его особенность заключается в относительно медленном темпе делений. Второе важное отличие состоит в своеобразном расположении бластомеров относительно друг друга. Первое деление представляет собой нормальное меридиональное деление; однако при втором делении один из двух бластомеров делится меридионально, а второй — экваториально (рис. 3.22). Этот тип дробления был назван **чередующимся** (rotational) (Gulyas, 1975).

Третьим важным отличием дробления у млекопитающих является выраженная асинхронность раннего дробления. Бластомеры у млекопитающих не делятся все одновременно, поэтому у зародышей не происходит равномерного нарастания числа бластомеров от 2-клеточной к 4- и 8-клеточным стадиям; зародыши часто содержат нечетное число клеток.

Компактизация

Быть может, самое важное отличие дробления у млекопитающих от всех других типов дробления заключается в явлении **компактизации**. Как видно из рис. 3.23, бластомеры млекопитающего на 8-

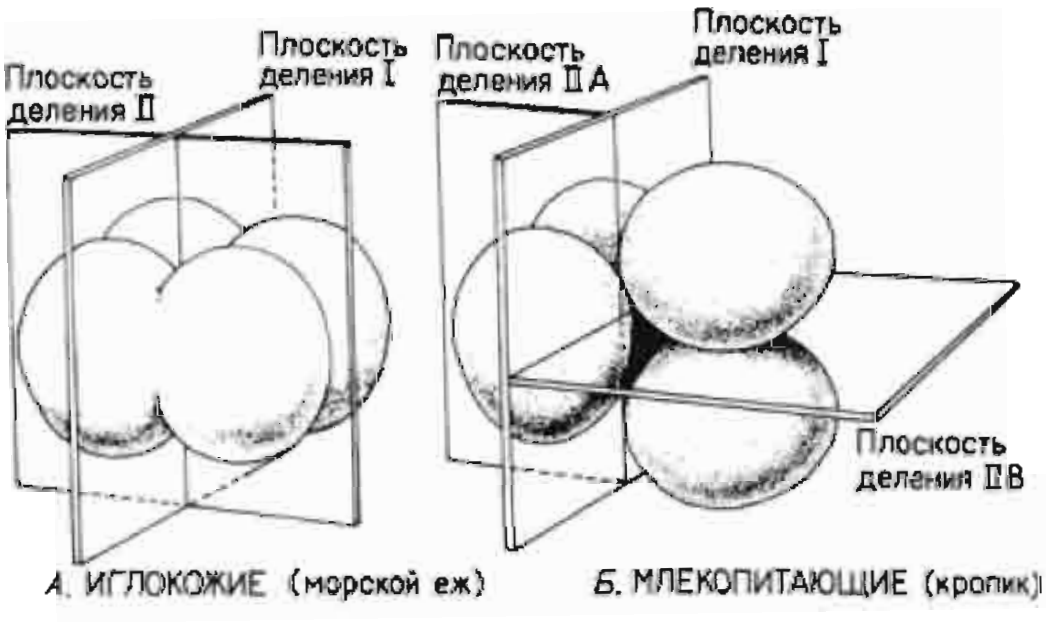


Рис. 3.22. Сравнение ранних стадий дробления у иглокожих (*А*) и млекопитающих (*Б*). (По Gulyas, 1975.)

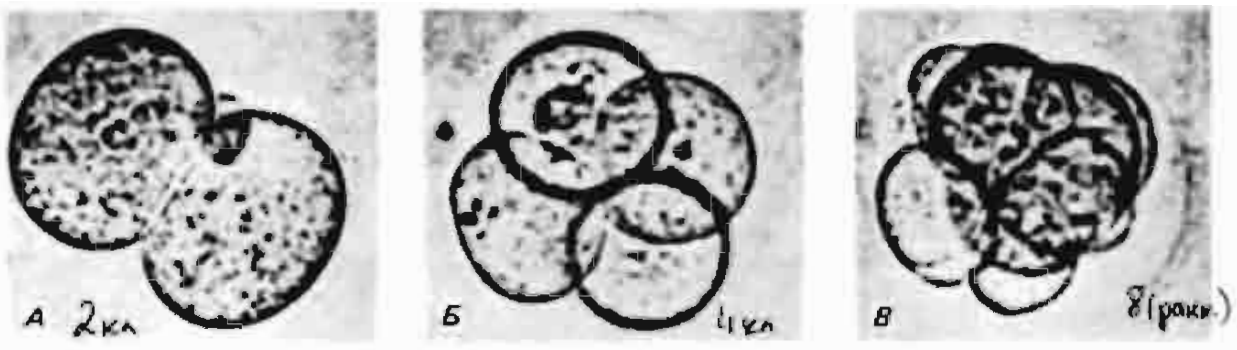


Рис. 3.23. Дробление зародыша мыши in vitro. *А* — 2-клеточная, *Б* — 4-клеточная и *В* — ранняя 8-клеточная стадии; *Г* — компактная 8-клеточная стадия; *Д* — морула; *Е* — бластоциста. (Из Mulnard, 1967; фотографии с любезного разрешения J. G. Mulnard.)

клеточной стадии располагаются рыхло, между ними остаются большие пространства. Однако после третьего деления поведение бластомеров резко изменяется. Они внезапно сближаются, площадь контакта между ними максимально увеличивается, и они образуют компактный клеточный шар (рис. 3.24). Эта тесная упаковка стабилизируется плотными контактами, которые образуются между клетками, расположенными на поверхности шара, и изолируют лежащие внутри клетки (рис. 3.25). Между клетками внутри шара возникают щелевые контакты, которые позволяют малым молекулам и ионам переходить из клетки в клетку.

Клетки компактизированного зародыша делятся и образуют 16-клеточную морулу. Такая морула состоит из небольшого числа внутренних клеток, окруженных более многочисленными наружными клетками (Barlow et al., 1972). Бóльшая часть потомков наружных клеток становится клетками **трофобласта** (или **трофэктодермы**). Эта группа клеток не образует эмбриональных структур, а превращается в хорион, участвующий в образовании плаценты. Ткани плаценты обеспечивают получение плодом кислорода и питательных веществ от матери; секретируют гормоны, необходимые для того, чтобы материнская матка продолжала вынашивать плод; синтезируют регуляторы иммунного ответа, благодаря которым мать не отторгает зародыш, как это произошло бы с пересаженным органом. Однако клетки трофобласта неспособны образовать ни одной клетки самого

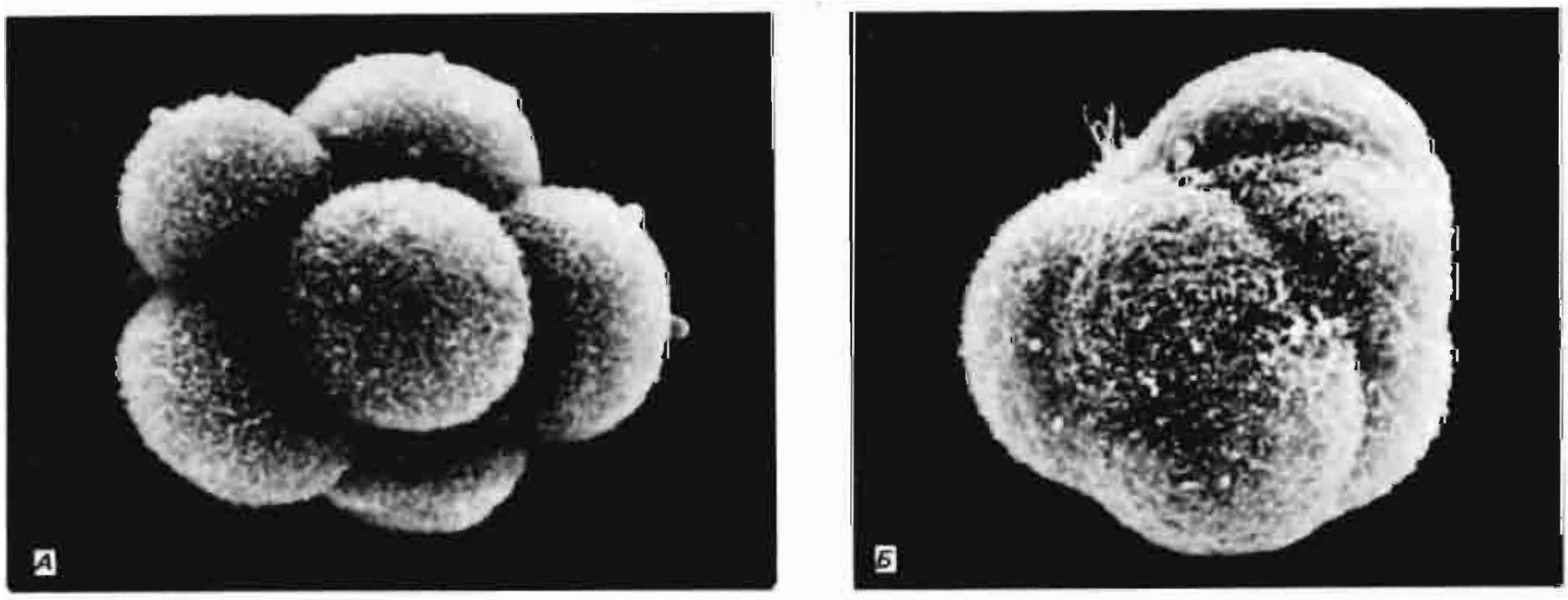


Рис. 3.24. 8-клеточный зародыш мыши до (*А*) и после (*Б*) компактизации. Микрофотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Фотографии с любезного разрешения C. Ziomek.)



Рис. 3.25. Схематический рисунок компактизации и образования бластоцисты. *А*, *Б*. 8-клеточный зародыш. *В*. Морула. *Г*. Бластоциста.

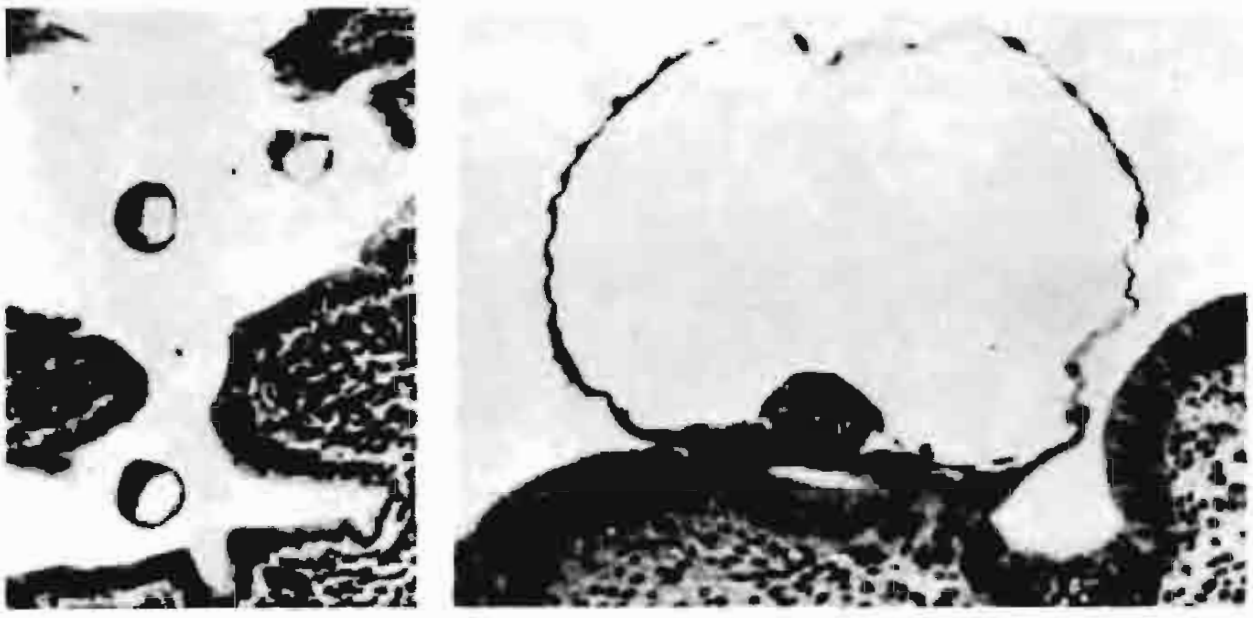


Рис. 3.26. Имплантация бластоцисты млекопитающего в матке. *А*. Бластоцисты мыши, входящие в матку. *Б*. Начальная стадия имплантации бластоцисты в стенку матки у макака-резуса. (*А* — из Rugh, 1967; *Б* — фотография Chester Reather, с любезного разрешения Института Карнеги в Вашингтоне.)

зародыша. Они необходимы для **имплантации** зародыша в стенку матки (рис. 3.26).

Зародыш формируется потомками внутренних клеток 16-клеточного зародыша, к которым иногда добавляется клетка, отделившаяся от трофобласта при переходе к 32-клеточной стадии (Pederson et al., 1986; Fleming, 1987). Эти клетки образуют **внутреннюю клеточную массу** (ВКМ), которая и дает начало зародышу. Клетки ВКМ отличаются от клеток трофобласта не только по своему виду, но и по спектру белков, которые они синтезируют на этой ранней стадии. К стадии 64 клеток внутренняя клеточная масса и клетки трофобласта превращаются в полностью сформированные клеточные слои, ни один из которых не поставляет клеток другой группе (Dyce et al., 1987). Таким образом, возникновение различий между бластомерами трофобласта и внутренней клеточной массы является первым процессом дифференцировки в развитии млекопитающих.

Первоначально морула не имеет внутренней полости. Однако в процессе так называемой **кавитации** клетки трофобласта секретируют в моруду жидкость, что приводит к образованию полости бластоцисты. Внутренняя клеточная масса располагается на одной стороне стенки полого шара, образованного клетками трофобласта (рис. 3.25 и 3.26). Эта структура называется **бластоцистой**, и ее образование является еще одной отличительной особенностью дробления млекопитающих.

Дополнительные сведения и гипотезы

Клеточная поверхность и механизм компактизации

Компактизация создает условия, обеспечивающие первый шаг в процессе дифференцировки в развитии млекопитающих, а именно отделение трофобласта от внутренней клеточной массы. Как это происходит? Появляется все больше данных о том, что компактизация связана с явлениями, происходящими на клеточных поверхностях соседних бластомеров.

Во-первых, до компактизации у каждого из восьми бластомеров наблюдаются далеко идущие изменения плазматической мембраны, известные под на-

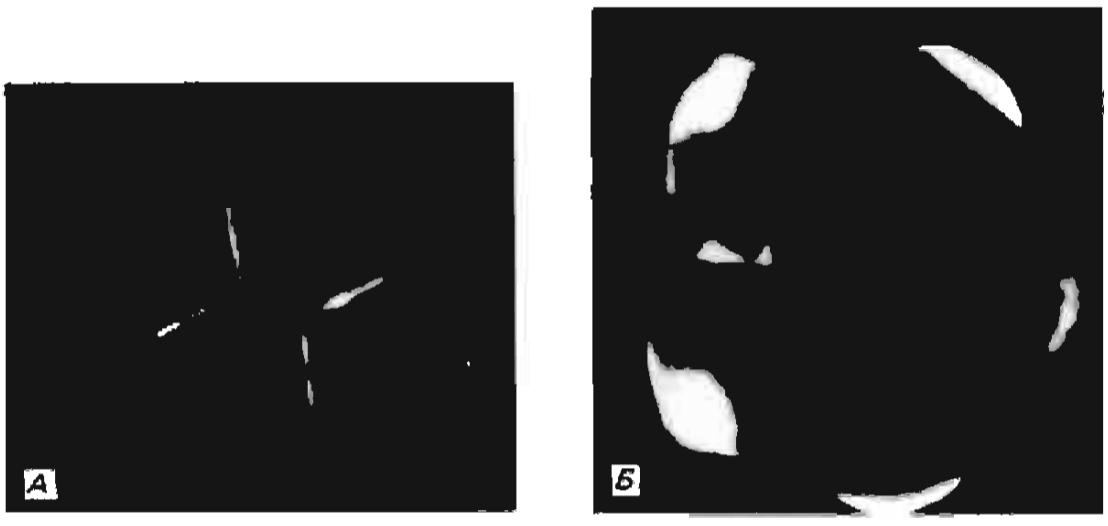


Рис. 3.27. Поляризация компонентов плазматической мембраны в бластомерах 8-клеточного зародыша мыши. *А*. Гомогенное неполярное распределение компонентов мембраны, меченных флуоресцентным конканавалином А на 4-клеточной стадии. *Б*. Гетерогенное полярное распределение этих компонентов на 8-клеточной стадии. (*А* — из Fleming et al., 1986; *Б* — из Levy et al., 1986; фотографии с любезного разрешения авторов.)

званием **поляризации**. Разные компоненты клеточной поверхности мигрируют в разные области клетки (Ziomek, Johnson, 1980). Это можно обнаружить, пометив определенные молекулы на клеточной поверхности флуоресцентными красителями. Мечение одним таким красителем, узнающим класс гликопротеинов, показывает, что на 4-клеточной стадии эти гликопротеины беспорядочно распределены по всей плазматической мембране (рис. 3.27, *А*). Однако на стадии незавершенного третьего деления меченые молекулы обнаруживаются преимущественно на полюсах бластомеров, наиболее удаленных от центра агрегата (рис. 3.27, *Б*). Это перемещение является, по-видимому, результатом межклеточных взаимодействий, так как оно наблюдается при выделении из зародыша двух связанных между собой бластомеров, но не бластомеров, изолированных поодиночке.

Во-вторых, в процессе компактизации участвуют специфические белки клеточной поверхности. Клетки опухоли, называемой тератокарциномой, сходны с клетками внутренней клеточной массы. При инкубации 8-клеточных мышиных зародышей в антисыворотке к стволовым клеткам тератокарциномы компактизация подавляется (рис. 3.28) (Kemler et al., 1977; Johnson et al., 1979). Таким образом, в клетках тератокарциномы и в бластомерах 8-клеточного зародыша имеется молекула (или молекулы), которая необходима для того, чтобы произошла компактизация. Одной такой молекулой является **увоморулин** — гликопротеин с молекулярной массой 120 000 дальтон, который обнаруживается на плазматической мембране клеток этих двух типов. Антитела к молекуле увоморулина вызывают декомпактизацию морулы и подавляют прикрепление клеток тератокарциномы друг к другу (Hyafil et al., 1981; Peyrieras et al., 1983). При осуществлении функции этого гликопротеина важную роль играет углеводная часть молекулы, поскольку **туникамицин** (вещество, подавляющее гликозилирование белков) также предотвращает компактизацию.

В-третьих, плазматическая мембрана при компактизации может также изменяться вследствие реорганизации цитоскелета. На соседних клеточных поверхностях в результате образования актиновых микрофиламентов возникают микроворсинки, прикрепляющие клетки друг к другу. Именно на микроворсинках, по-видимому, функционирует увоморулин как медиатор межклеточной адгезии. Уплощение поверхностей соседних бластомеров в месте их контакта может вызываться укорочением микроворсинок путем деполимеризации актина (Pratt et al., 1982; Sutherland, Calarco-Gillam, 1983). Таким образом, представление, что причиной компактизации являются изменения архитектоники поверхности бластомеров, получает все больше подтверждений.

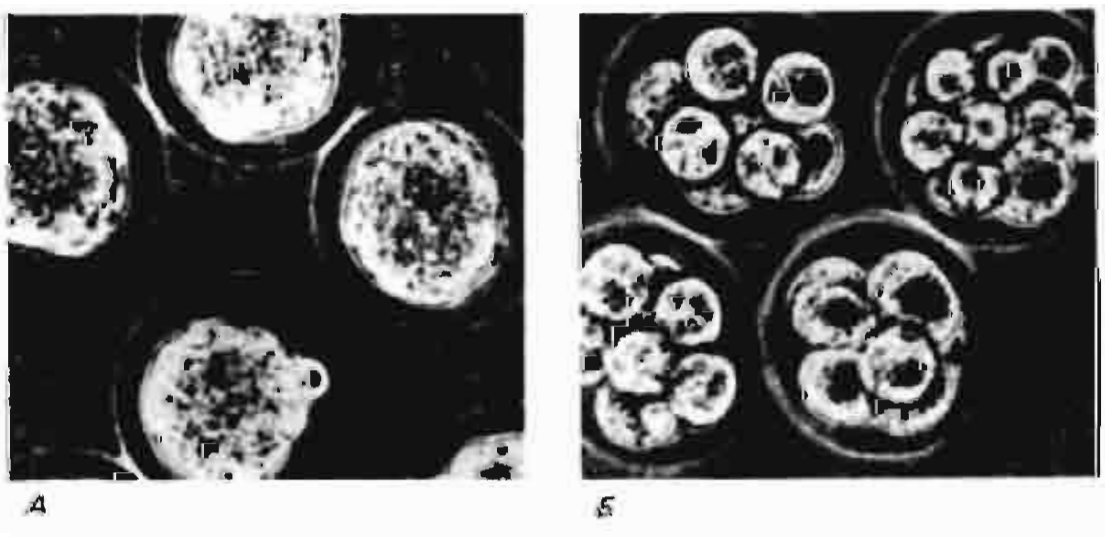


Рис. 3.28. Предотвращение компактизации с помощью антисыворотки к стволовым клеткам тератокарциномы. *А*. Нормальная компактизация в отсутствие сыворотки. *Б*. Пролиферация без компактизации в присутствии антител к стволовым клеткам тератокарциномы. (Фотографии с любезного разрешения C. Ziomek.)

Образование внутренней клеточной массы

Возникновение внутренней клеточной массы, отличающейся от трофобласта, является *важнейшим* событием в раннем развитии млекопитающих. Каким образом развитие клетки направляется по тому или другому из этих двух путей? Каким образом клетка получает информацию о том, что она должна участвовать в образовании организма взрослого млекопитающего или вспомогательной ткани, которая отбрасывается при рождении? Наблюдения, проведенные на живых зародышах, позволяют предположить, что это важное решение является просто результатом того, что в определенное время клетка оказывается в соответствующем месте. До завершения 8-клеточной стадии разные бластомеры явно не отличаются друг от друга по биохимии, морфологии или потенциям. Тем не менее компактизация приводит к образованию внутренних и наружных клеток, глубоко различающихся по своим свойствам. Путем маркировки разных бластомеров в многочисленных исследованиях было показано, что клетки, оказавшиеся снаружи, формируют трофобласт, тогда как клетки, оказавшиеся внутри, образуют зародыш (Tarkowski, Wróblewska, 1967)[1]. Если любой бластомер 4-клеточного зародыша мыши поместить на наружную поверхность рыхлой массы бластомеров другого зародыша, то из пересаженной клетки разовьется только ткань трофобласта (Hillman et al., 1972). Следовательно, будет ли клетка участвовать в образовании трофобласта или зародыша, определяется, по-видимому, тем, где оказалась клетка после компактизации — на поверхности или внутри зародыша.

Если большинство клеток бластоцисты дает начало трофобласту, то сколько же клеток фактически образует зародыш? Один из путей для получения ответа на этот вопрос заключается в создании аллофенных мышей. Аллофенные мыши являются результатом развития химерных зародышей, полученных путем слияния двух зародышей на ранних стадиях дробления (обычно 4- или 8-клеточных). Как показано на рис. 3.29, у двух генетически различаю-

[1] Установлено, что внутренние клетки чаще всего происходят от того бластомера, который на 2-клеточной стадии делится первым. Потомки этого бластомера обычно первыми достигают 8-клеточной стадии и делятся таким образом, что оказываются внутри рыхлого скопления бластомеров (Graham, Kelly, 1977).

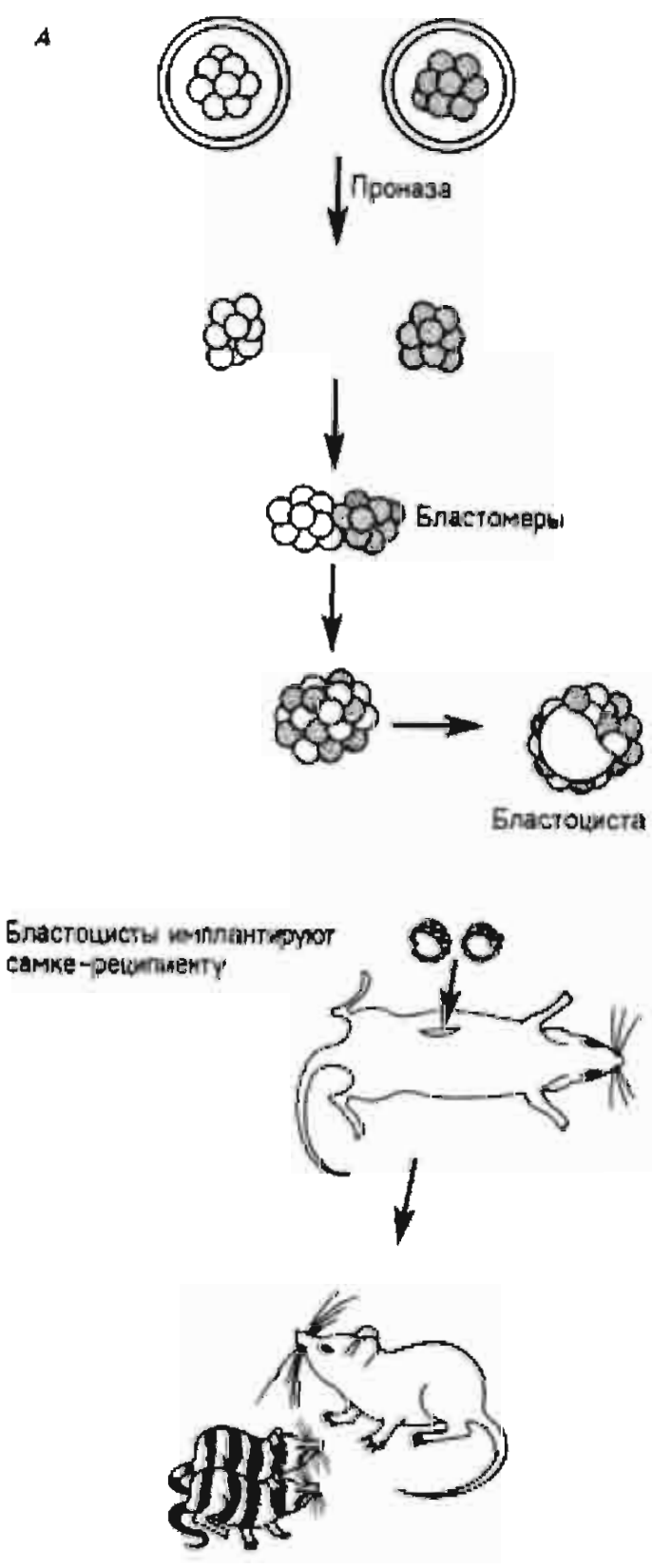


Рис. 3.29. Получение аллофенных мышей. *А*. Экспериментальные приемы, используемые для получения аллофенных мышей. Ранних 8-клеточных зародышей генетически различных линий мышей (в данном случае — линий с различной окраской шерсти) извлекают из яйцеводов и приводят в контакт, предварительно удалив прозрачную оболочку с помощью протеолитических ферментов (проназы). Клетки образуют химерную бластоцисту, которую экспериментатор имплантирует в матку самки-реципиента. *Б*. Взрослая аллофенная мышь, фенотип которой свидетельствует о вкладе зародышей пигментированной (черной) и непигментированной (белой) линий. (Фотографии с любезного разрешения B. Mintz.)

шихся зародышей удаляют прозрачную оболочку и зародышей приводят в контакт для их слияния и образования единой бластоцисты. Полученные бластоцисты имплантируют в матку самки-реципиента. Рождающиеся аллофенные мыши содержат клетки, которые произошли от обоих зародышей. Это хорошо видно в случаях, когда агрегированные бластомеры принадлежат мышам разных линий, отличающихся друг от друга по окраске шерсти. Когда агрегируют бластомеры белых и черных мышей, обычно развивается мышь с черными и белыми полосами (рис. 3.29, *Б*). Если бы зародыш развивался только из одной клетки бластоцисты, то такой результат не мог быть получен: потомки были бы либо белыми, либо черными. Если бы в образовании зародыша участвовали две клетки бластоцисты, то следовало бы ожидать, что аллофенный рисунок будет выражен только в половине случаев (1WW : 2WB : 1BB). Если бы зародыш формировали три клетки, то вероятность появления аллофенного рисунка возросла бы до 75% (1WWW : 3WWB : 3WBB : 1BBB); при наличии четырех таких клеток вероятность появления двухцветных мышей составила бы 87,5%. Согласно экспериментальным данным (Mintz, 1970), 73% химерных зародышей развивается в аллофенных мышей, что свидетельствует об участии трех бластомеров бластоцисты в образовании всего зародыша. Было также показано (Markert, Petters, 1978), что три 4-клеточных зародыша могут слиться и образовать общую компактную морулу (рис. 3.30 и цветной рисунок на внутренней стороне обложки). Из такой морулы может развиться мышь, покровы которой имеют участки, окрашенные в цвета трех разных линий. Таким образом, хотя и нет полной уверенности в том, что абсолютное число бластомеров, образующих зародыш, равно 3, очевидно, что оно не намного превышает эту величину и что бóльшая часть клеток бластоцисты никогда не участвует в формировании взрослого организма.

Освобождение от прозрачной оболочки

В то время, когда зародыш перемещается по яйцеводу по направлению к матке, бластоциста увеличивается в объеме. В плазматических мембранах клеток трофэктодермы имеется натриевый насос (Na^+/K^+-АТФаза), который переносит ионы натрия в центральную полость. Такое накопление ионов натрия вызывает поступление в полость воды осмотическим путем, в результате чего размеры полости бластоцисты увеличиваются (Borland, 1977; Wiley, 1984). В период перемещения зародыша большое значение имеет тот факт, что прозрачная оболочка предотвращает прилипание бластоцисты к стенкам яйцевода. Когда у человека такое прилипание происходит, наблюдается «трубная беременность». Это опасное явление, поскольку имплантация зародыша в яйцевод может вызвать угрожающее жизни кровотечение. Однако, когда зародыш достигает матки, он должен освободиться от прозрачной оболочки для того, чтобы прикрепиться к стенке матки.

Бластоциста мыши освобождается от оболочки путем лизиса в ней небольшого отверстия, через которое она выдавливается при увеличении своего объема (рис. 3.31). Гистологические данные свидетельствуют о том, что одна из клеток трофобластической стенки (в части, не прилежащей к внутренней клеточной массе) образует вырост, который приходит в контакт с прозрачной оболочкой. На плазматической мембране этого выроста локализована трипсиноподобная протеаза, **стрипсин**, которая лизи-

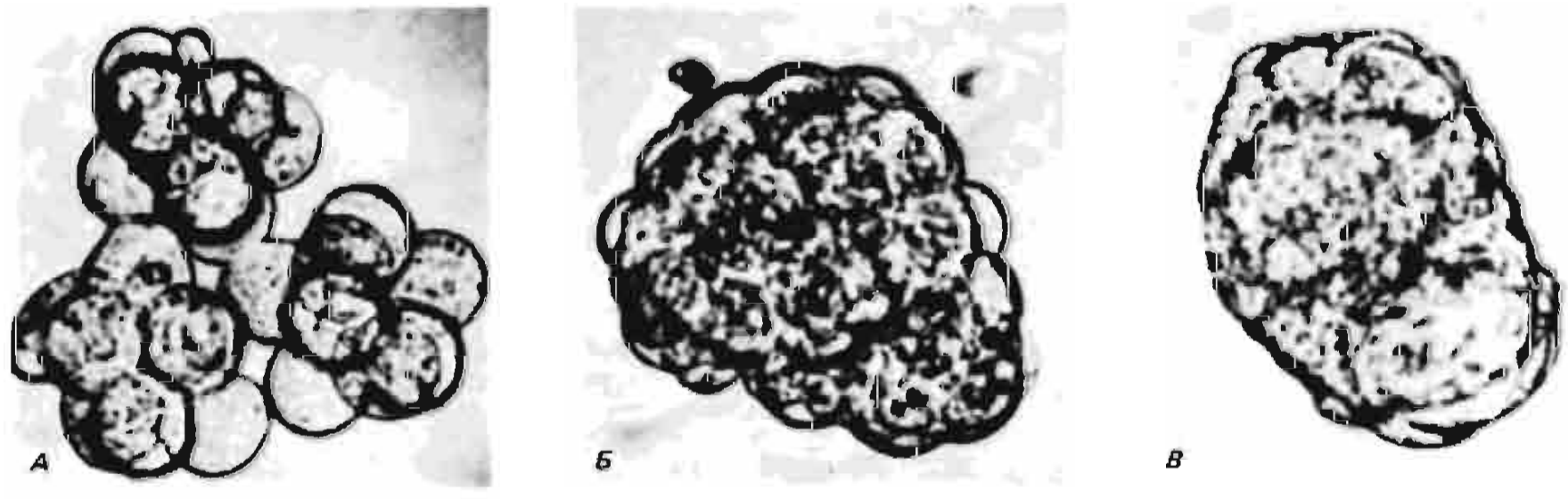


Рис. 3.30. Агрегация и компактизация трех 8-клеточных зародышей мыши, образующих единую компактную морулу. Клетки трех зародышей (*А*) агрегируют в единую морулу (*Б*), которая подвергается компактизации и преобразуется в бластоцисту (*В*). Развившаяся из такой бластоцисты аллофенная мышь представлена на внутренней стороне обложки. (Из Markert, Petters, 1978; фотографии с любезного разрешения C. Markert.)

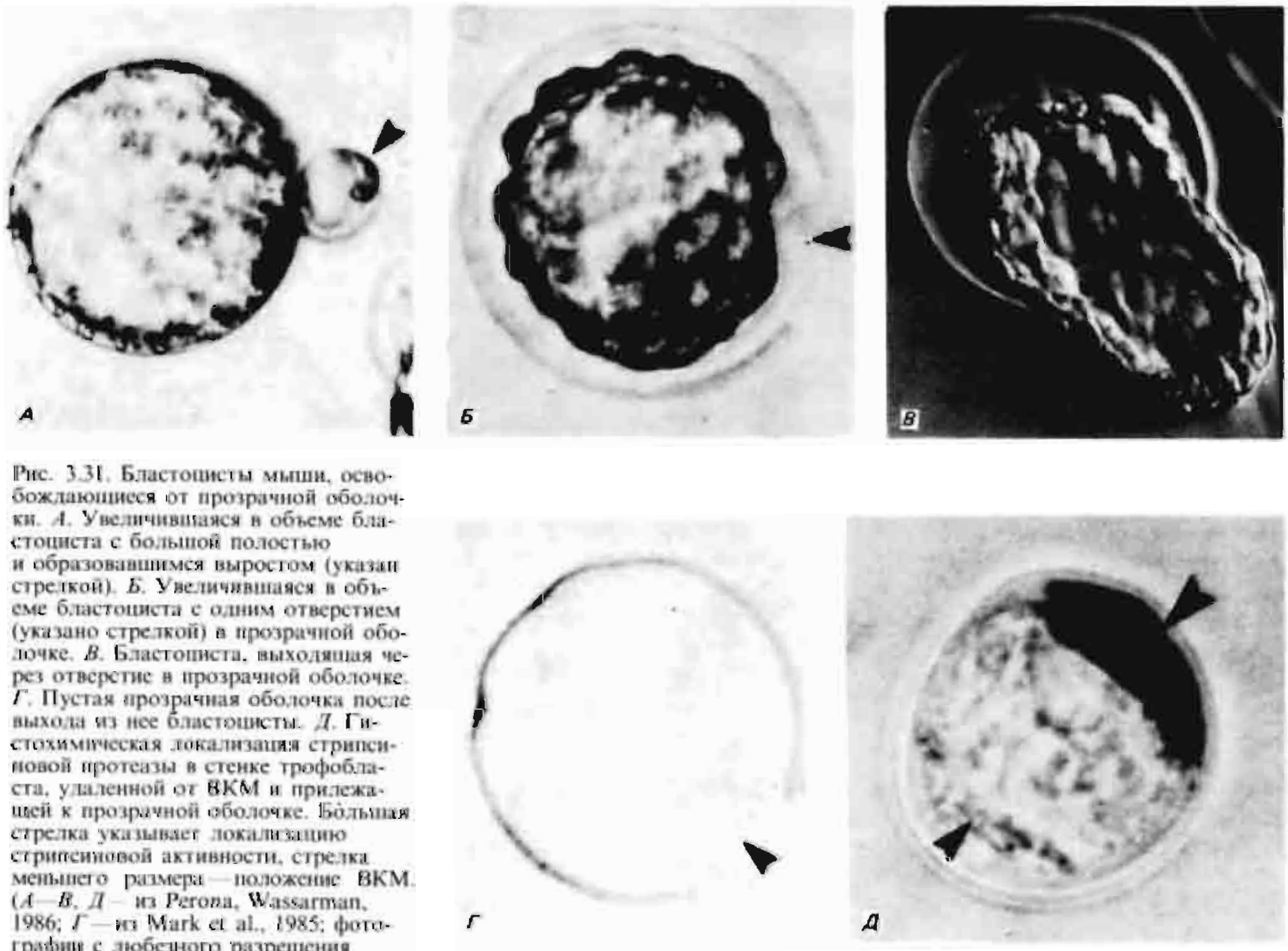


Рис. 3.31. Бластоцисты мыши, освобождающиеся от прозрачной оболочки. *А*. Увеличившаяся в объеме бластоциста с большой полостью и образовавшимся выростом (указан стрелкой). *Б*. Увеличившаяся в объеме бластоциста с одним отверстием (указано стрелкой) в прозрачной оболочке. *В*. Бластоциста, выходящая через отверстие в прозрачной оболочке. *Г*. Пустая прозрачная оболочка после выхода из нее бластоцисты. *Д*. Гистохимическая локализация стрипсиновой протеазы в стенке трофобласта, удаленной от ВКМ и прилежащей к прозрачной оболочке. Большая стрелка указывает локализацию стрипсиновой активности, стрелка меньшего размера — положение ВКМ. (*А—В*, *Д* — из Perona, Wassarman, 1986; *Г* — из Mark et al., 1985; фотографии с любезного разрешения R. Perona и E. Lacy.)

рует отверстие в фибриллярном матриксе оболочки (Perona, Wassarman, 1986).

Освободившись от оболочки, бластоциста может вступить в непосредственный контакт с маткой. Здесь трофобласт будет секретировать другую трипсиноподобную протеазу, **активатор плазминогена**. Полагают, что этот расщепляющий белок фермент необходим для разрушения ткани матки, чтобы бластоциста могла погрузиться в ее стенку (Strickland et al., 1976).

Дополнительные сведения и гипотезы

Близнецы

Близнецов человека разделяют на две основные группы: монозиготные (однояйцовые, идентичные) и дизиготные (двуяйцовые, неидентичные) близнецы. Дизиготные близнецы развиваются в результате двух независимых процессов оплодотворения, тогда как монозиготные происходят из одного зародыша, клетки которого каким-то образом разделились. Последнее означает, что изолированный бластомер млекопитающего способен образовать целый зародыш. Такое заключение было подтверждено опытом разрушения одного бластомера у 2-клеточного зародыша кролика (Seidel, 1952). Оставшийся бластомер был способен к формированию полноценного взрослого организма. Даже один бластомер 8-клеточного зародыша мыши может успешно развиться в полноценную взрослую особь (Kelly, 1977). Было также показано, что при инъекции клеток внутренней клеточной массы (но не трофобласта) в бла-

стоцисту они способны принимать участие в образовании нового зародыша (Gardiner, Rossant, 1976). Таким образом, идентичные близнецы возникают путем разделения бластомеров на ранних стадиях или даже разделения ВКМ на две части в пределах одной бластоцисты.

По-видимому, именно так оно и происходит при развитии примерно 0,25% детей. Около 33% идентичных близнецов имеют два полноценных независимых хориона, что указывает на разделение зародыша еще до образования ткани трофобласта на 5-е сутки беременности. У оставшихся 67% идентичных близнецов хорион общий; в этих случаях разделение ВКМ произошло, очевидно, после образования трофобласта (рис. 3.32, *А*). К 9 суткам зародыш человека завершает формирование другого внезародышевого образования — **амниона**. Из этой ткани образуется амниотический мешок (или водная оболочка), заполненный амниотической жидкостью, который окружает зародыш и защищает его от обезвоживания и последствий резких движений (гл. 4). Если бы разделение зародыша произошло между образованием хориона на пятые сутки и амниона на девятые, то зародыши должны были бы иметь один хорион и два амниона (рис. 3.32, *Б*). Так обстоит дело приблизительно у двух третей идентичных близнецов. Небольшой процент идентичных близнецов имеет общий хорион и общий амнион (рис. 3.32, *В*). Это означает, что разделение зародыша произошло после 9 сут беременности. Такие новорожденные рискуют оказаться сросшимися между собой («сиамские близнецы»).

Способность образовать целый зародыш из клеток, которые в норме участвовали бы в образовании только его части, называется **регуляцией**. Подробнее это явление будет рассмотрено в гл. 8. Регуляцией является также способность двух и большего числа ранних зародышей образовать одну аллофенную мышь, а не двойню, тройню или многоголового урода. Имеются данные в пользу того, что аллофенная

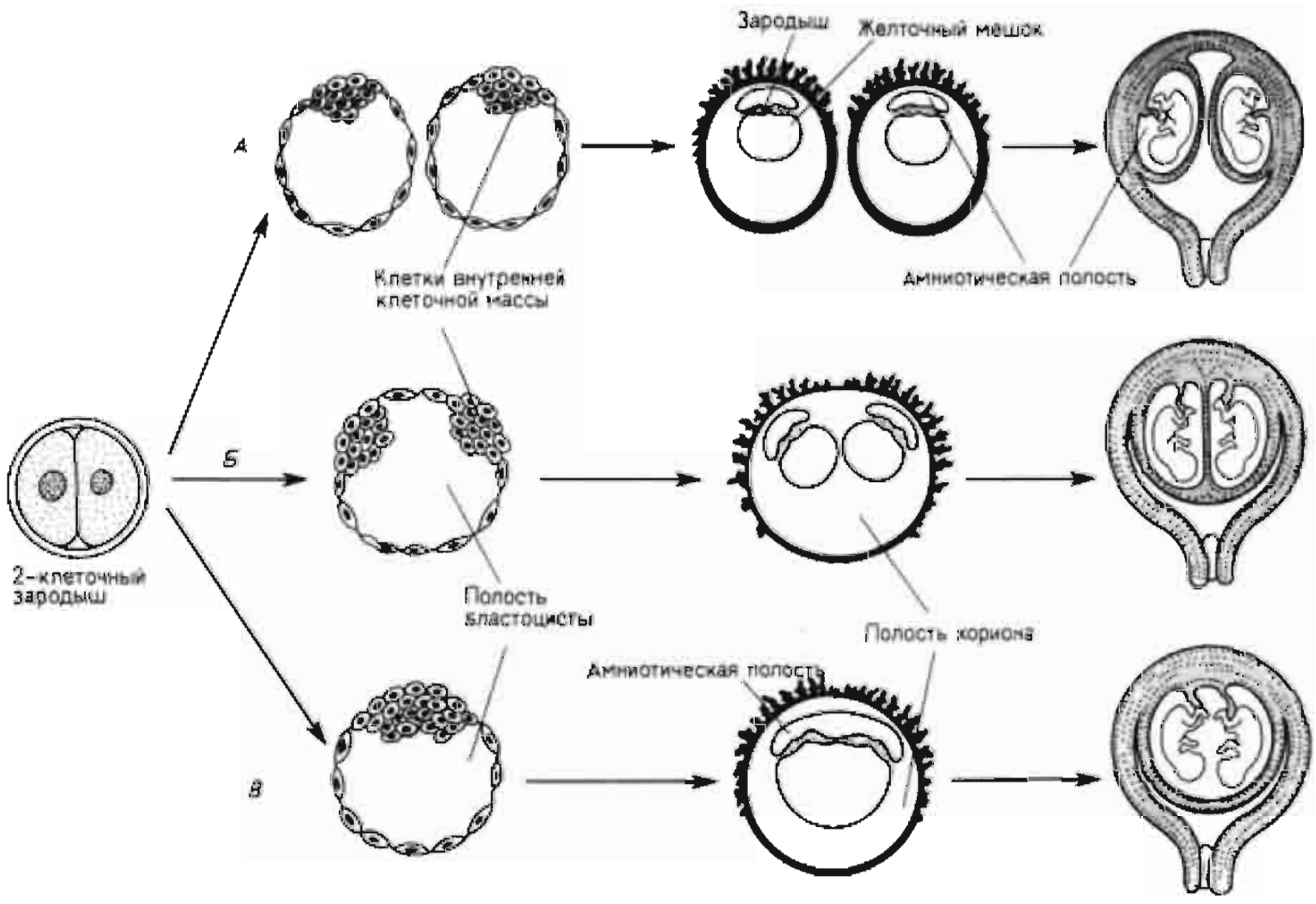


Рис. 3.32. Схематический рисунок, иллюстрирующий зависимость между временем разделения зародыша человека, приводящего к образованию монозиготных (идентичных, однояйцовых) близнецов, и их взаимоотношением с зародышевыми оболочками. *А*. Разделение происходит до образования трофэктодермы; при этом каждый из близнецов имеет собственные хорион и амнион. *Б*. Разделение происходит после образования трофэктодермы, но до образования амниона; в результате каждый из близнецов имеет собственный амниотический мешок, но хорион у них общий. *В*. При разделении после образования амниона близнецы находятся в общем амниотическом мешке и имеют общий хорион. (По Langman, 1981.)

регуляция может происходить и у человека (Chappelle et al., 1974; Mayr et al., 1979). Описаны индивидуумы, в организме которых имеются клетки двух разных генетических типов (XX и XY), каждый из которых обладает собственным набором генетических характеристик. Самое простое объяснение существования такого явления заключается в том, что эти индивидуумы возникли в результате слияния двух зародышей мужского и женского пола, которые развивались одновременно. Если такое объяснение правильно, то в этих случаях два близнеца, брат и сестра, слились для образования одной химерной особи.

Мезобластические типы дробления

Как уже упоминалось в этой главе, количество желтка играет важную роль в дроблении яйца. Нигде это не выступает с большей очевидностью, чем при мезобластических типах дробления. Здесь большое количество желтка препятствует разделению всей цитоплазмы яйца, за исключением небольшой ее части. При **дискоидальном дроблении** клеточные деления ограничены небольшим диском свободной от желтка цитоплазмы, располагающимся над желточной массой; **при поверхностном дроблении** яиц с желтком, расположенным в центре, деление возможно только в периферическом слое цитоплазмы.

Дискоидальное дробление

Дискоидальное дробление характерно для рыб, птиц и рептилий. На рис. 3.33 представлено дробление яйца птицы. Бо́льшая часть объема яйца занята желтком, так что дробление происходит только в области бластодиска у анимального полюса яйца. Поскольку деления дробления не распространяются на богатую желтком цитоплазму, на ранних стадиях дробления клетки у своего основания не отделены друг от друга. В результате экваториальных делений образуется однослойная **бластодерма**, затем она преобразуется в трех- или четырехслойный клеточный пласт. Между бластодермой и желтком имеется пространство, называемое **подзародышевой полостью**. На этой стадии четко различимы две области бластодиска: **светлое поле** (area pellucida), соответствующее той его части, которая располагается над полостью, и **темное поле** (area opaca), состоящее из клеток, расположенных по краю бластодиска и прилежащих к желтку.

К тому времени, когда курица откладывает яйцо, бластодерма содержит около 60 000 клеток. Некоторые из этих клеток выселяются в подзародышевую полость, где образуют второй слой (рис. 3.34). Таким образом, вскоре после откладки в яйце курицы имеются два слоя клеток: наружный эпибласт и лежащий под ним гипобласт. Между ними находится бластоцель.

Богатые желтком яйца рыб дробятся сходным образом: клеточные деления у них происходят только в бластодиске, располагающемся в области анимального полюса. Микрофотографии дробящегося яйца рыбы, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 3.35), прекрасно демонстрируют неполный характер дискоидального дробления.

Поверхностное дробление

Яйцам насекомых свойственно поверхностное дробление, при котором из-за большой массы центрально расположенного желтка дробление ограничено поверхностным слоем цитоплазмы. Одна из примечательных особенностей этого типа дробления

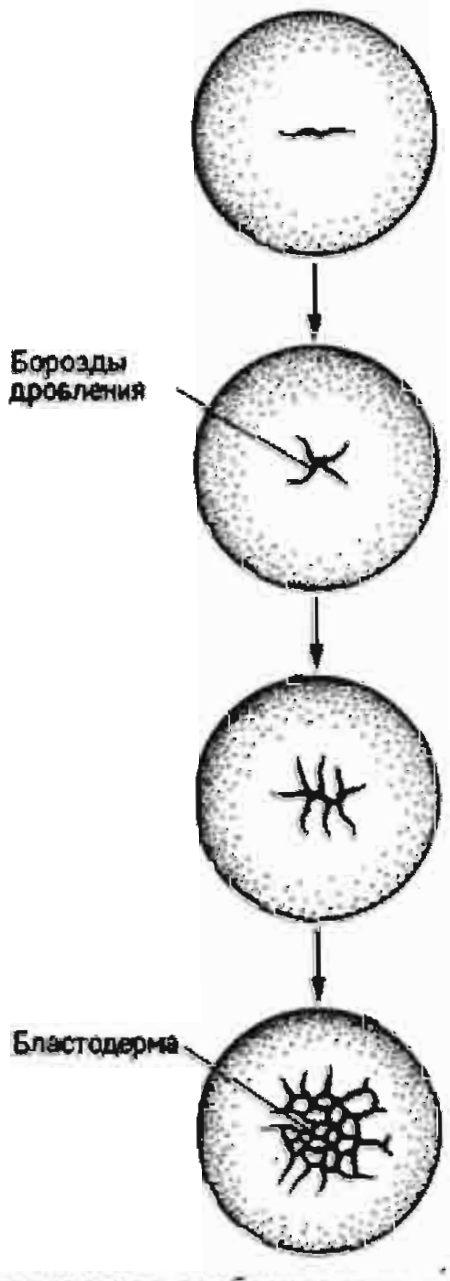


Рис. 3.33. Дискоидальное дробление куриного яйца (вид со стороны анимального полюса). Борозды дробления не распространяются на желток, и возникает бластодерма, состоящая из одного слоя клеток.

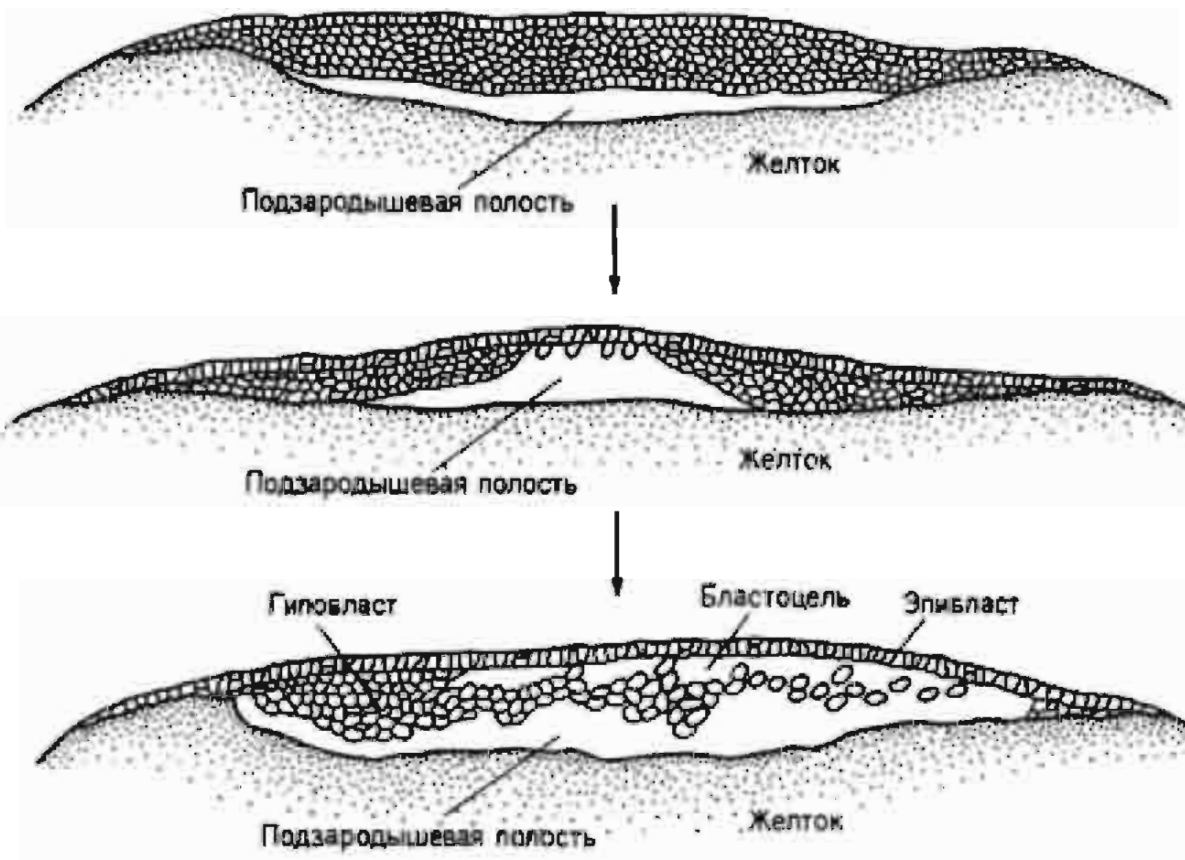


Рис. 3.34. Образование гипобласта в яйце птицы. (По Torrey, 1962.)

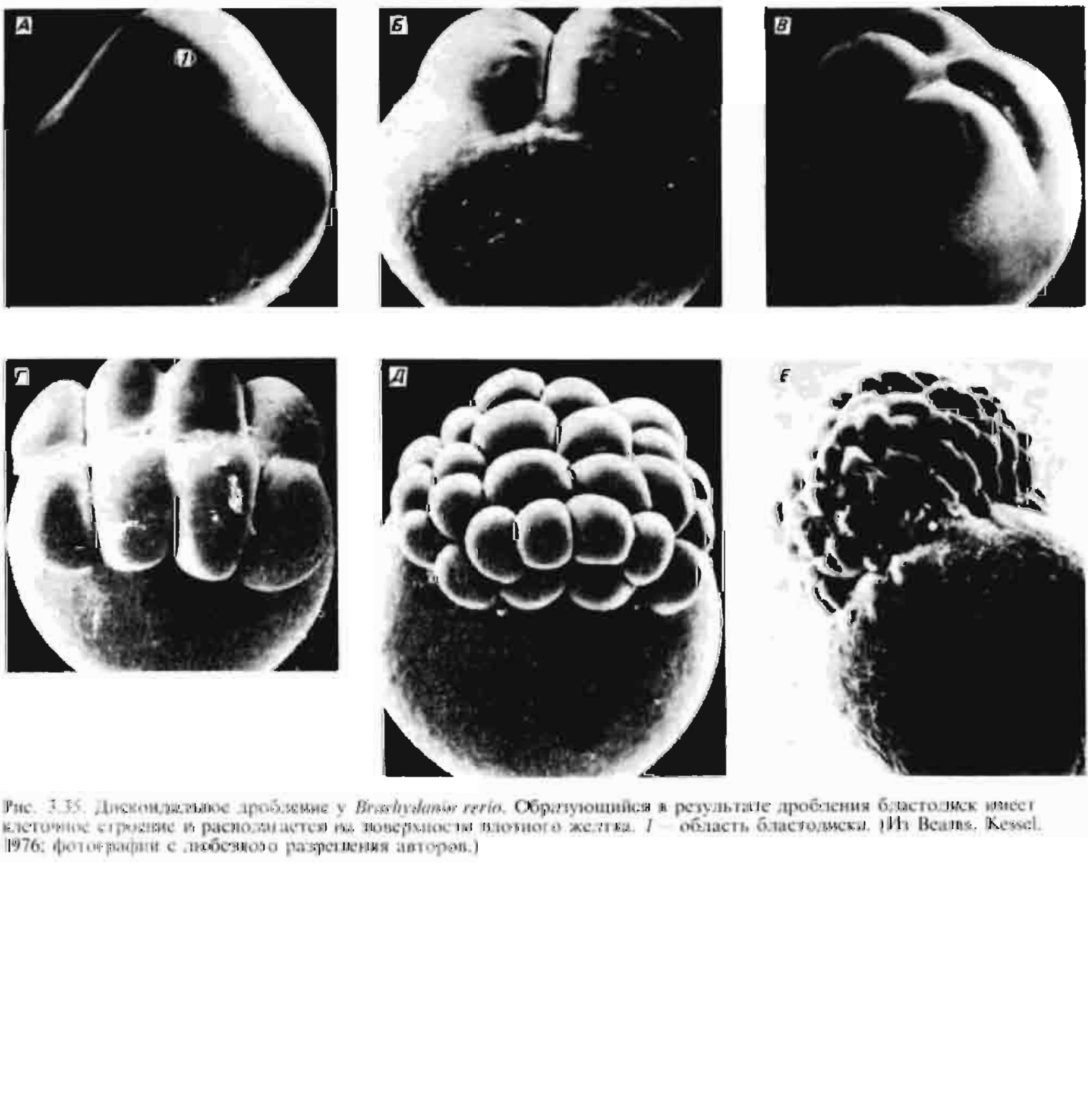


Рис. 3.35. Дискоидальное дробление у *Brachydanio rerio*. Образующийся в результате дробления бластодиск имеет клеточное строение и располагается на поверхности плотного желтка. *1* — область бластодиска. (Из Beams, Kessel, 1976; фотографии с любезного разрешения авторов.)

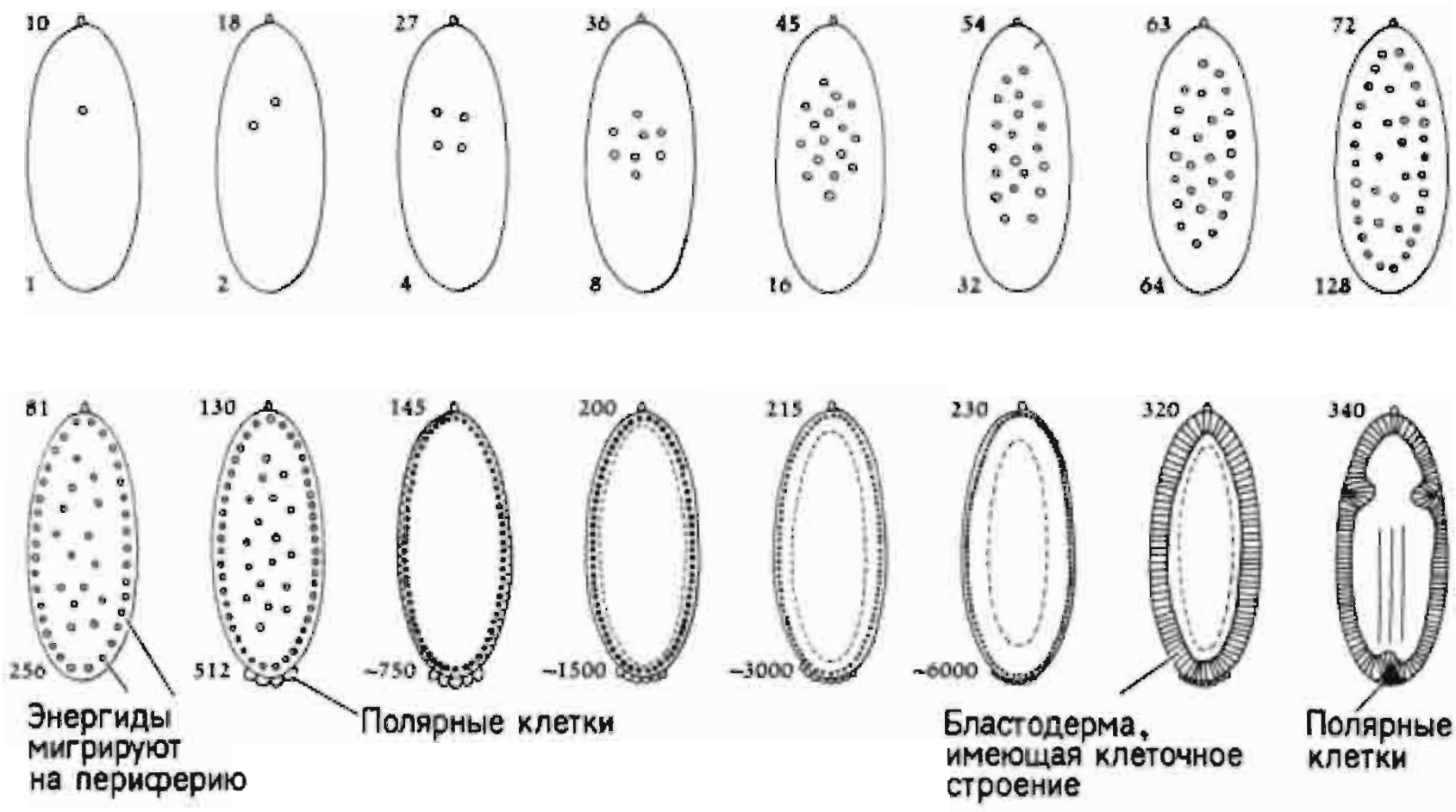


Рис. 3.36. Поверхностное дробление зародыша дрозофилы. Цифры над каждым зародышем соответствуют числу минут после откладки яйца; цифры внизу обозначают число имеющихся ядер. Полярные клетки (которые позднее образуют половые клетки) становятся заметными, начиная со стадии 512 ядер, хотя клеточная бластодерма образуется не раньше, чем спустя примерно 3 ч. (По Zalokar, Erk, 1976.)

заключается в том, что обособление клеток происходит только после многократного разделения ядер. Дробление яйца насекомого представлено на рис. 3.36. Ядро зиготы претерпевает несколько митотических делений в центральной области яйца. У дрозофилы в результате ряда таких делений продолжительностью 8 мин каждое образуется 256 ядер. Затем ядра с окружающими их островками цитоплазмы (**энергиды**) мигрируют на периферию яйца, где митозы продолжаются, но с убывающей скоростью. Теперь зародыш носит название **синцитиальной бластодермы**, так как все ядра дробления заключены в общей цитоплазме и какие-либо плазматические мембраны, кроме мембраны самого яйца, отсутствуют. Ядра, мигрирующие к заднему полюсу яйца, вскоре окружаются новыми плазматическими мембранами, образуя **полярные клетки** зародыша. Эти клетки дают начало половым клеткам взрослого организма. Таким образом, одним из первых событий в развитии насекомых является отделение будущих половых клеток от остальных частей зародыша.

После образования полярных клеток плазматическая мембрана яйца образует впячивания, которые углубляются между ядрами и в конечном счете обособляют каждое из них в отдельной клетке (рис. 3.37). В результате возникает **клеточная бластодерма**, клетки которой однослойным покровом одевают богатую желтком сердцевину яйца. У дрозофилы этот слой состоит приблизительно из 6000 клеток и формируется в первые 3 ч после оплодотворения. Распределение клеток в бластодерме не равномерное и не случайное: они концентрируются на вентральной поверхности, обозначая место, где возникнут зародышевые листки. Эта область, называемая **зародышевой полоской**, дает начало всем клеткам насекомого. Остальные клетки бластодермы образуют внезародышевые оболочки.

Хотя ядра первоначально делятся в общей цитоплазме, это не означает, что цитоплазма сама по себе однородна. Показано (Karr, Alberts, 1986), что каждое ядро синцитиальной бластодермы заключено в собственную маленькую территорию цитоскелетных белков. Когда ядра во время десятого митотического цикла дробления достигают периферии, каждое из них окружается микротрубочками и микрофиламентами. На рис. 3.38 показаны ядра на стадии профазы двенадцатого митотического деления и основная часть относящихся к ним территорий, в которых располагаются микрофиламенты и микротрубочки.

После того как ядра достигнут периферии, время, необходимое для осуществления каждого из четырех последующих делений, постепенно увеличивается, составляя для 14-го цикла 60 мин. Именно в это время происходит обособление клеток. Сформированные клетки делятся асинхронно. Скорость транс-

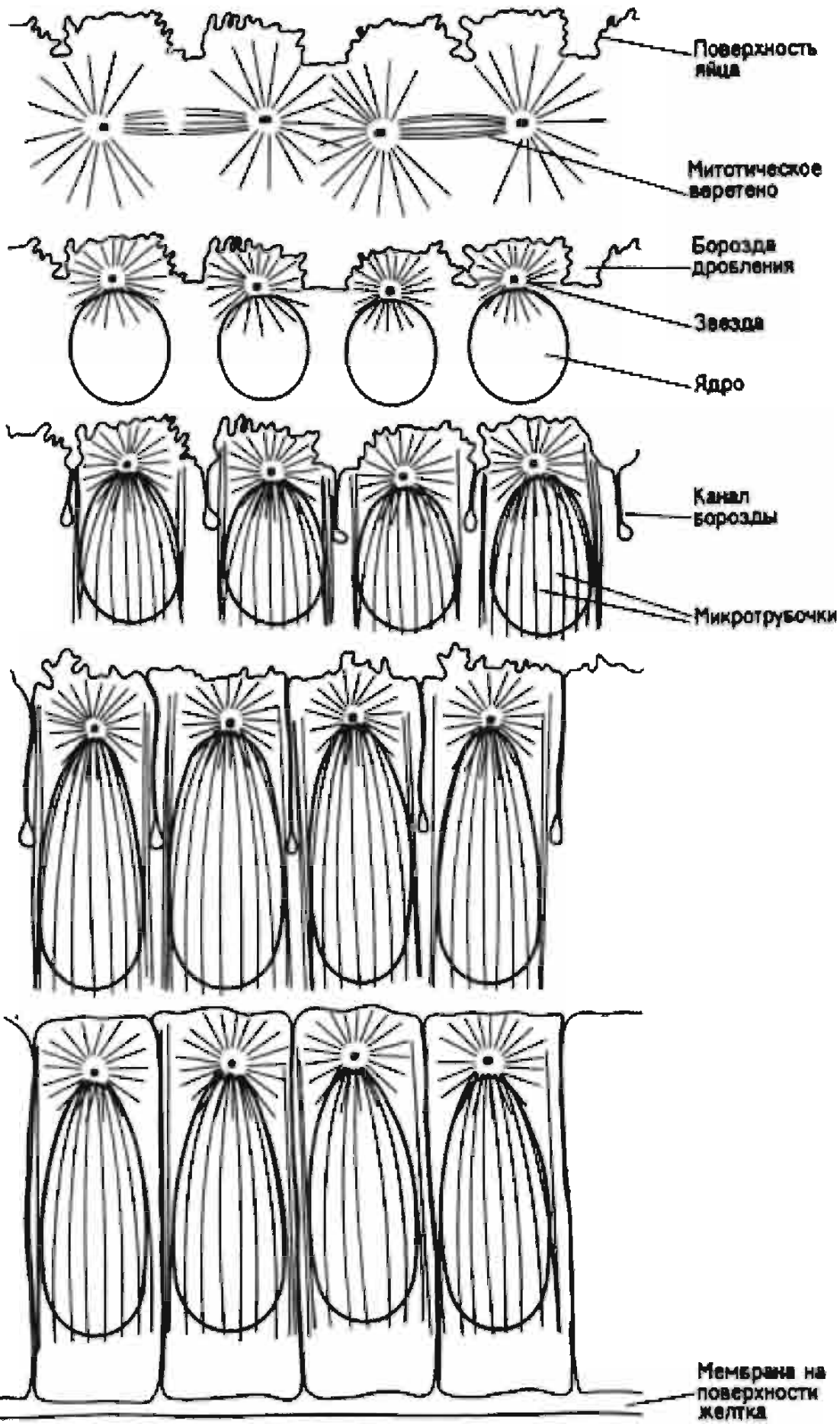


Рис. 3.37. Схематический рисунок, на котором показано удлинение ядер и обособление клеток в бластодерме дрозофилы. (По Fullilove, Jacobson, 1971.)



Рис. 3.38. Локализация цитоскелета вокруг ядер в синцитиальной бластодерме дрозофилы. Срезы зародыша дрозофилы, вступающего в профазу двенадцатого деления, были окрашены тремя способами. *А*. Ядра окрашены красителем, который связывается с ДНК. *Б*. Микрофиламенты идентифицированы с помощью флуоресцирующих антител к актину. *В*. Микротрубочки выявлены с помощью флуоресцирующих антител к тубулину. Можно видеть, что вокруг каждого ядра имеется область, включающая цитоскелетные структуры. (Из Karr, Alberts, 1986; фотографии с любезного разрешения T. L. Karr.)

крипции (начинающейся приблизительно на одиннадцатом цикле) сильно возрастает. Замедление ядерных делений и ускорение синтеза РНК у дрозофилы напоминают ситуацию, наблюдающуюся у зародышей лягушки и морского ежа. Контроль за замедлением делений (у зародышей *Xenopus*, морского ежа и дрозофилы), по-видимому, осуществляется через соотношение между ядром и цитоплазмой (Newport, Kirschner, 1982a; Edgar et al., 1986). Эдгар и его соавторы в цитированной работе сравнили раннее развитие зародышей дрозофилы дикого типа с развитием гаплоидных мутантов. Гаплоидные зародыши дрозофилы при каждом клеточном делении содержат вдвое меньше хроматина, чем зародыши дикого типа. Следовательно, гаплоидный зародыш на восьмом клеточном цикле имеет такое же количество хроматина, что и зародыш дикого типа на седьмом цикле. Эти исследователи установили, что тогда как зародыши дикого типа формировали клеточную бластодерму во время 14-го цикла, гаплоидные зародыши для достижения того же результата должны были осуществить еще одно, дополнительное 15-е деление. Более того, продолжительность 11—14 циклов у зародышей дикого типа соответствовала продолжительности 12—15 циклов у гаплоидных зародышей. Таким образом, ход развития гаплоидных зародышей сходен с ходом развития зародышей дикого типа, отличаясь лишь отставанием на одно клеточное деление.

Если это отставание обусловлено тем, что ядерно-плазменное отношение у гаплоидных мутантов на каждом данном цикле вдвое меньше, чем у зародышей дикого типа, то можно было бы ускорить образование клеточной бластодермы, отшнуровывая (наложением лигатуры) часть цитоплазмы, чтобы гаплоидные ядра делились в меньшем ее объеме. Когда такой опыт был проведен, образование клеточной бластодермы у гаплоидных зародышей ускорилось. Завершающее деление клеток бластодермы, свидетельствующее об окончании периода дробления, у дрозофилы происходит тогда, когда на одно ядро приходится 61 мкм^2 цитоплазмы. У *Xenopus* сходное замедление митотических делений наблюдается после 12-го деления. И здесь деления также впоследствии становятся асинхронными. Момент **перехода к средней бластуле** тоже связан с ядерно-плазменным отношением. Гаплоидные зародыши *Xenopus laevis* осуществляют этот переход после 13-го митотического цикла, тогда как тетраплоидные зародыши (содержащие вдвое больше хроматина на клетку, чем зародыши дикого типа) приступают к переходу после 11-го деления (Newport, Kirschner, 1982a, b).

Как у дрозофилы, так и у *Xenopus laevis* транскрипция и подвижность клеток могут быть инициированы преждевременно путем искусственного удлинения клеточного цикла. При задержке клеточных делений циклогексимидом (ингибитор белкового синтеза) переход к средней бластуле у *Xenopus laevis* индуцируется рано, а у дрозофилы происходит вспышка транскрипции (Edgar et al., 1986; Kimelman et al., 1987).

МЕХАНИЗМЫ ДРОБЛЕНИЯ

Инициация дробления

Клеточный цикл соматических клеток по функциональному признаку делится на четыре стадии (или фазы). За митозом (М) следует пресинтетический период (G_1), после которого происходит синтез ДНК (S). Затем наступает премитотический цикл (G_2), за которым следует митоз (рис. 3.39,*А*). Наступление этих фаз регулируется факторами роста, которые будут подробно рассмотрены в гл. 20. Клеточный цикл бластомеров на ранних стадиях дробления может быть, однако, гораздо более простым. Бластомеры у морского ежа на этих стадиях не имеют фазы G_1; репликация ДНК осуществляется в телофазе предыдущего митоза (Hinegardner et al., 1964). На тех же стадиях у *Xenopus laevis* и дрозофилы отсутствуют две фазы, G_1 и G_2. (У *Xenopus laevis* эти фазы появляются в клеточном цикле при переходе к средней бластуле после 12-го деления, а у дрозофилы — после 14-го. В обоих случаях это изменение цикла сочетается с увеличением клеточной подвижности и транскрипции РНК.) В течение первых 12 делений клетки *Xenopus* делятся синхронно и клеточный цикл бывает двухфазным: S-фаза сменяется М-фазой и М-фаза — S-фазой (рис. 3.39, *Б*; Laskey et al., 1977; Newport, Kirschner, 1982a).

Факторы, регулирующие этот двухфазный цикл, локализованы в цитоплазме. В норме преобразования растущих ооцитов *Xenopus laevis* останавливаются на стадии профазы первого деления мейоза. Такие ооциты неспособны к делению. Когда в них пересаживают ядра делящихся клеток, эти ядра перестают делиться. Нормальные ооциты, подвергнутые стимулирующему воздействию прогестерона, возоб-

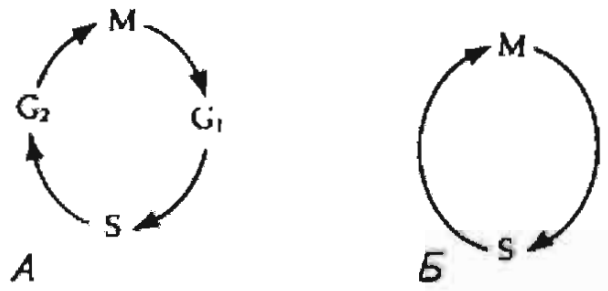


Рис. 3.39. Клеточные циклы соматических клеток и бластомеров на ранних стадиях дробления. *А*. Клеточный цикл типичной соматической клетки. За митозом (М) следует «интерфазное» состояние. Период между митозами подразделяется на фазы G_1, *S* (синтез) и G_2. *Б*. Более простой двухфазный цикл бластомеров амфибий на ранних стадиях дробления, имеющий только две фазы — *S* и *M*.

новляют мейотические преобразования, которые идут до стадии метафазы второго деления мейоза и на этой стадии останавливаются. Если в цитоплазму обработанных прогестероном ооцитов помещают ядра неделящихся клеток (например, нейронов), то такие ядра тоже инициируют деление (Gurdon, 1968). В цитоплазме происходят периодические сокращения кортикального слоя (характерные для деления) даже при отсутствии ядер или центриолей. Если в энуклеированные зародыши инъецируют клонированные фрагменты ДНК, то их репликация происходит под контролем этих циклов (Hara et al., 1980; Harland, Laskey, 1980; Karsenti et al., 1984). Таким образом, способность клетки к делению регулируется цитоплазмой.

Недавно были выявлены факторы, осуществляющие эту регуляцию. Фактор, индуцируемый прогестероном, который позволяет ооциту возобновить мейоз, представляет собой белок с молекулярной массой 100 000 дальтон; его называют **фактором, стимулирующим созревание** (maturation promoting factor, MPF). После первого деления мейоза повышается концентрация другого белка — **цитостатического фактора** (cytostatic factor, CSF), что приводит к остановке преобразований ооцита на метафазе второго деления мейоза. Ионы кальция, высвобождающиеся при оплодотворении из эндоплазматического ретикулума, по-видимому, инактивируют CSF, что делает возможным завершение мейоза и слияние пронуклеусов (Meyerhof, Masui, 1977).

Те же самые факторы — MPF, CSF и ионы кальция — важны и после оплодотворения, поскольку они регулируют двухфазный клеточный цикл на ранних стадиях дробления *Xenopus*. Показано (Gerhart et al., 1984), что в делящихся клетках уровень активности MPF претерпевает циклические изменения. Активность MPF в бластомерах лягушки на ранних стадиях дробления наивысшая в М-фазе и не выявляется в S-фазе. Такая же цикличность обнаруживается и в энуклеированных бластомерах. Установлено (Newport, Kirschner, 1984), что даже при отсутствии белкового синтеза наступление репликации ДНК (S-фаза) и вступление в митоз (М-фаза) определяются исключительно увеличением и утратой активности MPF. Дробящиеся клетки могут быть блокированы в S-фазе путем инкубации их с ингибитором белкового синтеза. Когда в такие клетки инъецируют MPF, они вступают в М-фазу. Ядерная оболочка этих клеток разрушается, и происходит конденсация хроматина с образованием видимых хромосом. Через 1ч активность MPF снижается и хромосомы возвращаются к состоянию, характерному для S-фазы. MPF действует, вероятно, путем изменения структуры ядерной оболочки. Через 15 мин после его введения наблюдается гиперфосфорилирование трех основных белков ядерной оболочки. В течение следующих 15 мин оболочка деполимеризуется и разрушается (Miake-Lye, Kirschner, 1985).

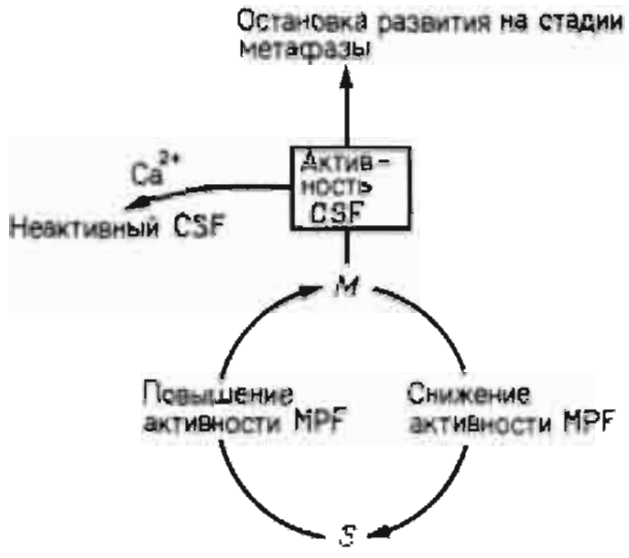


Рис. 3.40. Модель регуляции клеточного цикла бластомеров на ранних стадиях дробления у амфибий. В присутствии MPF S-фаза клеточного цикла переходит в М-фазу. Когда активность MPF прекращается (в результате его разрушения или функциональной инактивации), совершается переход от М-фазы к S-фазе. CSF стабилизирует MPF, задерживая клетку в М-фазе. Ионы кальция противодействуют эффекту CSF, т. е. они возвращают клетку в фазу S. (По Newport, Kirschner, 1984.)

Модель регуляции двухфазного клеточного цикла представлена на рис. 3.40. В цитоплазме продолжается образование MPF (либо путем трансляции мРНК для MPF, уже запасенной в клетке, либо путем активации предшественника MPF). MPF побуждает клетку к переходу от S-фазы к М-фазе. Когда MPF инактивируется, клетка возвращается в S-фазу. Таким образом, MPF управляет клеточным циклом. CSF и ионы кальция регулируют работу регулятора, контролируя содержание MPF в клетке. CSF, по-видимому, стабилизирует MPF, удерживая клетку в состоянии митоза. Ионы кальция, инактивируя CSF, тем самым создают возможность инактивации MPF. При добавлении CSF прекращаются также циклические сокращения кортикального слоя цитоплазмы, а последующая инъекция ионов кальция снова их стимулирует. Таким образом, на ранних стадиях развития цитоплазма определяет скорость клеточных делений и продолжительность S- и М-фаз цикла.

Цитоскелетный механизм митоза

Дробление является результатом двух координированных процессов. Первый из этих процессов — **кариокинез** (митотическое деление ядра). Механическим аппаратом этого деления является митотическое веретено с его **микротрубочками**, состоящими из тубулина (белка того же типа, что и белок, образующий жгутик спермия). Второй процесс — **цитокинез**,

Таблица 3.2. Кариокинез и цитокинез

Процесс	Механический аппарат	Основная белковая структура	Локализация	Основное вещество, нарушающее процесс
Кариокинез	Митотическое веретено	Тубулиновые микротрубочки	Центральная цитоплазма	Колхицин, нокодазол [1]
Цитокинез	Сократимое кольцо	Актиновые микрофиламенты	Кортикальная цитоплазма	Цитохалазин В

[1] Недавно было установлено, что колхицин подавляет независимым образом разные функции мембран, включая осморегуляцию, а также транспорт ионов и нуклеозидов. По этой причине в качестве ингибитора процессов, опосредованных микротрубочками, начинают использовать главным образом нокодазол (см. Hardin, 1987).

или деление клетки. Механическим аппаратом цитокинеза является **сократимое кольцо микрофиламентов**, состоящих из актина (белка того же типа, что и белки, осуществляющие удлинение микроворсинок и акросомного выроста спермия). В табл. 3.2 сравниваются эти два процесса. Взаимоотношение и координация между ними схематически представлены на рис. 3.41. На нем изображено яйцо морского ежа на стадии первого деления дробления. Митотическое веретено и сократимое кольцо расположены перпендикулярно друг другу, и веретено находится внутри сократимого кольца. Борозда дробления в дальнейшем разделяет плоскость митоза, создавая при этом два генетически равноценных бластомера.

Микрофиламенты актина встречаются в кортикальном слое яйца в большем количестве, чем в центральной цитоплазме. С помощью электронного микроскопа можно видеть, что микрофиламенты образуют в кортикальном слое хорошо различимое кольцо толщиной 0,1 мкм (рис. 3.42). Сократимое кольцо существует только во время деления и простирается на 8—10 мкм по направлению к центру яйца. Именно оно ответственно за разделение зиготы на бластомеры, поскольку, если его разрушить, цитокинез останавливается. Шредер (Schroeder, 1973) предложил модель дробления, согласно которой сократимое кольцо разделяет яйцо подобно «внутриклеточному ремешку, затягивающему кошелек», сокращаясь по мере продвижения процесса деления. Результатом этого сокращения кольца микрофиламентов является образование борозды дробления.

Обычно кариокинез и цитокинез координированы между собой, но в некоторых естественных или экспериментальных условиях они оказываются разъединенными. Было обнаружено (Harvey, 1936), что яйца морского ежа после хирургического удаления ядра могут продолжать делиться вплоть до образования бластулоподобной структуры. (По-видимому, в них со временем истощаются мРНК и белки, запасенные в оогенезе, и дальнейшее развитие станови-

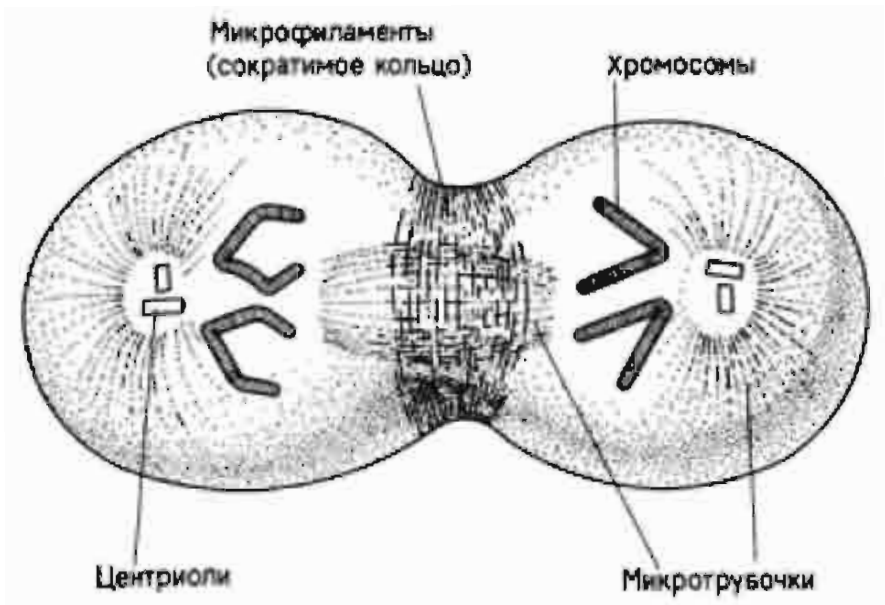


Рис. 3.41. Роль микротрубочек и микрофиламентов в клеточном делении. В представленной здесь телофазной клетке микротрубочки притягивают хромосомы к центриолям, тогда как в результате сокращения микрофиламентов происходит перешнуровывание цитоплазмы.



Рис. 3.42. Кортикальное кольцо микрофиламентов (отмечено стрелкой) вокруг борозды второго деления дробления у *Brachydanio rerio*. (Из Beams, Kessel, 1976; фотография с любезного разрешения авторов.)

тся невозможным без нового процесса транскрипции.) Точно так же кариокинез может происходить при отсутствии клеточных делений. Мы уже говорили о яйцах насекомых, в которых ядра делятся многократно, прежде чем произойдет разделение цитоплазмы на отдельные клетки. Такой же результат может быть получен при обработке зародышей цитохалазином В. Это вещество препятствует образованию микрофиламентами сократимого кольца. Если цитохалазин В добавляют к морской воде до того, как в зиготе морского ежа сформировалось сократимое кольцо, то борозды дробления не возникает. Если добавить его после закладки борозды дробления, то существующее сократимое кольцо дезорганизуется и деление останавливается (Schroeder, 1972). Однако деление ядра при этом не нарушается. Показано (Lillie, 1902; Whittaker, 1979), что при блокировании дробления деления ядер и экспрессия синтезируемых в них регуляторных продуктов продолжаются в положенное время.

Один из наиболее захватывающих нерешенных вопросов, связанных с дроблением зародыша,— это вопрос о том, каким образом достигается координация между цито- и кариокинезом. Механизм такой координации в деталях еще не выяснен, однако существуют три группы данных в пользу того, что локализация борозд дробления определяется положением звезд митотического веретена. Эти звезды (рис. 3.43) образованы «лучами» микротрубочек, отходящими от полюсов митотического веретена к периферии клетки. Одним из указаний на то, что звезды могут контролировать локализацию борозд дробления, является зависимость числа закладывающихся борозд от числа имеющихся звезд. Дробление протекает нормально только в том случае, если яйцо содержит *две* звезды. Если поблизости от периферии клетки звезды отсутствуют, то борозды дробления не возникают. Если вызвать исчезновение звезд (добавляя эфир к морской воде, в которой развиваются зародыши морского ежа), то дробление прекращается (Wilson, 1901); когда зародышей затем переносили в нормальную морскую воду, звезды появлялись вновь и дробление продолжалось. При полиспермном оплодотворении яйца могут образоваться три или четыре звезды. Если возникли три звезды, то появляются три эквидистантные борозды, а при четырех звездах возникают четыре борозды дробления (см. рис. 2.21). Таким образом представляется, что звезды являются sine qua non (непременным условием) дробления.

Вторая группа данных, свидетельствующих в пользу существования зависимости между наличием звезд и образованием борозд дробления, получена в опытах, в которых направление деления изменяется в результате сдавливания яйца. Пфлюгер (Pflüger, 1884) обнаружил, что если зиготы лягушки слегка сдавить между двумя стеклянными пластинками, то направление борозд трех первых делений будет перпендикулярным плоскости пластинок. То же самое наблюдали Дриш и Морган (см. Morgan, 1927) на зародышах морского ежа; в опытах обоих авторов плоскость третьего деления дробления (в норме параллельная экватору ооцита) была смещена на 90°.

Эти и другие эксперименты показали, что сдавливание вызывает вытягивание яйца в плоскости пластинки и что митотические веретена ориентируются по длинной оси клетки. Борозды дробления всегда перпендикулярны веретену, так что, изменяя положение митотического веретена, экспериментатор может изменить локализацию борозды дробления.

Раппапорт (Rappaport, 1961) расширил экспери-

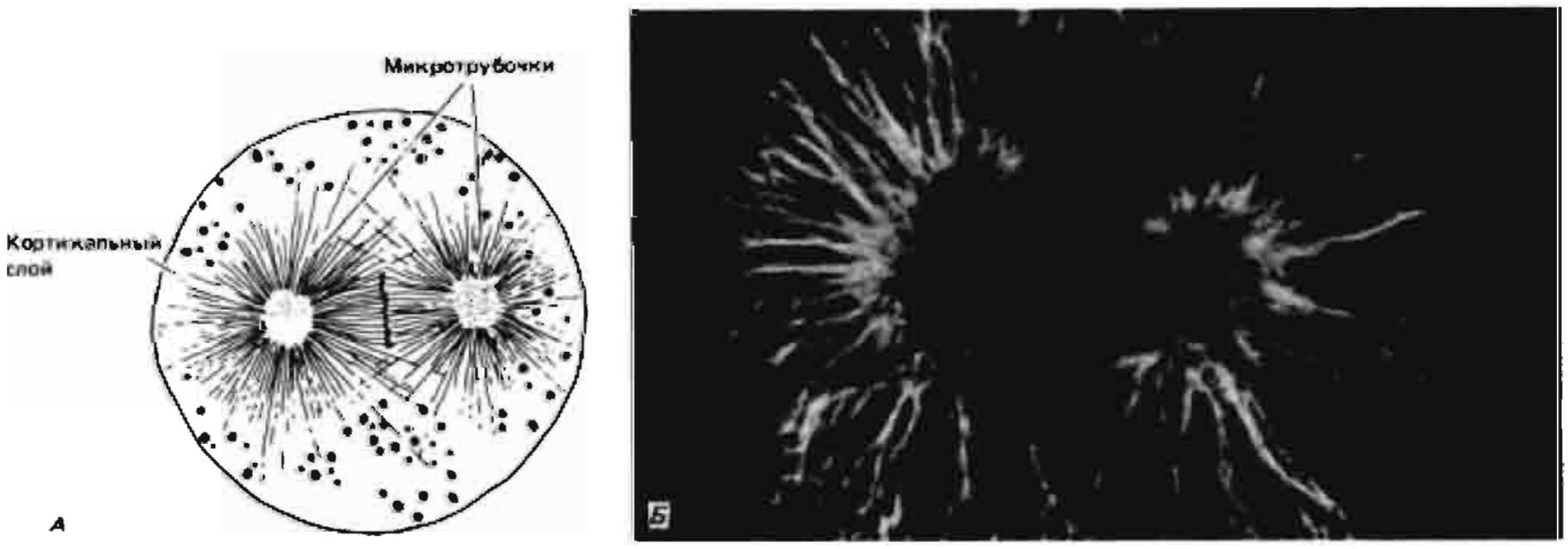


Рис. 3.43. Микротрубочки, идущие от митотических полюсов через цитоплазму к кортикальному слою клетки при первом делении дробления яйца морского ежа. Рисунок *А* сделан почти на 100 лет ранее, чем фотография, представленная на *Б*. (*А* — из Wilson, 1896; *Б* — из White et al., 1987.)

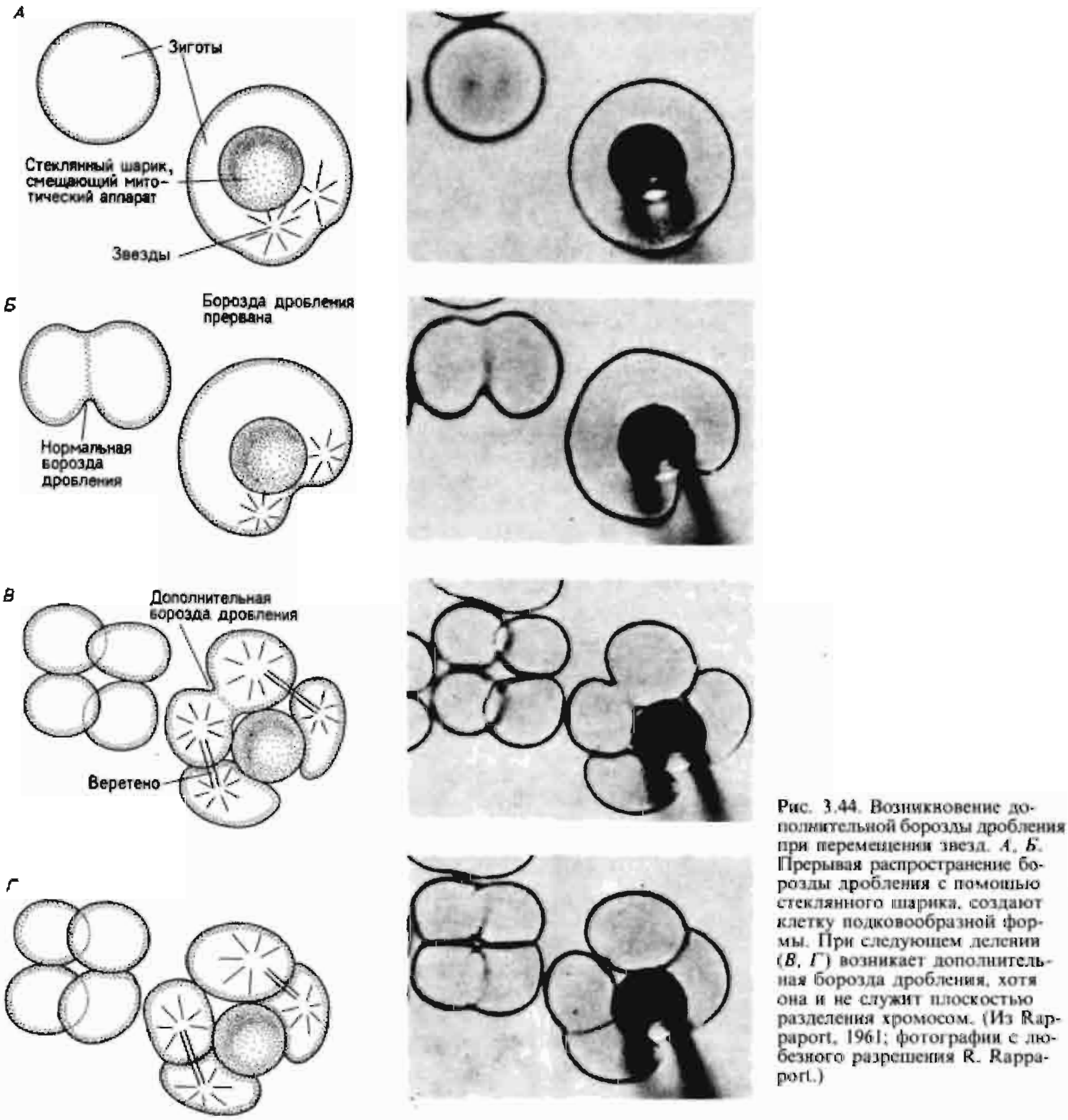


Рис. 3.44. Возникновение дополнительной борозды дробления при перемещении звезд. *А*, *Б*. Прерывая распространение борозды дробления с помощью стеклянного шарика, создают клетку подковообразной формы. При следующем делении (*В*, *Г*) возникает дополнительная борозда дробления, хотя она и не служит плоскостью разделения хромосом. (Из Rapraport, 1961; фотографии с любезного разрешения R. Rapraport.)

менты такого типа, смещая митотические веретена на периферию клеток. В опыте, представленном на рис. 3.44, для этого был использован стеклянный шарик. Образовавшаяся борозда дробления распространялась только до шарика и не переходила на другую его сторону. В результате возникала двухъядерная клетка подковообразной формы. При следующем делении между четырьмя звездами сформировались два веретена, однако возникали три борозды дробления! Каждый конец подковы имел свое собственное митотическое веретено, и там, как и следовало ожидать, закладывалась борозда, но, кроме того, между двумя звездами в средней части подковы возникала *третья* борозда дробления (рис. 3.44, *В*). Это ясно показывает, что если две звезды располагаются достаточно близко друг к другу, то их взаимодействие приводит к образованию борозды дробления даже в отсутствие митотического верете-

на между ними. Здесь мы видим также, что клеточное деление может происходить без разделения ядра, если только имеются звезды.

Образование новых мембран

Рассматривая в общих чертах дробление зародыша, мы говорили об образовании новых клеточных мембран. Синтезируются ли эти мембраны заново или же они образуются просто путем растягивания плазматической мембраны ооцита? Ответ на этот вопрос будет, вероятно, заключаться в том, что оба этих механизма участвуют в образовании внутриклеточных мембран. У морских ежей плазматическая мембрана зиготы продолжается в многочисленные микроворсинки. Во время дробления эти микроворсинки уменьшаются в размерах, по-видимому, в результате растягивания плазматической мембраны яйца при образовании борозд. Однако площади плазматической мембраны недостаточно для того, чтобы обеспечить образование всех мембран, имеющихся к концу дробления. Поэтому можно думать, что происходит и синтез новых мембран.

Данные, свидетельствующие в пользу синтеза компонентов плазматической мембраны на ранних стадиях дробления, были получены на некоторых видах амфибий, яйца которых имеют пигментированный поверхностный слой цитоплазмы. На рис. 3.45, *А* мы видим первую борозду дробления в пигментированной зиготе лягушки. И если ранее существовавшая плазматическая мембрана имеет ассоциированный с ней пигментированный поверхностный слой, то новая мембрана белая. Кроме того, эта новая мембрана по своей электрической проводимости отличается от ранее существовавшей. Эти данные, не являясь решающим доказательством, свидетельствуют в пользу того, что новые плазматические мембраны бластомеров у лягушки даже на стадии первого деления дробления образуются преимущественно путем синтеза.

В связи с формированием большого количества новых мембран возникает важный вопрос: каким образом эти новые формирующиеся мембраны соединяются с существовавшими ранее? Байерс и Армстронг (Byers, Armstrong, 1986) метили радиоактивными соединениями мембранные компоненты яиц *Xenopus laevis* сразу после оплодотворения и прослеживали распределение этих молекул методом радиоавтографии. Во время первого деления мембрана на наружной поверхности зародыша и мембрана ведущего конца борозды дробления были интенсивно мечеными. Обширная область между ними не имела радиоактивной метки (рис. 3.45, *Б*). Следовательно, борозда дробления представляет собой мозаику из различных частей. Мембрана ведущего конца борозды произошла от предсуществовавшего меченого наружного слоя яйца, тогда как бо́льшая часть мембраны борозды образована материалом, который был недоступен при мечении поверхности. Байерс и Армстронг высказали предположение, что интенсивно меченный участок мембраны на ведущем конце борозды содержит структуры, с помощью которых происходит заякоривание расположенного глубже кольца микрофиламентов.

РЕЗЮМЕ

Дробление представляет собой совокупность процессов, результатом которых является превращение оплодотворенного яйца в многоклеточную структуру. Характерные особенности каждого типа дробления зависят от эволюционного пути вида и от способности яиц обеспечить потребности зародыша в питательных веществах. Некоторые животные нуждаются в больших количествах желтка для того, чтобы поддерживать развитие зародыша до его перехода на активное питание, тогда как другие жи-



Рис. 3.45. Образование новых мембран при первом делении дробления яйца *Xenopus*. *А*. С ранее существовавшей мембраной связаны пигментные гранулы. Новая мембрана выглядит светлой, поскольку с ней не связаны такие гранулы. *Б*. Радиоавтограф белков плазматической мембраны в области борозды первого деления дробления. Белки на поверхности яйца до начала деления были маркированы радиоактивной меткой. Видны светлые пятна в областях, содержащих белки, которые до деления находились на поверхности зиготы. (*А* — из de Laat, Bluemink, 1974; *Б* — из Byers, Armstrong, 1986; фотографии с любезного разрешения авторов.)

вотные проходят в своем развитии стадию питающейся личинки, и для них не требуется присутствия большого количество желтка в цитоплазме яйца. У млекопитающих в результате своеобразного типа дробления возникают элементы зачатка плаценты, которая будет снабжать зародыш питательными веществами. За невероятным многообразием типов дробления скрывается, однако, общность функций и механизмов. Во всех случаях кариокинез и цитокинез должны быть координированы и яйцо разделено на клеточные области. В процессе дробления восстанавливается характерное для соматических клеток ядерно-плазменное отношение и важная для развития информация распределяется между разными клеточными областями. В следующей главе речь пойдет о перемещениях и взаимодействиях бластомеров, образовавшихся в период дробления, и о том, как в результате этих процессов возникает основной план строения тела животного.

ЛИТЕРАТУРА

Balinsky B. I. (1981). Introduction to Embryology, 5th Ed. Saunders, Philadelphia.

Barlow P., Owen D. A. J., Graham C. (1972). DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo. J. Embr. Exp. Morphol. **27**, 432—445.

Beams H. W., Kessel R. G. (1976). Cytokinesis: A comparative study of cytoplasmic division in animal cells. Am. Sci. **64**, 279—290.

Biggelaar J. A. M. van der, Guerrier P. (1979). Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusc *Patella vulgata*. Dev. Biol. **68**, 462—471.

Borland R. M. (1977). Transport processes in the mammalian blastocyst. Dev. Mammals **1**, 31—67.

Boycott A. E., Diver C., Garstang S. L., Turner F. M. (1930). The inheritance of sinestrality in *Limnaea peregra* (Mollusca: Pulmonata). Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Series B] **219**, 51—131.

Byers T. J., Armstrong P. B. (1986). Membrane protein redistribution during *Xenopus* first cleavage. J. Cell Biol. **102**, 2176—2184.

Carlson B. M. (1981). Patten's Foundations of Embryology. McGraw-Hill, New York.

Chappelle A. de la, Schroder J., Rantanen P., Thomasson B., Niemi M., Tilikainen A., Sanger R., Robson E. E. (1974). Early fusion of two human embryos? Ann. Human Genet. **38**, 63—75.

Craig M. M., Morrill J. B. (1986). Cellular arrangements and surface topography during early development in embryos of *Ilyanassa obsoleta*. Int. J. Invert. Reprod. Dev. **9**, 209—228.

Crampton H. E. (1894). Reversal of cleavage in a sinistral gastropod. Ann. N. Y. Acad. Sci. **8**, 167—170.

Dan K. (1960). Cytoembryology of echinoderms and amphibia. Int. Rev. Cytol. **9**, 321—367.

Dan-Sohkawa M., Fujisawa H. (1980). Cell dynamics of the blastulation process in the starfish, *Asterina pectinifera*. Dev. Biol. **77**, 328—339.

de Laat S. W., Bluemink J. G. (1974). New membrane formation during cytokinesis in normal and cytochalasin B-treated eggs of *Xenopus laevis*. II. Electrophysical observation. J. Cell Biol. **60**, 529—540.

de Laat S. W., Tertoolen L. G. J., Dorresteijn A. W. C., Biggelaar J. A. M. van der (1980). Intercellular communication patterns are involved in cell determination in early muscular development. Nature **287**, 546—548.

Dulcibella T. (1977). Surface changes of the developing trophoblast cell. In: M. H. Johnson (ed.), Development in Mammals 1. Elsevier North-Holland, New York, pp. 5—30.

Dyce J., George M., Goodall H., Fleming T. P. (1987). Do trophectoderm and inner cell mass cells in the mouse blastocyst maintain discrete lineages? Development **100**, 685—698.

Edgar B. A., Kiehle C. P., Schubiger G. (1986). Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early *Drosophila* development. Cell **44**, 365—372.

Fleming T. P. (1987). Quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. Dev. Biol. **119**, 520—531.

Fleming T. P., Pickering S. J., Qasim F., Maro B. (1986). The generation of cell surface polarity in mouse 8-cell blastomeres: The role of cortical microfilaments analyzed using cytochalasin D. J. Embryol. Exp. Morphol. **95**, 169—191.

Freeman G., Lundelius J. W. (1982). The developmental genetics of dextrality and sinistrality in the gastropod *Limnea peregra*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **191**, 69—83.

Fullilove S. L., Jacobson A. G. (1971). Nuclear elongation and cytokinesis in *Drosophila montana*. Dev. Biol. **26**, 560—577.

Gardiner R. C., Rossant J. (1976). Determination during embryogenesis in mammals. Ciba Found. Symp. **40**, 5—18.

Gerhart J. W., Wu M., Kirschner M. (1984). Cell dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. J. Cell Biol. **98**, 1247—1255.

Giudice A. (1973). Developmental Biology of the Sea Urchin Embryo. Academic, New York.

Graham C. F., Kelly S. J. (1977). Interaction between embryonic cells during early development of the mouse. In: Karkinen-Jaaskelainen, L. Saxén and L. Weiss (eds.), Cell Interactions in Differentiation. Academic, New York, pp. 45—57.

Gulyas B. J. (1975). A reexamination of the cleavage patterns in eutherian mammalian eggs: Rotation of the blastomere pairs during second cleavage in the rabbit. J. Exp. Zool. **193**, 235—248.

Gurdon J. B. (1968). Changes in somatic nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocytes. J. Embryol. Exp. Morphol. **20**, 401—414.

Hara K. (1977). The cleavage pattern of the axolotl egg studied by cinematography and cell counting. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **181**, 73—87.

Hara K., Tydeman P., Kirschner M. W. (1980). A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in *Xenopus* eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 462—466.

Hardin J. D. (1987). Archenteron elongation in the sea urchin embryo is a microtubule independent process. Dev. Biol. **121**, 253—262.

Harland R. M., Laskey R. A. (1980). Regulated replication of DNA microinjected into eggs of *X. laevis*. Cell **21**, 761—771.

Harvey E. G. (1936). Parthenogenetic merogony or cleavage without nuclei in *Arbacia punctulata*. Biol. Bull. **71**, 101—121.

Hinegardner R. T., Rao B., Feldman D. E. (1964). The DNA synthetic period during early development of the sea urchin egg. Exp. Cell Res. **36**, 53—61.

Hillman N., Sherman M. I., Graham C. F. (1972). The effects of spatial arrangement of cell determination during mouse development. J. Embryol. Exp. Morphol. **28**, 263—278.

Hörstadius S. (1939). The mechanics of sea urchin development, studied by operative methods. Biol. Rev. **14**, 132—179.

Hörstadius S. (1973). Experimental Embryology of Echinoderms. Clarendon, Oxford.

Hyafil F., Babinet C., Jacob F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: A molecular approach to the role of calcium. Cell **26**, 447—454.

Ikeda M. (1965). Behaviour of sulfhydryl groups of sea urchin eggs under the blockage of cell division by UV and heat shock. Exp. Cell Res. **40**, 282—291.

Inoué S. (1982). The role of self-assembly in the generation of biologic form. In: S. Subtelny and B. P. Green (eds.), Development Order: Its Origin and Regulation. Alan R. Liss, New York, pp. 35—76.

Johnson M. H., Chakraborty J., Handyside A. H., Willison K., Stern P. (1979). The effect of prolonged decompaction on the development of the preimplantation mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. **54**, 241—261.

Kalt M. R. (1971). The relationship between cleavage and blastocoel formation in *Xenopus laevis*. I. Light microscopic observations. J. Embryol. Exp. Morphol. **26**, 37—49.

Karr T. L., Alberts B. M. (1986). Organization of the cytoskeleton in early *Drosophila embryos*. J. Cell Biol. **102**, 1494—1509.

Karsenti E., Newport J., Hubble R., Kirschner M. (1984). The interconversion of metaphase and interphase microtubule arrays, as studied by the injection of centrosomes and nuclei into *Xenopus* eggs. J. Cell Biol. **98**, 1730—1745.

Kelly S. J. (1977). Studies of the developmental potential of 4- and 8- cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool. **200**, 365—376.

Kemler R., Babinet C., Eisen H., Jacob F. (1977). Surface antigen in early differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4449—4452.

Kimelman D., Kirschner M., Scherson T. (1987). The events of the midblastula transition in *Xenopus* are regulated by changes in the cell cycle. Cell **48**, 399—407.

Langman J. (1981). Medical Embryology. Williams & Wilkins, Baltimore.

Laskey R. A., Mills A. D., Morris N. R. (1977). Assembly of SV40 chromatin in a cell-free system from *Xenopus* eggs. Cell **10**, 237—243.

Levy J. B., Johnson M. H., Goodall H., Maro B. (1986). The timing of compaction: Control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. J. Embryol. Exper. Morphol. **95**, 213—237.

Lillie F. R. (1898). Adaptation in cleavage. In: Biological Lectures of the Marine Biological Laboratory of Woods Hole. Ginn and Co., Boston, pp. 43—67.

Lillie F. R. (1902). Differentiation without cleavage in the egg of the annelid *Chaetopterus pergamentaceous*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **14**, 477—499.

Lutz B. (1947). Trends towards non-aquatic and direct development in frogs. Copeia **4**, 242—252.

Mark W. H., Signorelli K., Lacy E. (1985). An inserted mutation in a transgenic mouse line results in developmental arrest at day 5 of gestation. Cold Spring Harbor symp. Quant. Biol. **50**, 453—463.

Markert C. L., Petters R. M. (1978). Manufactured hexaparental mice show that adults are derived from three embryonic cells. Science **202**, 56—58.

Mayr W. R., Pausch V., Schnedl W. (1979). Human chimaera detectable only by investigation of her progeny. Nature **277**, 210—211.

Meyerhof P. G., Masui Y. (1977). Ca^{++} and Mg^{++} control of cytostatic factor from *Rana pipiens* oocytes which cause metaphase and cleavage arrest. Dev. Biol. **61**, 214—229.

Miake-Lye R., Kirschner M. W. (1985). Induction of early mitotic events in a cell-free system. Cell **41**, 165—175.

Mintz B. (1970). Clonal expression in allophenic mice. Symp. Int. Soc. Cell Biol. **9**, 15.

Morgan T. H. (1927). Experimental Embryology. Columbia University Press, New York.

Mulnard J. G. (1967). Analyse microcinematographique du developpement de l'oeuf de souris du stage II au blastocyste. Arch. Biol. (Liege) **78**, 107—138.

Newport J. W., Kirschner M. W. (1982a). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at midblastula stage. Cell **30**, 675—686.

Newport J. W., Kirschner M. W. (1982b). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: II. Control of the onset of transcription. Cell **30**, 687—696.

Newport J. W., Kirschner M. W. (1984). Regulation of the cell cycle during *Xenopus laevis* development. Cell **37**, 731—742.

Nieuwkoop P. D. (1973). The "organization center" of the amphibian embryo: Its origin, spatial organization, and morphogenetic action. Adv. Morphog. **10**, 1—39.

Pederson R. A., Wu K., Batakier H. (1986). Origin of the inner cell mass in mouse embryos: Cell lineage analysis by microinjection. Dev. Biol. **117**, 581—595.

Perona R. M., Wassarman P. M. (1986). Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophectoderm. Dev. Biol. **114**, 42—52.

Peyrieras N., Hyafil F., Louvard D., Ploegh H. L., Jacob F. (1983). Uvomorulin: A non-integral membrane protein of early mouse embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 6274—6277.

Pflüger E. (1884). Uber die Einwirkung der Schwerkraft und anderer Bedingungen auf die Richtung der Zeiltheilung. Arch. Ges. Physiol. **3**, 4.

Pratt H. P. M., Ziomek Z. A., Reeve W. J. D., Johnson M. H. (1982). Compaction of the mouse embryo: An analysis of its components. J. Embryol. Exp. Morphol. **70**, 113—132.

Rappaport R. (1961). Experiments concerning cleavage stimulus in sand dollar eggs. J. Exp. Zool. **148**, 81—89.

Rugh R. (1967). The Mouse. Burgess, Minneapolis.

Sakai H. (1966). Studies on sulfhydryl groups during cell division of sea urchin eggs. VIII. Some properties of mitotic apparatus proteins. Biochim. Biophys. Acta **112**, 132—145.

Sakai H. (1968). Contractile properties of protein threads from sea urchin eggs in relation to cell division. Int. Rev. Cytol. **23**, 89—112.

Saunders J. W., Jr. (1982). Developmental Biology. Macmillan, New York.

Schroeder T. E. (1972). The contractile ring. II. Determining its brief existence, volumetric changes, and vital role in cleaving *Arbacia* eggs. J. Cell Biol. **53**, 419—434.

Schroeder T. E. (1973). Cell constriction: Contractile role of microfilaments in division and development. Am. Zool. **13**, 687—696.

Seidel F. (1952). Die Entwicklungspotenzen einer isolierten Blastomere des Zweizellenstadiums im Säugetierei. Naturwissenschaften **39**, 355—356.

Strickland S., Reich E., Sherman M. I. (1976). Plasminogen activator in early embryogenesis: Enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. Cell **9**, 231—240.

Sturtevant A. H. (1923). Inheritance of direction of coiling in *Limnaea*. Science **58**, 269—270.

Sutherland A. E., Calarco-Gillam P. G. (1983). Analysis of compaction in the preimplantation mouse embryo. Dev. Biol. **100**, 327—338.

Sze L. C. (1953). Changes in the amount of deoxyribonucleic acid in the development of *Rana pipiens*. J. Exp. Zool. **122**, 577—601.

Tarkowski A. K., Wróblewska J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8- cell stage. J. Embryol. Exp. Morphol. **18**, 155—180.

Torrey T. (1962). Morphogenesis of the Vertebrates. Wiley, New York.

Tuchmann-Duplessis H., David G., Haegel P. (1972). Illustrated Human Embryology. Vol. 1. Springer-Verlag, New York.

Welsh J. H. (1969). Mussels on the move. Nat. Hist. **78**, 56—59.

White J. G., Amos W. B., Fordham M. (1987). An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structu-

res by fluorescence light microscopy. J. Cell Biol. **105**, 41—48.

Whittaker J. R. (1979). Cytoplasmic determinants of tissue differentiation in the ascidian egg. In: S. Subtelny and I. R. Konigsberg (eds.), Determinants of Spatial Organization. Academic Press, New York, pp. 29—51.

Wiley L. M. (1984). Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K ATPase and the origin of nascent blastocoel fluid. Dev. Biol. **105**, 330—342.

Wilson E. B. (1896). The Cell in Development and Inheritance. Macmillan, New York.

Wilson E. B. (1898). Cell lineage and ancestral reminiscences. Biological Lectures of the Marine Biological Laboratory of Woods Hole, Ginn and Co., Boston, pp. 21—42.

Wilson E. B. (1901). Experiments in cytology. II. Some phenomena of fertilization and cell division in etherized eggs. III. The effect on artificial obliteration of the first cleavage furrow. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **13**, 353—395.

Wolpert L., Gustafson T. (1961). Studies in the cellular basis of morphogenesis of the sea urchin embryo: Development of the skeletal pattern. Exp. Cell Res. **25**, 280—300.

Wolpert L., Mercer E. H. (1963). An electron microscopic study of the development of the blastula of the sea urchin embryo and its radial polarity. Exp. Cell. Res. **30**, 280—300.

Zalokar M., Erk I. (1976). Division and migration of nuclei during early embryogenesis of *Drosophila melanogaster*. J. Microsc. Biol. **25**, 97—106.

Ziomek C. A., Johnson M. H. (1980). Cell surface interactions induce polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. Cell. **21**, 935—942.

Глава 4

Гаструляция: перераспределение клеток

Мой дорогой друг, жизнь несравненно причудливее, чем все, что способно создать воображение человека. Нам и в голову не пришли бы многие вещи, которые в действительности представляют собой нечто совершенно банальное.

А. КОНАН ДОЙЛЬ (1891)[1]

Не рождение, супружество или смерть, а гаструляция на самом деле является наиважнейшим событием в вашей жизни.

ЛЬЮИС ВОЛПЕРТ (1893)

Введение: основные черты гаструляции

Гаструляция представляет собой в высшей степени интегрированный процесс миграции клеток и тканей, приводящий к резкому перераспределению клеток бластулы. Бластула состоит из большого числа клеток, локализация которых определяется в период дробления. Во время гаструляции эти клетки занимают новое положение и приобретают новых соседей. В этот период устанавливается план строения многослойного тела животного. Клетки, которые в будущем образуют энтодермальные и мезодермальные органы, попадают внутрь зародыша, тогда как клетки, из которых возникнут кожа и нервная система, распространяются по его поверхности. Таким образом, три зародышевых листка — наружная эктодерма, внутренняя энтодерма и лежащая между ними мезодерма — впервые формируются в процессе гаструляции. Кроме того, в этот период создаются условия для взаимодействия между ними.

Движения гаструляции охватывают всего зародыша, и миграции клеток в одной его части должны быть очень точно координированы с происходящими одновременно движениями в другой. Характер гаструляции в животном царстве необычайно сильно варьирует, однако осуществляется она при участии сравнительно немногочисленных механизмов. Как правило, при гаструляции наблюдается сочетание нескольких основных типов движений:

Эпиболия. Движение эпителиальных пластов клеток (обычно эктодермальных), которые распространяются как одно целое, а не индивидуально и окружают глубокие слои зародыша.

Инвагинация. Впячивание участка клеточной стенки зародыша подобно тому, как вдавливается внутрь мягкая стенка резинового мяча, когда на него нажимают.

Инволюция. Вворачивание внутрь зародыша увеличивающегося в размерах наружного пласта клеток, который распространяется по внутренней поверхности остающихся снаружи клеток.

Интрузия (иммиграция, выселение). Миграция клеток по отдельности из поверхностного слоя внутрь зародыша.

Деламинация. Расщепление единого клеточного пласта на два более или менее параллельных.

Гаструляция охватывает весь зародыш, открывая эмбриологу неповторимое зрелище хорошо оркестрованного движения клеток. Она также дает возможность анализировать механизмы взаимодействия между различными областями зародыша. Поскольку мы рассматриваем феномен гаструляции

---

[1] Цитировано по переводу на русский язык: Артур Конан Дойль, «Установление личности», т. 1, с. 315, М.: Изд-во «Правда», 1966. — *Прим. перев.*

в разных типах зародышей, мы не можем не задуматься над следующими вопросами (Trinkaus, 1984):

1. *Что является единицей миграционной активности?* Зависит ли миграция от движения отдельных клеток или же эти клетки составляют лишь часть мигрирующего пласта? Каким бы ни показалось это на первый взгляд удивительным, но независимые от образования клеток цитоплазматические факторы могут полностью контролировать региональные миграционные свойства цитоплазмы. Ф. Лилли (Lillie, 1902) удалось вызвать партеногенетическую активацию яиц кольчатого червя *Chaetopterus* и подавить в них деление клеток. Однако даже в отсутствие клеток происходили многие события раннего развития. Цитоплазма зиготы делилась на определенные области, и в соответствующих местах дифференцировались реснички. Более того, светлая цитоплазма, локализованная в анимальной области яйца, перемещалась книзу над вегетативными участками, напоминая эпиболию клеток анимального полушария при нормальном развитии. Это движение наблюдалось точно в то время, когда должна была происходить эпиболия у нормального зародыша. Таким образом, эпиболия (по крайней мере в некоторых отношениях) не зависит от формирования клеток, образующих мигрирующую область.
2. *Обусловливают ли растяжение клеточного пласта или образование складки в нем факторы, заключенные в самом пласте, или же эти процессы являются результатом действия внешних сил, растягивающих или разрушающих пласт?* Знать ответ на этот вопрос крайне важно, если мы хотим понять, каким образом интегрируются разные движения гаструляции. Например, втягивают ли вслед за собой клетки, претерпевающие инволюцию, клетки, движущиеся по поверхности, или движения инволюции и эпиболии не зависят одно от другого?
3. *Происходит ли активное распространение всей ткани или активно распространяется только ее ведущий край, а вся остальная часть клеточного пласта тянется за ним пассивно?*
4. *Являются ли изменения в форме и подвижности клеток в период гаструляции результатом изменений в свойствах клеточной поверхности, таких, как адгезивность к субстрату или другим клеткам?* Эти изменения включают в себя взаимоотношения одних клеток с другими и с окружающей их внеклеточной средой.
5. *Как эти изменения проявляются на внутриклеточном уровне? Необходима ли реорганизация массы микротрубочек или микрофиламентов для начала миграции клеток?*

Помня об этих вопросах, рассмотрим теперь различные формы гаструляции у иглокожих, амфибий, птиц и млекопитающих [1].

Гаструляция у морского ежа

Бластула у морского ежа образована одним слоем, содержащим от 1000 до 2000 клеток. Эти клетки, происходящие из разных участков зиготы, различаются по своим размерам и свойствам. На рис. 4.1 показана судьба различных участков зиготы на разных стадиях развития, начиная со стадий дробления и гаструляции и кончая характерной для морского ежа личинкой **плутеусом**. На этом рисунке можно также проследить судьбу каждого клеточного слоя по его движениям в период гаструляции.

Выселение первичной мезенхимы

Примерно через 24 ч после вылупления бластулы из оболочки оплодотворения вегетативный участок стенки сферической бластулы начинает уплощаться. В центре этой плоской **вегетативной пластинки** находится скопление мелких клеток, на поверхности которых, обращенной в бластоцель, появляются длинные тонкие (30 × 5 мкм) выросты, называемые **филоподиями**. Растягиваясь и сокращаясь, филоподии совершают пульсирующие движения. Затем клетки отделяются друг от друга и мигрируют в бластоцель. Они называются **первичной мезенхимой** и происходят из микромеров (рис. 4.2).

Густафсон и Волперт (Gustafson, Wolpert, 1961) с помощью цейтраферной киносъемки проследили под микроскопом движения этих клеток в бластоцеле. Сначала движения мезенхимных клеток вдоль [illegible] клеток бластоцеля имеют, вероятно, случайный характер. С помощью филоподий они то активно устанавливают связь со стенками бластоцеля, то прекращают ее. В конце концов эти клетки локализуются в центральной области бластоцеля, где контакты их филоподий со стенкой бластоцеля, по-видимому, становятся наиболее прочными. Затем клетки первичной мезенхимы сливаются в **синцитиальные тяжи** (позже они будут называться скелетными иглами), которые образуют впоследствии оси известковых спикул личиночного скелета (рис. 4.3).

События, происходящие в цитоплазме и на поверхности клеток, являются ключевыми для выселения и миграции первичных мезенхимных клеток. Густафсон и Волперт (Gustafson, Wolpert, 1967) предложили модель, согласно которой иммиграция микромеров происходит благодаря изменениям их адгезивных

[1] Обсуждение гаструляции у дрозофилы отложено до гл. 18, в которой она рассматривается в связи с формированием характерных черт развития у этих насекомых.

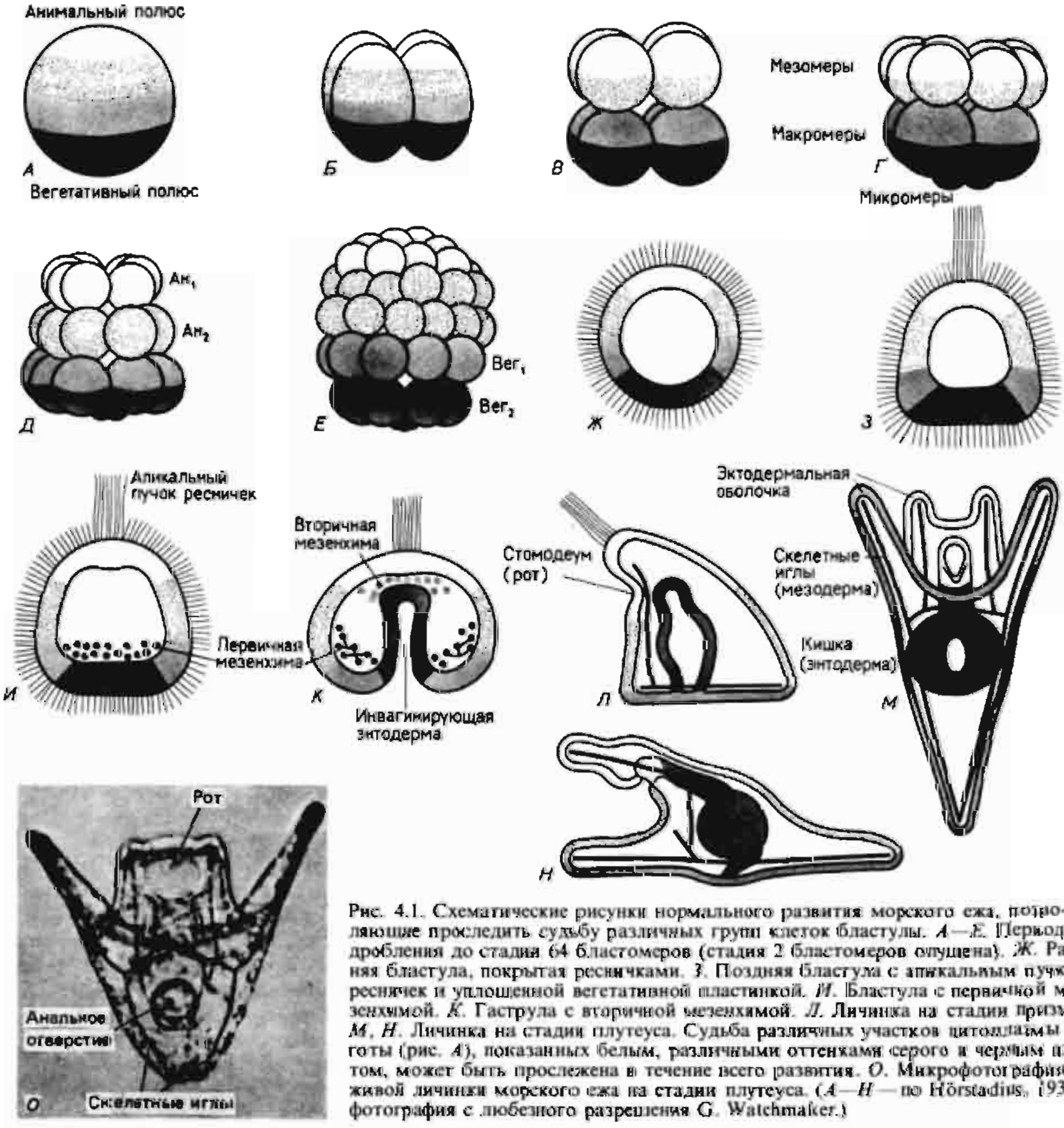


Рис. 4.1. Схематические рисунки нормального развития морского ежа, позволяющие проследить судьбу различных групп клеток бластулы. *А*—*Е*. Период дробления до стадии 64 бластомеров (стадия 2 бластомеров опущена). *Ж*. Ранняя бластула, покрытая ресничками. *З*. Поздняя бластула с аликальным пучком ресничек и уплощенной вегетативной пластинкой. *И*. Бластула с первичной мезенхимой. *К*. Гаструла с вторичной мезенхимой. *Л*. Личинка на стадии призмы. *М*, *Н*. Личинка на стадии плутеуса. Судьба различных участков цитоплазмы зиготы (рис. *А*), показанных белым, различными оттенками серого и черным цветом, может быть прослежена в течение всего развития. *О*. Микрофотография живой личинки морского ежа на стадии плутеуса. (*А*—*Н* — по Hörstadius, 1939; фотография с любезного разрешения G. Watchmaker.)

свойств по отношению к другим клеткам и окружающему их внеклеточному матриксу. Первоначально все клетки бластулы соединены по своей наружной поверхности с **гиалиновым слоем** (возникающим при оплодотворении из кортикальных гранул), а по внутренней — с **базальной мембраной** (внеклеточным матриксом, секретируемым клетками). Внеклеточный матрикс нельзя увидеть в световом микроскопе, но его можно обнаружить с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 4.4). С боковых сторон каждая клетка имеет в качестве соседа другую клетку. Фink и Мак-Клей (Fink, McClay, 1985) подтвердили предположение Густафсона и Волперта, измерив силу адгезии бластомеров морского ежа с гиалиновым слоем, базальной мембраной и с другими клетками. Они обнаружили, что потомки макромеров и мезомеров очень прочно связаны друг с другом и с гиалиновым слоем, но



Рис. 4.2. Мезенхимная бластула морского ежа *S. purpuratus*. (С любезного разрешения M. Harkey.)





Рис. 4.3. Формирование синцитиальных тяжей и скелетных игл из мезенхимных клеток у морского ежа *S. purpuratus*. *А*. Мезенхимные клетки выстраиваются в одну линию и сливаются, секретируя затем матрикс известковой спикулы. *Б*. Изолированные мезенхимные клетки, образующие скопления (фотография получена с помощью фазово-контрастного микроскопа). *В*. Тот же участок (микрофотография в поляризованном свете); видны спикулы, формирующиеся в скоплениях клеток. (Из Harkey, Whiteley, 1980; фотографии с любезного разрешения авторов).

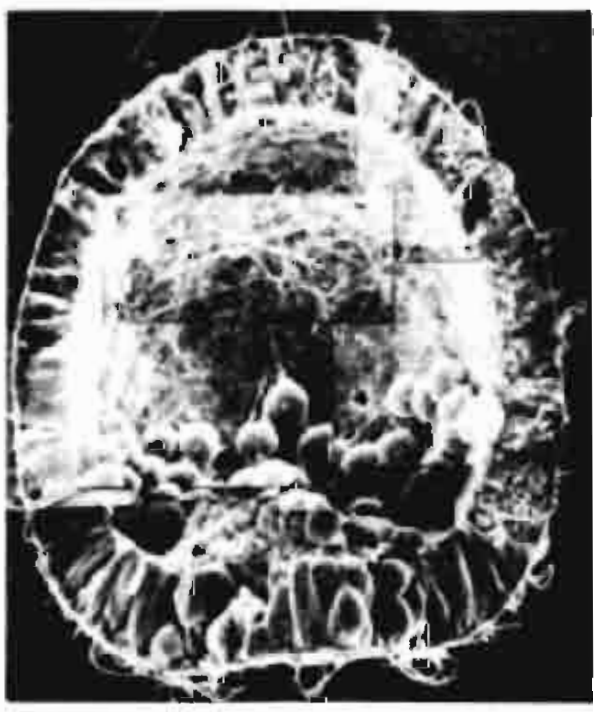


Рис. 4.4. Мезенхимная бластула *Lytechinus variegatus*; видны гиалиновый слой (снаружи) и обширная базальная мембрана в бластоцеле. Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Morrill, 1986; фотография с любезного разрешения J. B. Morrill.)

очень рыхло — с базальной мембраной (табл. 4.1). Характер связывания микромеров на стадии бластулы вначале был сходным. Однако в ходе гаструляции адгезивные свойства микромеров менялись. И если другие клетки сохраняли плотную связь с гиалиновым слоем и с соседними клетками, то микромеры гаструлы теряли свое сродство к этим структурам (оно уменьшалось до 2% первоначального значения), а сродство к базальной мембране *увеличивалось* в 100 раз. Эти изменения свойств микромеров приводят к тому, что они открепляются от наружного гиалинового слоя и от своих соседей и, притягиваемые базальной мембраной, мигрируют в бластоцель (рис. 4.5). Изменения в сродстве коррелировали

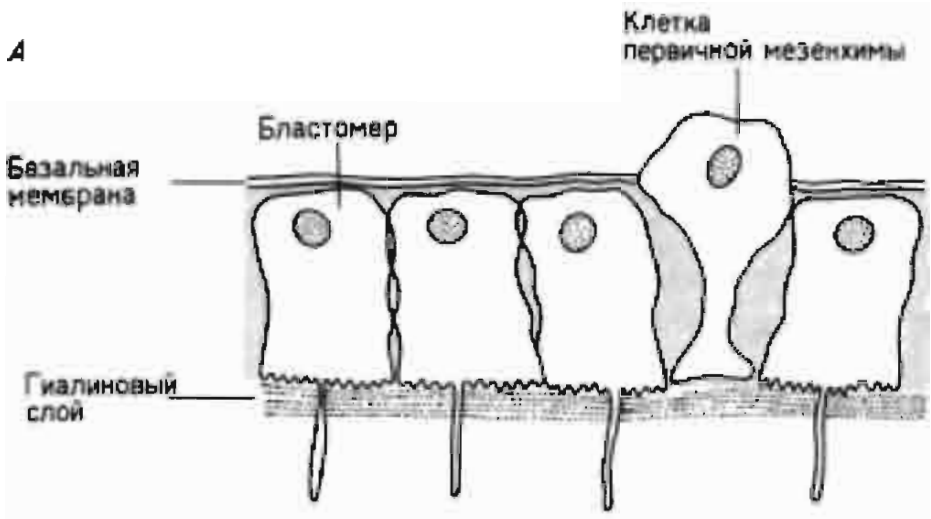




Рис. 4.5. Выселение клеток первичной мезенхимы. *А*. Схематический рисунок, иллюстрирующий изменения адгезивных свойств презумптивных клеток первичной мезенхимы. Клетки теряют сродство к гиалину и к соседним с ними бластомерам, сродство же клеток к базальной мембране, напротив, увеличивается. *Б*. Иммиграция клеток первичной мезенхимы у *Lytechinus variegatus*. (Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). (*А* — из Fink, McClay, 1985; *Б* — с любезного разрешения J. B. Morrill, D. Flaherty.)

Таблица 4.1. Сродство мезенхимных и немезенхимных клеток к клеточным и неклеточным компонентам[1] (Fink, McClay, 1985)

Тип клеток	Сила смещения, дин		
	Гиалин	Монослои клеток гаструлы	Материал базальной мембраны
Микромеры со стадии 16 клеток	$5{,}8 \times 10^{-5}$	$6{,}8 \times 10^{-5}$	$4{,}8 \times 10^{-7}$
Стадия миграции мезенхимных клеток	$1{,}2 \times 10^{-7}$	$1{,}2 \times 10^{-7}$	$1{,}5 \times 10^{-5}$
Эктодерма и энтодерма гаструлы	$5{,}0 \times 10^{-5}$	$5{,}0 \times 10^{-5}$	$5{,}0 \times 10^{-7}$

[1] Клетки помещали на пластинки, на которых находились либо гиалин, либо материал базальной мембраны, либо клеточные монослои. После прилипания клеток к субстрату пластинки переворачивали и центрифугировали с разной скоростью, чтобы вызвать смещение этих клеток. Силу, требующуюся для их смещения, вычисляли по скорости центрифугирования, необходимой для удаления испытуемых клеток с субстрата.

с происходившими в это время изменениями в составе молекул клеточной поверхности. Антиген клеточной поверхности, Мезо 1, обнаруживался точно тогда, когда наблюдалась миграция мезенхимных клеток из стенки бластулы (рисунок на внутренней стороне обложки).

Как видно из рис. 4.4, вокруг вселяющихся в бластоцель клеток первичной мезенхимы концентрируется внеклеточный матрикс (Galileo, Morrill, 1985). Кроме того, попав внутрь бластоцеля, первичные мезенхимные клетки с помощью филоподий мигрируют по внеклеточному матриксу (рис. 4.6; Galileo, Morrill, 1985; Karp, Solursh, 1985). По-видимому, для их миграции важны два белка. Один из них — **фибронектин**, высокомолекулярный (400 000 дальтон) гликопротеин, который является обычным компонентом базальных мембран, в том числе и базальной мембраны у морского ежа (Wessel et al., 1984). Финк и Мак-Клей (Fink, McClay, 1985) показали, что во время гаструляции сродство микромеров к этому белку резко возрастает, а Като и Хайяши (Katoh, Hayashi, 1985) обнаружили, что миграция мезенхимных клеток зависит от концентрации фибронектина. Второй набор молекул — это сульфатированные гликопротеины, обнаруженные на клеточной поверхности выселяющихся в бластоцель мезенхимных клеток (Sugiyama, 1972; Heifetz, Lennarz, 1979). Если синтез (или сульфатирование) этих гликопротеинов подавлен, то мезенхимные клетки будут выселяться в бластоцель, но не станут двигаться в нем (Karp, Solursh, 1974; Anstrom et al., 1987; рис. 4.7).

Гиббинс и др. (Gibbins et al., 1969) показали, что для формирования и миграции мезенхимных клеток чрезвычайно важное значение имеет ориентация микротрубочек. В клетках ранней бластулы микротрубочки распределены асимметрично вдоль длинной оси клетки (рис. 4.8). По мере того как клетки первичной мезенхимы приобретают амебоидную форму и теряют контакт с бластодермой, микротрубочки

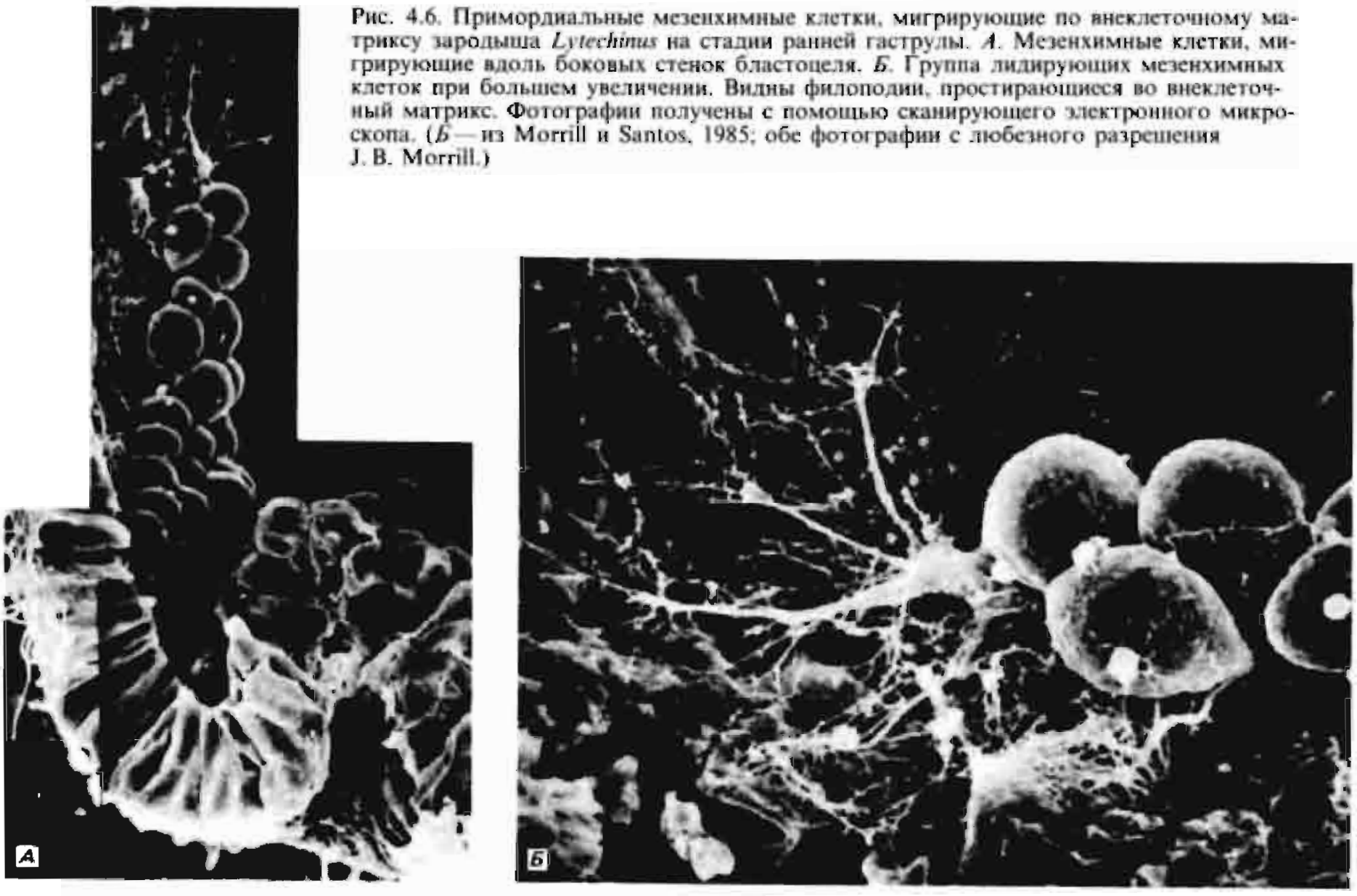


Рис. 4.6. Примордиальные мезенхимные клетки, мигрирующие по внеклеточному матриксу зародыша *Lytechinus* на стадии ранней гаструлы. *А*. Мезенхимные клетки, мигрирующие вдоль боковых стенок бластоцеля. *Б*. Группа лидирующих мезенхимных клеток при большем увеличении. Видны филоподии, простирающиеся во внеклеточный матрикс. Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (*Б* — из Morrill и Santos, 1985; обе фотографии с любезного разрешения J. B. Morrill.)

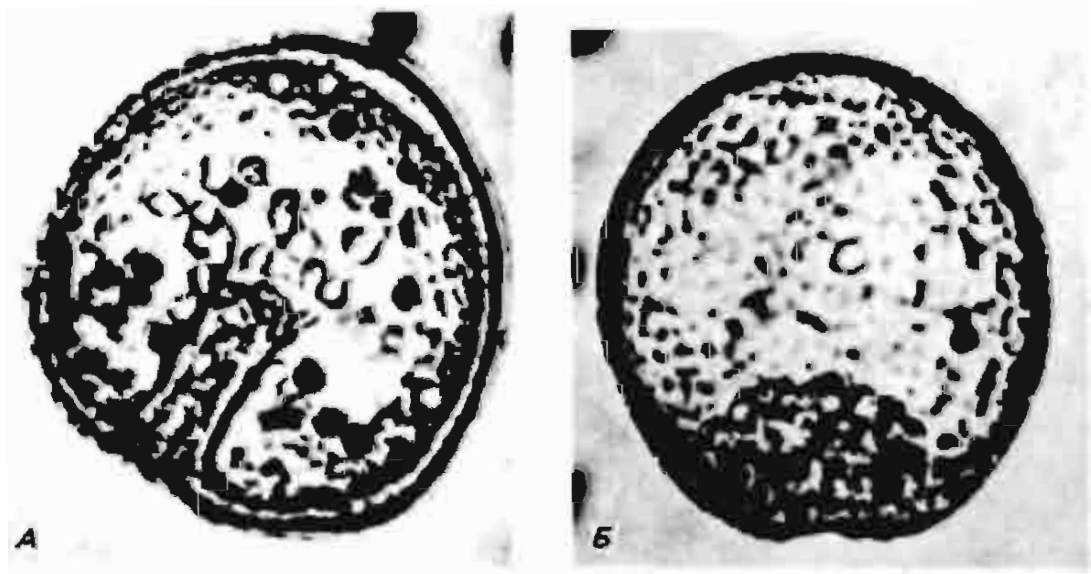


Рис. 4.7. Влияние отсутствия сульфата на движение клеток первичной мезенхимы у морского ежа *Lytechinus*. *А*. Нормальная гаструла. *Б*. Аномальная гаструла, образующаяся при инкубации яиц в морской воде без сульфата. (Из Karp, Solursh, 1974; фотографии с любезного разрешения M. Solursh.)

утрачивают свою ориентацию и их расположение становится случайным. Микротрубочки перемещаются в область филоподий мигрирующих клеток и позже обнаруживаются в синцитиальных тяжах. Если эти микротрубочки разрушить (например, колхицином), то мезенхимные клетки теряют свои филоподиальные отростки и миграция прекращается (Tilney, Gibbins, 1969).

Первая фаза инвагинации

Пока в вегетативной области бластоцеля формируется кольцо клеток первичной мезенхимы, в клетках, которые остаются в вегетативной пластинке, происходят важные изменения. Эти клетки связаны между собой и с гиалиновым слоем яйца и движутся, чтобы заполнить пространства, образованные в ре-

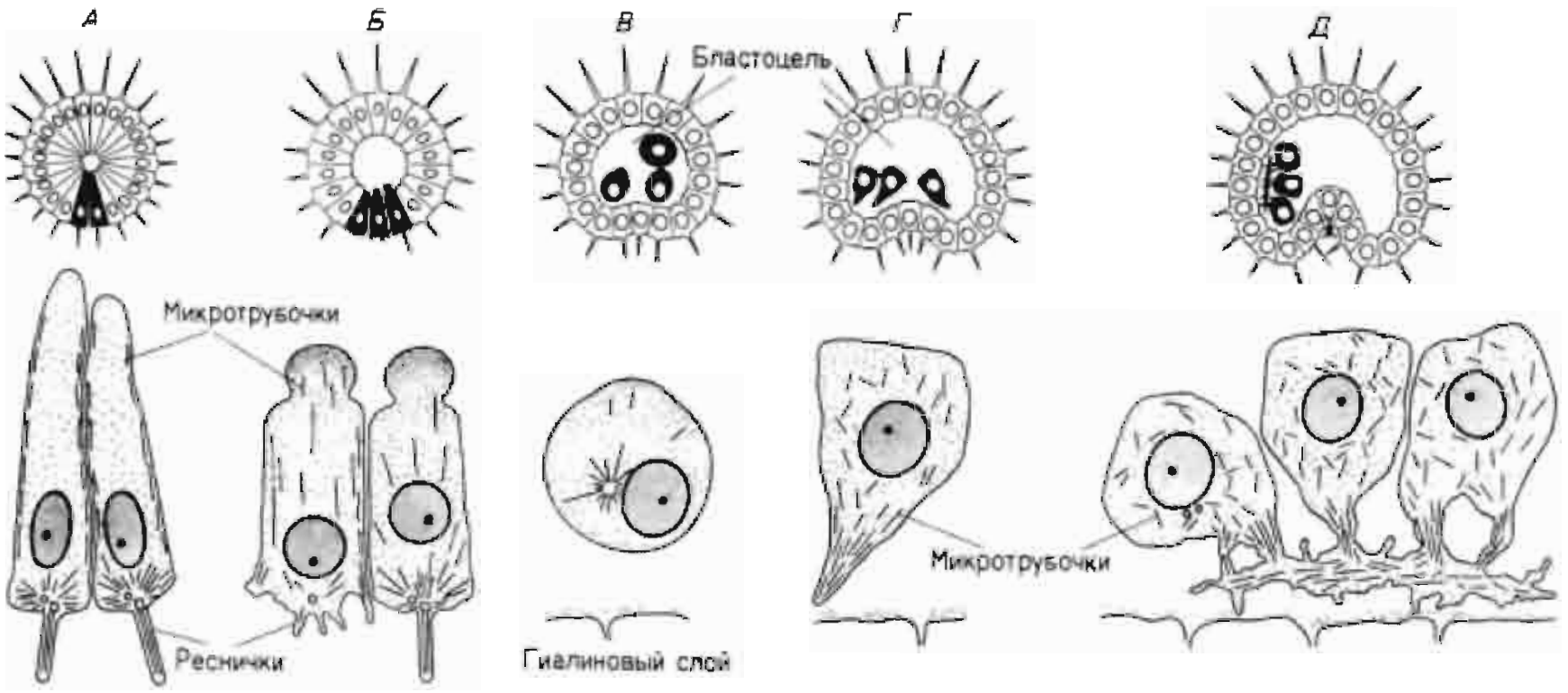


Рис. 4.8. Схематические рисунки, иллюстрирующие выселение клеток первичной мезенхимы (обозначены черным цветом; более детальные изображения даны в нижнем ряду рисунков) и переориентацию микротрубочек. *А*. Ранняя бластула. Микротрубочки ориентированы параллельно длинной оси клеток, на дистальных концах клеток образовались реснички. *Б*. Поздняя бластула. Реснички исчезают, и клетки начинают округляться. *В*. Мезенхимная бластула. Микромеры отделяются от гиалинового слоя и проникают в бластоцель. *Г*. Ранняя гаструла с подвижными клетками. *Д*. Средняя гаструла. Формируется синцитий; отложение скелетного матрикса еще не началось. (По Gibbins et al., 1969.)

зультате иммиграции мезенхимы; поэтому пластинка продолжает уплощаться. Далее она изгибается и впячивается в бластоцель примерно на 1/4—1/2 своего пути (рис. 4.9). Затем инвагинация внезапно прекращается. Инвагинировавшая область называется **архентероном** или **гастроцелем**, а отверстие архентерона в вегетативной области называется **бластопором**.

Эта первая фаза инвагинации вегетативной пластинки, по-видимому, обусловлена силами, заключенными в самой вегетативной пластинке, и никак не связана с давлением клеток, лежащих над нею. Мур и Барт (Moore, Burt, 1939) разрезали зародышей иглокожих на анимальную и вегетативную половины. Вегетативная половина начинала инвагинировать даже в отсутствие анимальной половины. Инвагинация при этом достигала только 1/4—1/3 расстояния до анимального полюса, т. е. была примерно такой же величины, как и на первой фазе инвагинации при нормальном развитии (рис. 4.10). По мере того как впячивание углублялось, края разреза вегетативной половины вворачивались внутрь и сливались, так что в результате формировалась миниатюрная «гаструла».

Предположение Мура (Moore, 1941), что эта фаза инвагинации обусловлена различиями в когезивности клеток, получило поддержку в исследованиях Густафсона и Волперта (Gustafson, Wolpert, 1961), про-

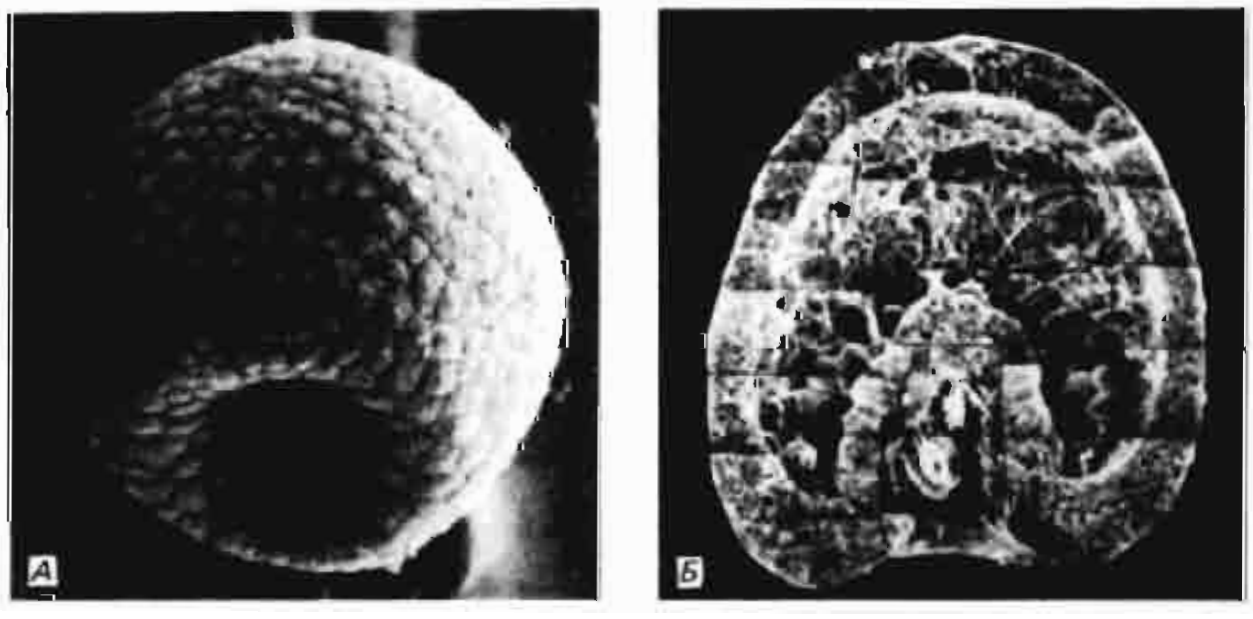


Рис. 4.9. Инвагинация вегетативной пластинки у *Lytechinus variegatus*. *А*. Наружная поверхность ранней гаструлы; можно различить отдельные клетки, видна инвагинация вегетативной пластинки (фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). *Б*. Монтаж фотографий, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа. Изображен поперечный срез через центр зародыша. На этом срезе видны клетки первичной мезенхимы, мигрирующие по внеклеточному матриксу. (Из Morrill, Santos, 1985; фотографии с любезного разрешения J. B. Morrill.)

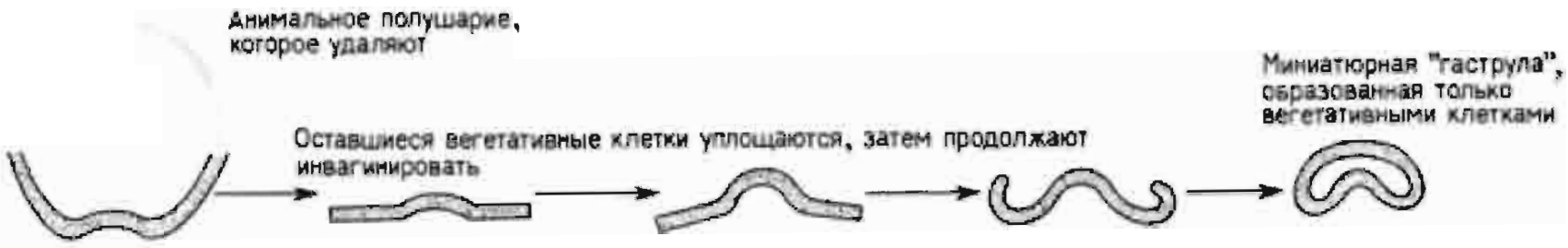


Рис. 4.10. Инвагинация вегетативной пластинки в отсутствие анимального полушария. У морской звезды *Patiria* на стадии гаструлы были изолированы вегетативные участки. Они с успехом инвагинировали, не будучи прикрепленными к анимальному полушарию. (По Moore, Burt, 1939.)

веденных с помощью нейтраферной съемки. Их фильм показал, что цилиндрические клетки вегетативной пластинки утрачивают свой контакт с другими клетками и с гиалиновым слоем; это изменение приводит к увеличению поверхности клеточного пласта. Авторы полагают, что очень плотный контакт между клетками вегетативной пластинки по их внутренней поверхности вызывает изгиб пластинки внутрь, а не наружу.

Вторая фаза инвагинации

Инвагинация клеток вегетативной половины разделяется на две отчетливо различающиеся фазы. После короткой паузы начинается вторая фаза формирования архентерона. В течение этой фазы происходит чрезвычайно резкое удлинение архентерона, его длина почти утраивается, и короткий широкий зачаток архентерона трансформируется в длинную тонкую трубку; однако при этом не заметно, чтобы формировались новые клетки. Такое растяжение обусловлено перераспределением его клеток посредством миграции одних клеток по другим и их уплощения (Ettensohn, 1985; Hardin, Cheng, 1986). У некоторых (но не у всех) видов морских ежей (Schroeder, 1981; Trinkaus, 1984) направление, в котором удлиняется гастроцель, может быть задано **клетками вторичной мезенхимы**, которые формируются на верхушке архентерона и остаются там (рис. 4.11). Филоподии этих клеток, простираясь через жидкость, содержащуюся в бластоцеле, устанавливают контакт с поверхностью его внутренней стенки. Они прикрепляются к стенке в промежутках между клетками бластодермы и затем укорачиваются.

Когда передний край архентерона приближается к стенке бластоцеля в анимальной области, клетки

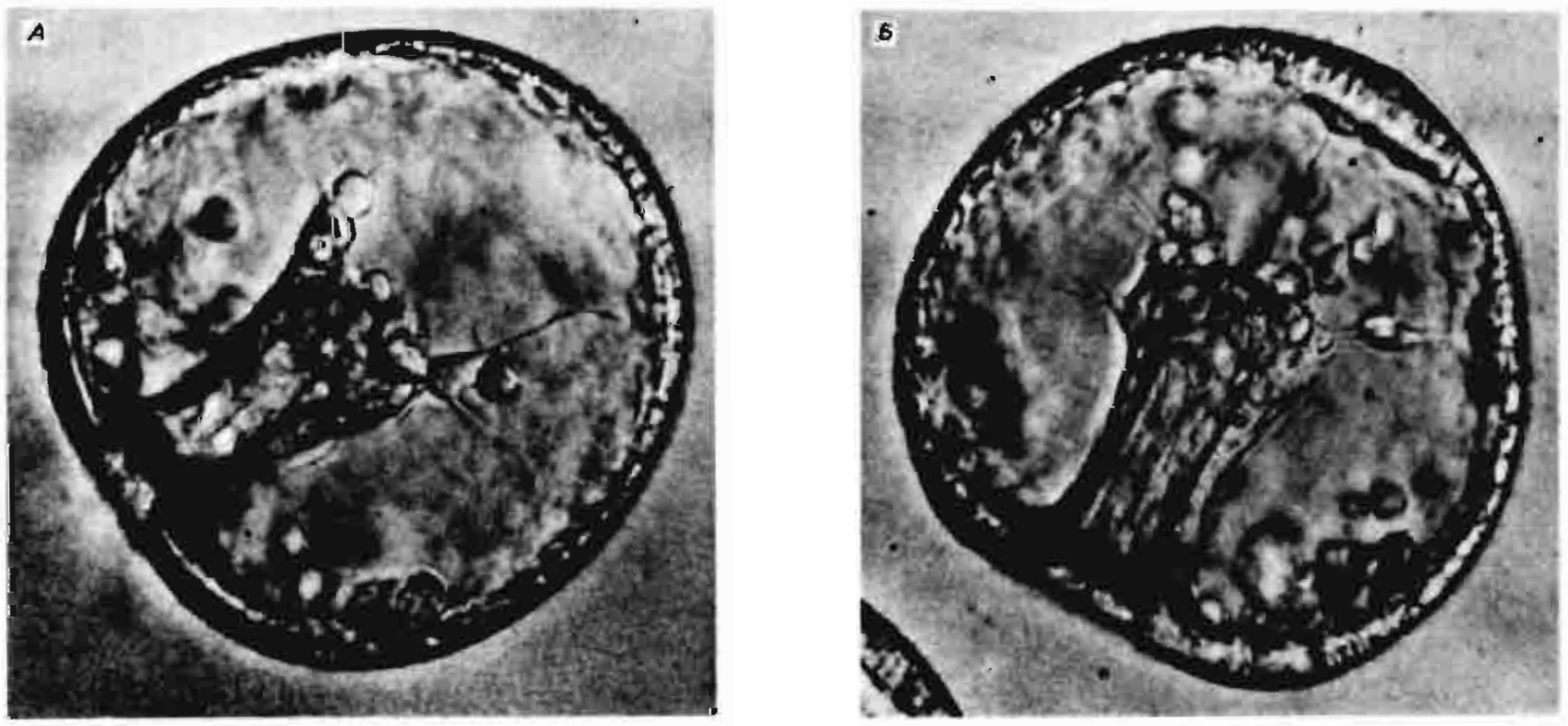


Рис. 4.11. Зародыш морского ежа *Lytechinus pictus* на стадии средней гаструлы. Можно видеть филоподиальные отростки клеток вторичной мезенхимы, тянущиеся от верхушки гастроцеля к наружной стенке бластоцеля. *А.* Мезенхимные клетки с филоподиями, простирающимися от верхушки гастроцеля в бластоцель. *Б.* Тяжи филоподий, соединяющие верхушку гастроцеля с наружной стенкой бластоцеля. О натяжении филоподий можно судить по уплощению стенки бластоцеля в месте их прикрепления. (Фотографии с любезного разрешения С. Ettensohn.)

вторичной мезенхимы рассеиваются в бластоцеле, где происходит их пролиферация, необходимая для формирования ими мезодермальных органов. На месте контакта архентерона со стенкой бластоцеля со временем формируется ротовое отверстие, которое, сливаясь с архентероном, образует непрерывную пищеварительную трубку. Таким образом, бластопор, как это характерно для вторичноротых, маркирует положение ануса.

При гаструляции у морского ежа наблюдается сочетание нескольких процессов, а именно иммиграции мезенхимных клеток, независимой инвагинации клеток вегетативной пластинки и дальнейшей инвагинации архентерона, опосредованной перераспределением клеток эпителиального пласта.

Гаструляция у амфибий

Изучение гаструляции у амфибий является одной из старейших и вместе с тем одной из новейших областей экспериментальной эмбриологии; гаструляция у амфибий широко изучалась в течение прошлого столетия, однако бо́льшая часть наших теорий, касающихся механизмов этих морфогенетических движений, была пересмотрена в семидесятые годы. Изучение гаструляции у амфибий осложняется тем, что строение зародышей бесхвостых и хвостатых амфибий на этих стадиях несколько различается и они используют разные средства для достижения одной и той же цели (Smith, Malacinski, 1983; Lundmark, 1986). В последние годы наиболее интенсивные исследования проводились на *Xenopus laevis* (гладкой шпорцевой лягушке), поэтому мы сконцентрируем внимание на способе гаструляции у этого вида.

Подготовка клеток к гаструляции осуществляется в период дробления. Как упоминалось в гл. 3, у амфибий на стадии перехода к средней бластуле происходит перестройка клеточного цикла, он замедляется (в результате включения в него фаз G_1 и G_2), деления клеток становятся асинхронными, клетки приобретают способность перемещаться, и впервые в жизни животного в ядрах клеток происходит транскрипция новых мРНК. У *Xenopus laevis* эта перестройка начинается непосредственно после 12-го деления дробления (Newport, Kirschner, 1982).

Движения клеток в период гаструляции у амфибий: обзор

Перед бластулой амфибий встают те же задачи, что и перед бластулой иглокожих, а именно: нужно привести внутрь зародыша области, предназначенные для образования энтодермальных органов, окружить зародыш клетками, способными к формированию эктодермы, и поместить между ними в надлежащие места мезодермальные клетки. Движения, посредством которых это достигается, могут быть визуализированы методом витального окрашивания. В. Фогт (Vogt, 1929) насыщал кусочки агара красителями, такими, как нейтральный красный или нильский голубой сернокислый, которыми можно окрашивать клетки зародыша, не повреждая их. Окрашенные кусочки агара затем помещали на поверхность бластулы, и часть красителя из них переходила в клетки, контактирующие с этими кусочками (рис. 4.12). Движения каждой группы окрашенных клеток были прослежены в течение периода гаструляции и результаты этих движений суммированы в форме **карты презумптивных зачатков**. Эти карты недавно подтверждены результатами наблюдений с помощью сканирующего электронного микроскопа и методом инъекции красителей (Smith, Malacinski, 1983; Lundmark, 1986).

Исследования Лёвтрупа (Løvtrup, 1975; Landstrom, Løvtrup, 1979) и Келлера (Keller, 1975, 1976) с использованием витальных красителей показали, что клетки бластулы шпорцевой лягушки имеют разную судьбу в зависимости от того, находятся ли они в глубоком или в поверхностном слоях зародыша (рис. 4.13). У шпорцевой лягушки (но не у аксолотля или некоторых других амфибий) предшественники мезодермы находятся в глубоком слое клеток, тогда как эктодерма и энтодерма происходят из наружного слоя клеток зародыша. Предшественники хорды и других мезодермальных тканей локализованы под поверхностью в экваториальной (маргинальной, или краевой) области зародыша. У хвостатых амфибий (таких, как тритоны или аксолотли) предшественники хорды и мезодермы обнаружены как в поверхностных, так и в глубоких краевых клетках (Landstrom, Løvtrup, 1979; Keller, 1976).

У зародышей лягушки гаструляция начинается на будущей спинной стороне зародыша, чуть ниже экватора, в области серого серпа (рис. 4.14). Здесь происходит инвагинация энтодермальных клеток с образованием бластопора. Форма этих клеток чрезвычайно резко изменяется. Основная часть тела каждой клетки смещается внутрь зародыша, сохраняя в то же время контакт с наружной поверхностью посредством узкого цитоплазматического тяжа (рис. 4.15). Эти **колбовидные клетки** окаймляют зачаток архентерона. Следовательно, как и у морского ежа, инвагинация клеток инициирует формирование гастроцеля. Однако в отличие от морского ежа гаструляция у амфибий начинается не в центре вегетативной области, а **в краевой зоне** вблизи экватора бластулы. Здесь энтодермальные клетки не столь велики и не содержат так много желтка, как большинство вегетативных бластомеров.

Следующая фаза гаструляции включает в себя инволюцию клеток краевой зоны: клетки анимальной области в это время распространяются посредст-

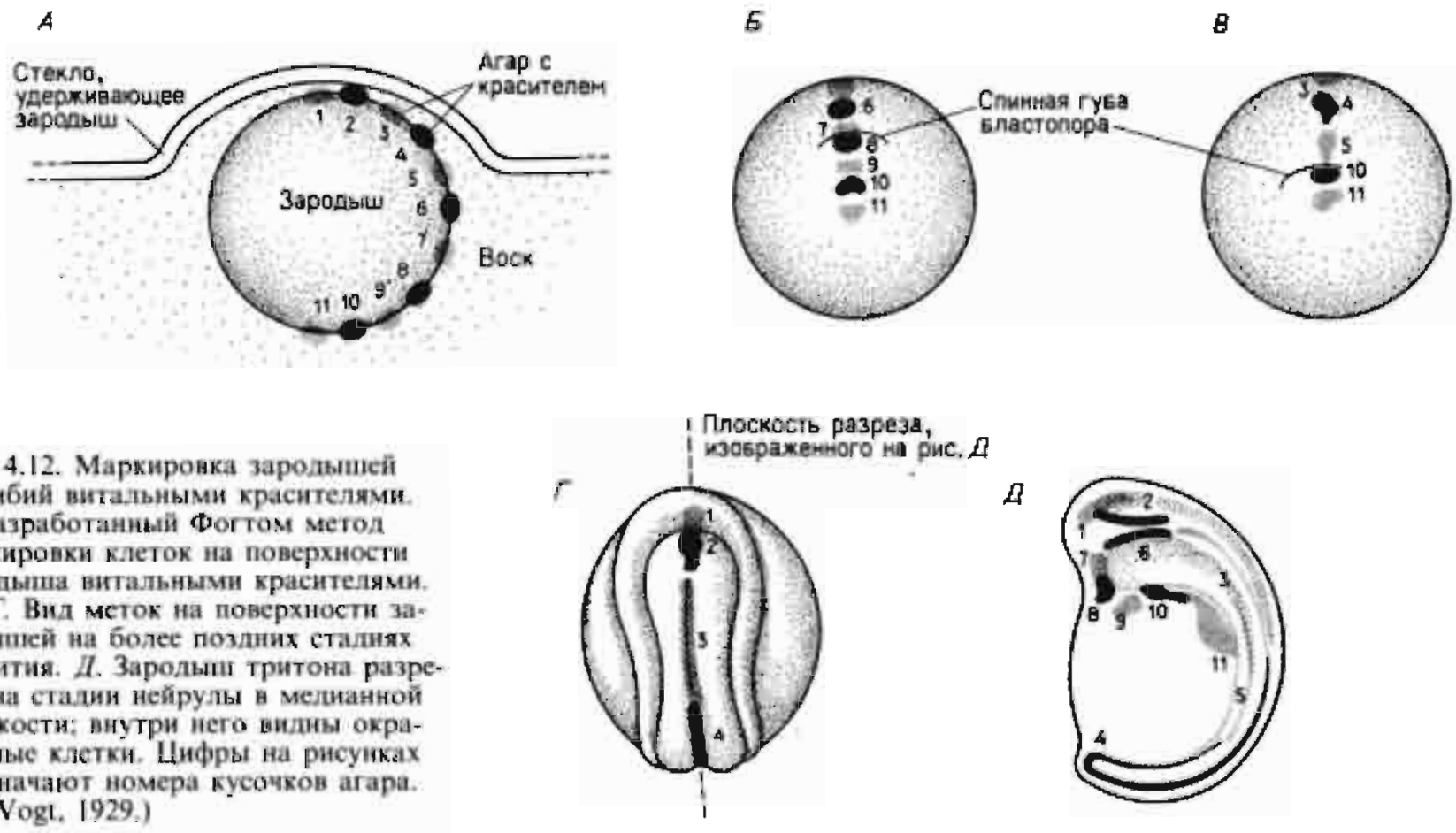


Рис. 4.12. Маркировка зародышей амфибий витальными красителями. *А*. Разработанный Фогтом метод маркировки клеток на поверхности зародыша витальными красителями. *Б—Г*. Вид меток на поверхности зародышей на более поздних стадиях развития. *Д*. Зародыш тритона разрезан на стадии нейрулы в медианной плоскости; внутри него видны окрашенные клетки. Цифры на рисунках обозначают номера кусочков агара. (По Vogt, 1929.)

вом эпиболии, смещаясь к бластопору. Достигнув губы бластопора, мигрирующие клетки краевой зоны вворачиваются внутрь и перемещаются по внутренней поверхности клеток наружного пласта. Таким образом клетки, образующие губу бластопора, постепенно меняются. Первыми клетками в составе спинной губы бластопора являются энтодермальные (материал прехордальной пластинки), которые, инвагинируя, образуют ведущий край архентерона. Эти клетки позже становятся клетками глоточного отдела передней (головной) кишки. После того как эти первые клетки переходят внутрь зародыша, спинная губа бластопора оказывается образованной инволюирующими клетками, впоследствии дающими начало мезодерме головы. Следующие клетки, вворачивающиеся через спинную губу бластопора, называются **клетками хордомезодермы**. Эти клетки будут формировать хорду — временный мезодермальный «позвоночник», который имеет существенное значение для инициации дифференцировки нервной системы (см. гл. 5 и 8).

По мере перехода новых клеток внутрь зародыша бластоцель оттесняется на сторону, противоположную спинной губе бластопора. Тем временем бластопор смещается в вегетативную область и расширяется по мере того, как все больше клеток анимального полушария сходится к губе бластопора. Расширяющийся бластопор образует боковые губы и, наконец, брюшную губу, через которые проходят внутрь дополнительные мезодермальные и энтодермальные клетки-предшественники. С формированием брюшной губы бластопор приобретает форму кольца, окружающего крупные энтодермальные клетки, которые еще остаются на поверхности (рис. 4.16). Этот остающийся на поверхности участок энтодермы называется **желточной пробкой**; но и он постепенно оказывается внутри (см. рис. 4.14). К этому моменту все предшественники энтодермы оказываются внутри зародыша, эктодерма окружает ее поверхность, а мезодерма располагается между ними.

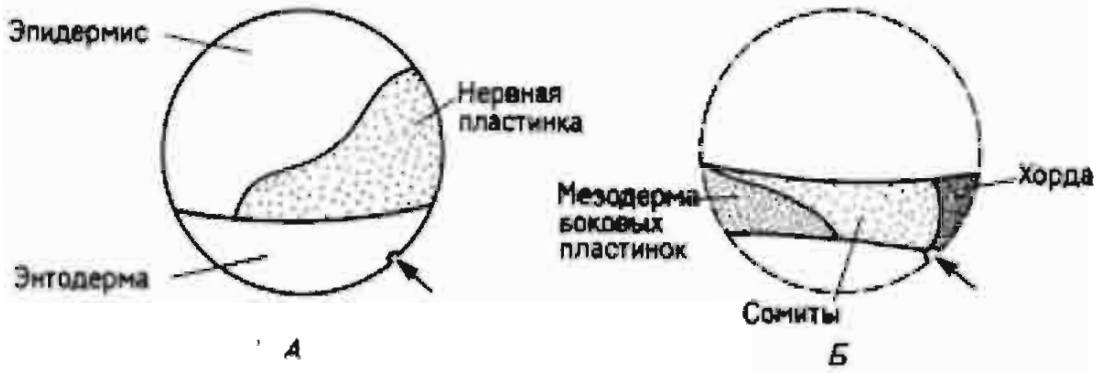


Рис. 4.13. Карта презумптивных зачатков зародыша *Xenopus laevis* на стадии бластулы для поверхностных (*А*) и внутренних (*Б*) клеток, показывающая, что большинство мезодермальных производных формируется из внутренних клеток. Место, где будет образовываться спинная губа бластопора, указано стрелкой. (Из Keller, 1975, 1976.)

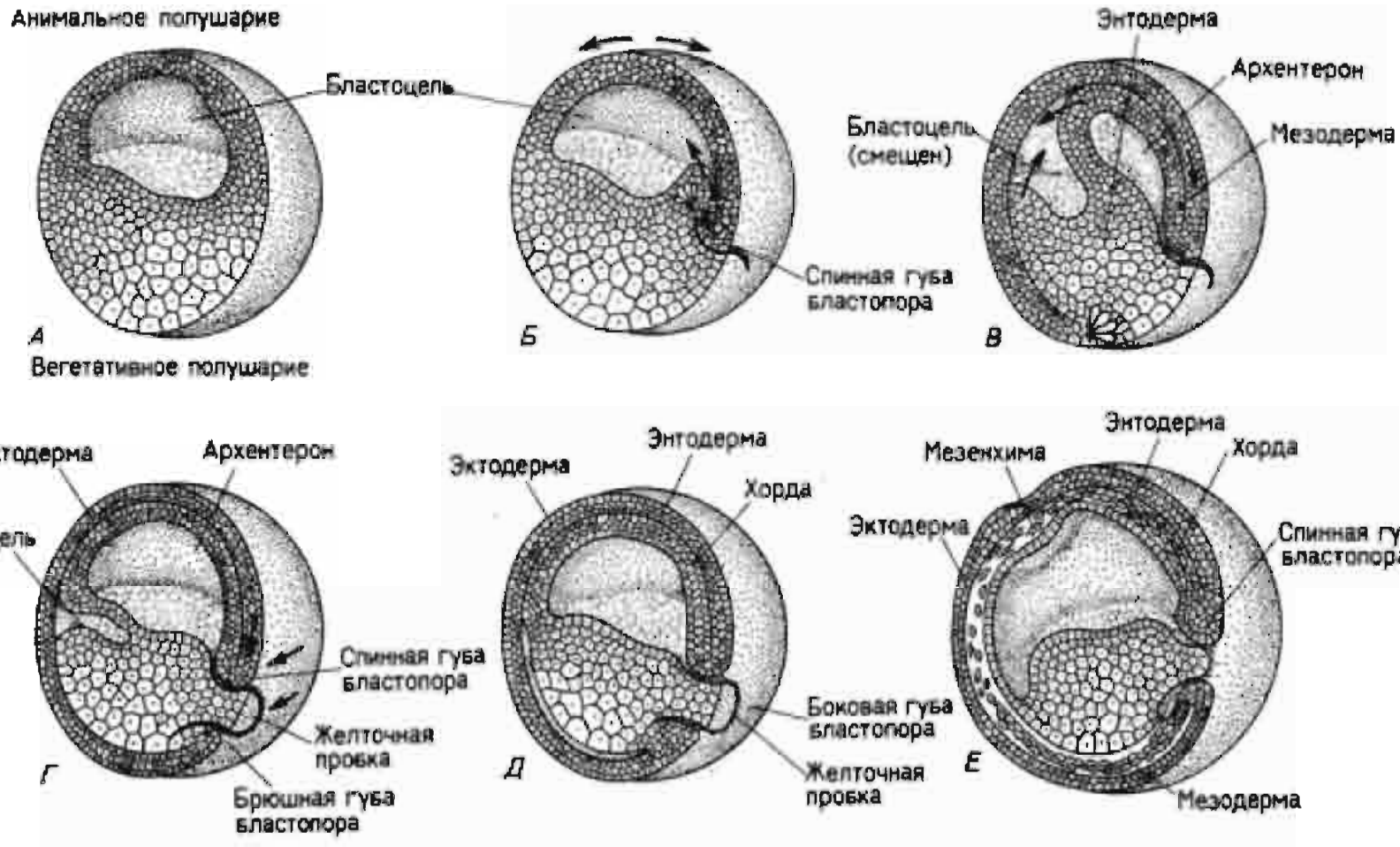


Рис. 4.14. Движения клеток в период гаструляции у лягушки. Разрезы проведены через центр зародыша и повернуты так, что его спинная сторона обращена к читателю. Главные направления движения клеток показаны стрелками. *А*. Бластула. *Б*. Начало гаструляции. Клетки, двигаясь внутрь зародыша, образуют спинную губу бластопора. *В*. Образование гастроцеля. Инволюция клеток через спинную губу бластопора и их дальнейшее движение под крышей бластоцеля приводит к образованию архентерона и смещает бластоцель. *Г, Д*. Клетки-предшественники мезодермы инволюируют через брюшную и боковые губы бластопора. Клетки-предшественники эктодермы мигрируют по поверхности вегетативного полушария. Желточная пробка представляет собой единственный участок энтодермы, видимый с поверхности. *Е*. Гаструляция продолжается до тех пор, пока весь зародыш не будет окружен эктодермой и энтодерма не окажется полностью внутри, а мезодермальные клетки не попадут между ними. (По Rugh, 1951; Keller, 1986.)



Рис. 4.15. Схематический рисунок, на котором в разрезе изображен гаструлирующий зародыш амфибий; показано распространение колбовидных клеток от бластопора внутрь зародыша. (По Holtfreter, 1943.)

Детерминация положения бластопора

Описав в основных чертах гаструляцию у амфибий, мы можем теперь рассмотреть ее более подробно. Гаструляция в жизни животного не существует как независимый процесс. Подготовка к ней может быть прослежена буквально до момента слияния спермия с яйцом. Неоплодотворенное яйцо обладает анимально-вегетативной полярностью (рис. 2.36, 2.38). На анимальном полюсе пигментированная кортикальная цитоплазма располагается над светлой областью цитоплазмы, содержащей материал, который ранее находился в ядре ооцита. (На стадии метафазы первого деления мейоза этот материал высвобождается вблизи того места, где образуются полярные тельца.) Постепенно этот материал сливается с областью, содержащей большие количества рибосом и митохондрий; ниже находится область цитоплазмы с гранулами гликогена и мелкими желточными пластинками. Вегетативная часть неоплодотворенного яйца содержит более крупные желточные пластинки и окружена светлой кортикальной цитоплазмой.

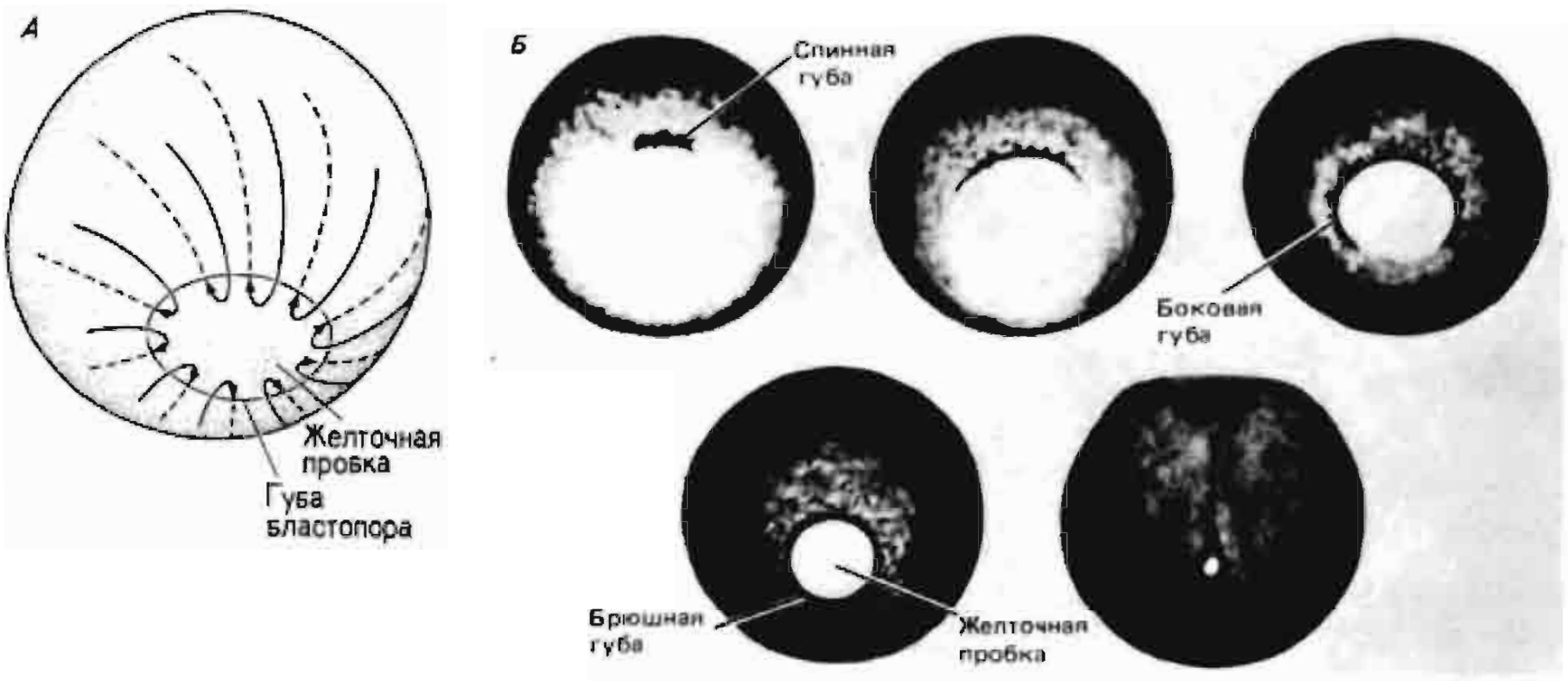


Рис. 4.16. Эпиболия эктодермы. *А*. Морфогенетические движения клеток, мигрирующих через бластопор, а затем движущихся под поверхностью зародыша. *Б*. Изменения, происходящие вблизи бластопора по мере того, как последовательно образуются губы бластопора: спинная, боковые и брюшная. Появление брюшной губы замыкает бластопор в кольцо; эктодерма постепенно оказывается внутри зародыша. (Из Balinsky, 1975; фотография с любезного разрешения автора.)

Судьба этих областей может быть предсказана еще до оплодотворения. Поверхность анимального полушария станет клетками эктодермы (эктодермальный эпителий и нервная система), поверхность вегетативного полушария даст клетки энтодермы (кишечный эпителий и связанные с ним органы), а мезодермальные клетки будут формироваться из внутренней цитоплазмы, лежащей вокруг экватора. Следовательно, зародышевые листки могут быть в общих чертах картированы в неоплодотворенном яйце; но это еще ничего не говорит нам о том, из какой части яйца образуется брюшная часть, а из какой — спинная. Переднезадняя (голова — хвост) и дорсовентральная (спина — живот) оси еще не детерминированы.

Дорсовентральную и переднезаднюю оси детерминирует смещение цитоплазмы зиготы при оплодотворении. В гл. 2 мы обсуждали поворот кортикального слоя цитоплазмы относительно внутренней цитоплазмы яйца у лягушки. Внутренняя цитоплазма остается в прежнем положении из-за большого количества желтка в ней, тогда как кортикальный слой цитоплазмы активно смещается на 30° по отношению к своему первоначальному положению. Этот поворот приводит к тому, что анимально-вегетативная полярность наружного слоя яйца смещается на 30° по отношению к анимально-вегетативной полярности внутренней цитоплазмы. Таким образом возникает новое состояние симметрии. Вместо радиальной симметрии устанавливается двусторонняя, или билатеральная (рис. 4.17).

Та область внутренней цитоплазмы вегетативного полушария, которая теперь лежит под кортикальным слоем цитоплазмы анимального полушария, по-видимому, активизируется и приобретает способность инициировать гаструляцию. Обычно это происходит на стороне, где образуется «серый серп», отстоящий на 180° от места проникновения спермия (рис. 4.17). Сторона, на которой спермий проникает в яйцо, станет брюшной поверхностью зародыша; противоположная сторона, где начинается гаструляция, будет спинной поверхностью зародыша (Gerhart et al., 1981; Vincent et al., 1986; Gerhart et al., 1986).

Для индукции этих движений цитоплазмы яйца спермий не является необходимым. Если искусственно стимулировать дробление энуклеированного яйца, то смещения кортикального слоя в положенное время все же происходит, однако направление его непредсказуемо. (В яйцах, оплодотворенных двумя спермиями, кортекс поворачивается только в одном направлении.) Спермий, по-видимому, дает сигнал для ориентации автономного смещения цитоплазмы в пространстве. Однако смещение цитоплазмы очень существенно: если оно блокировано, то дорсальные осевые структуры не формируются. Направление движения цитоплазмы определяет, какая сторона яйца должна стать спинной, а какая — брюшной (Gerhart et al., 1986; Vincent, Gerhart, 1987).

Направление смещения, определяемое местом проникновения спермия, может быть подавлено путем механического изменения пространственных со-

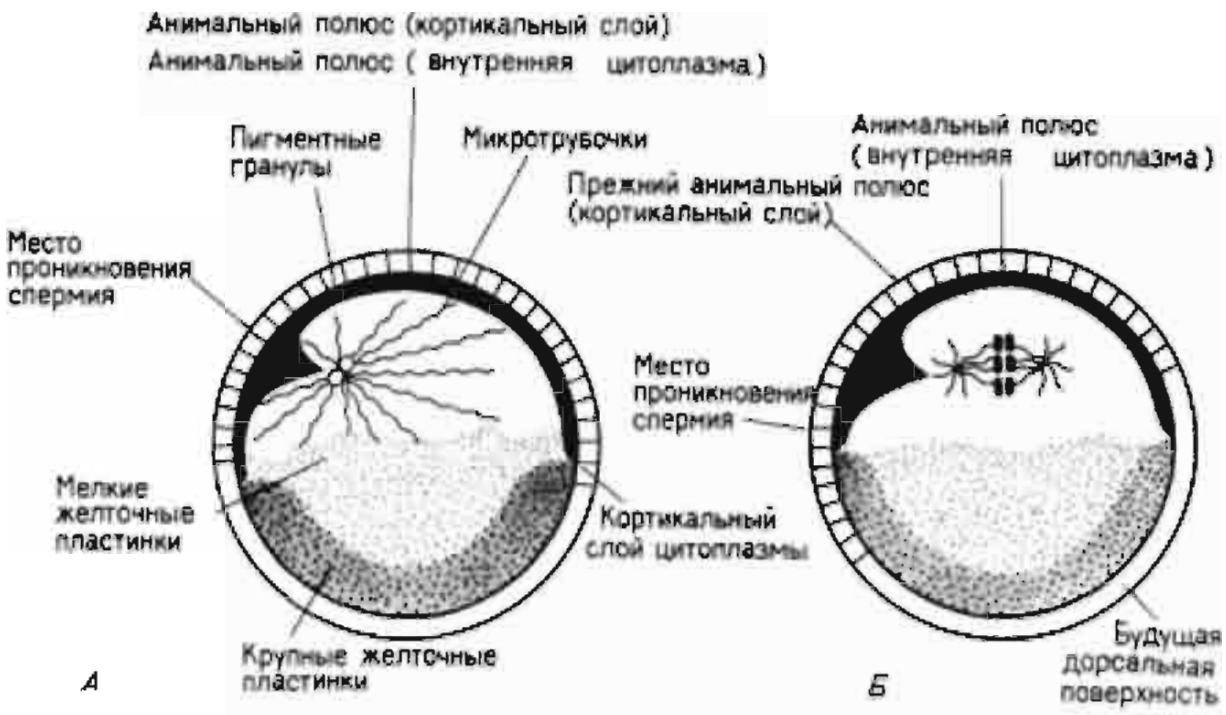


Рис. 4.17. Поворот цитоплазмы зиготы во время цикла первого деления дробления. Зигота в начале (*А*) и незадолго до конца цикла первого деления дробления (*Б*). Кортикальный слой цитоплазмы (заштрихован) смещается по отношению к внутренней цитоплазме. Место, в котором смещение оказывается наибольшим, точно соответствует положению будущей срединной линии зародыша. (По Gerhart et al., 1986.)

отношений между кортикальной и субкортикальной цитоплазмой. Это может быть достигнуто таким поворотом яйца, в результате которого внутренние компоненты попадают в разные области яйца (Pflüger, 1883; Penners, Schleip, 1928; Pasteels, 1948; Gerhart et al., 1981). В норме оплодотворенное яйцо ориентировано таким образом, что тяжелые желточные пластинки в вегетативном полушарии в соответствии с действием силы тяжести располагаются в нижней части яйца. Если воспрепятствовать повороту яйца, погрузив его в раствор полисахарида (чтобы обезводить перивителлиновое пространство между яйцом и оболочкой оплодотворения), то затем яйцо можно повернуть набок на 90°, так чтобы анимально-вегетативная ось приняла вместо вертикального горизонтальное положение, а место проникновения спермия было обращено кверху (Gerhart et al., 1981; Kirschner, Gerhart, 1981; Cooke, 1986). Если оплодотворенное яйцо остается в таком положении в течение 30 мин, начиная с середины первого цикла деления дробления, то почти у всех зародышей гаструляция начинается на *той же* стороне, на которой спермий проник в яйцо (рис. 4.18).

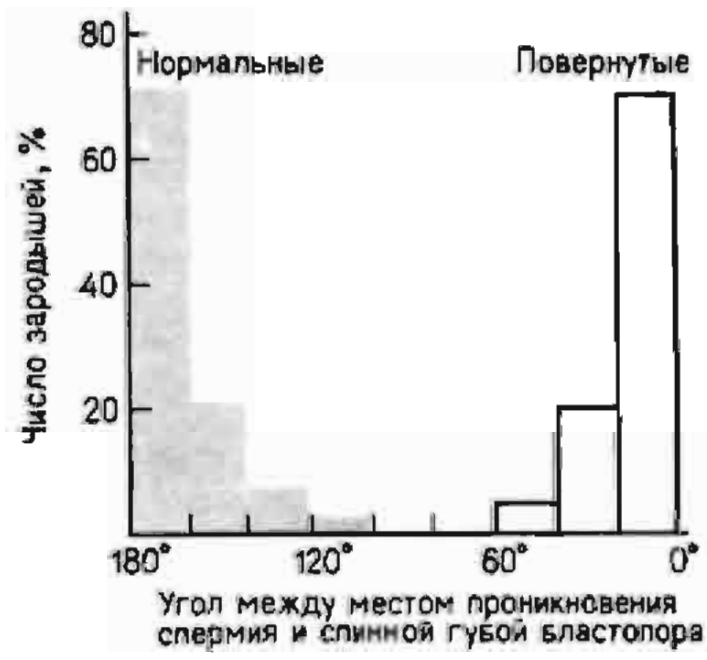


Рис. 4.18. Соотношение между местом проникновения спермия в яйцо и местом закладки спинной губы бластопора у нормальных (серые столбцы) и повернутых (белые столбцы) яиц шпорцевой лягушки. Яйца были оплодотворены, освобождены от студенистой оболочки и помещены в фиколл для обезвоживания перивителлинового пространства. Место проникновения спермия в яйцо помечено красителем. Яйца повернуты на 90°, так что это место обращено кверху. В таком положении яйца находились в течение периода от 50 до 80 мин после оплодотворения. (По Gerhart et al., 1981.)

Роль нормального смещения цитоплазмы можно продемонстрировать в опытах с подавлением этого смещения и последующим наблюдением за зародышами, развивавшимися из таких яиц. Воздействия, вызывающие деполимеризацию микротрубочек (холодовой шок, высокое гидростатическое давление или погружение яиц в нокодазол), блокируют поворот цитоплазмы (Manes et al., 1978). Обработанные таким образом яйца дробятся, но никогда не гаструлируют нормально и не приобретают дорсовентральной полярности. Гаструляция у них протекает симметрично, и они превращаются в трехслойный цилиндр, лишенный спинных компонентов, таких, как сомиты и центральная нервная система. Эти зародыши погибают после того, как будут исчерпаны их запасы желтка (Gerhart et al., 1986). Однако если эти яйца были повернуты на 90° за 40 мин до первого деления дробления (тем самым имитировался нормальный поворот цитоплазмы), то у зародышей формировались нормальные осевые структуры, а гаструляция начиналась на той стороне, которая должна была стать спинной (Sharf, Gerhart, 1983). Перераспределение цитоплазмы в течение первого цикла делений дробления является необходимым условием для нормальной гаструляции.

Как и следовало ожидать из предыдущего обсу-

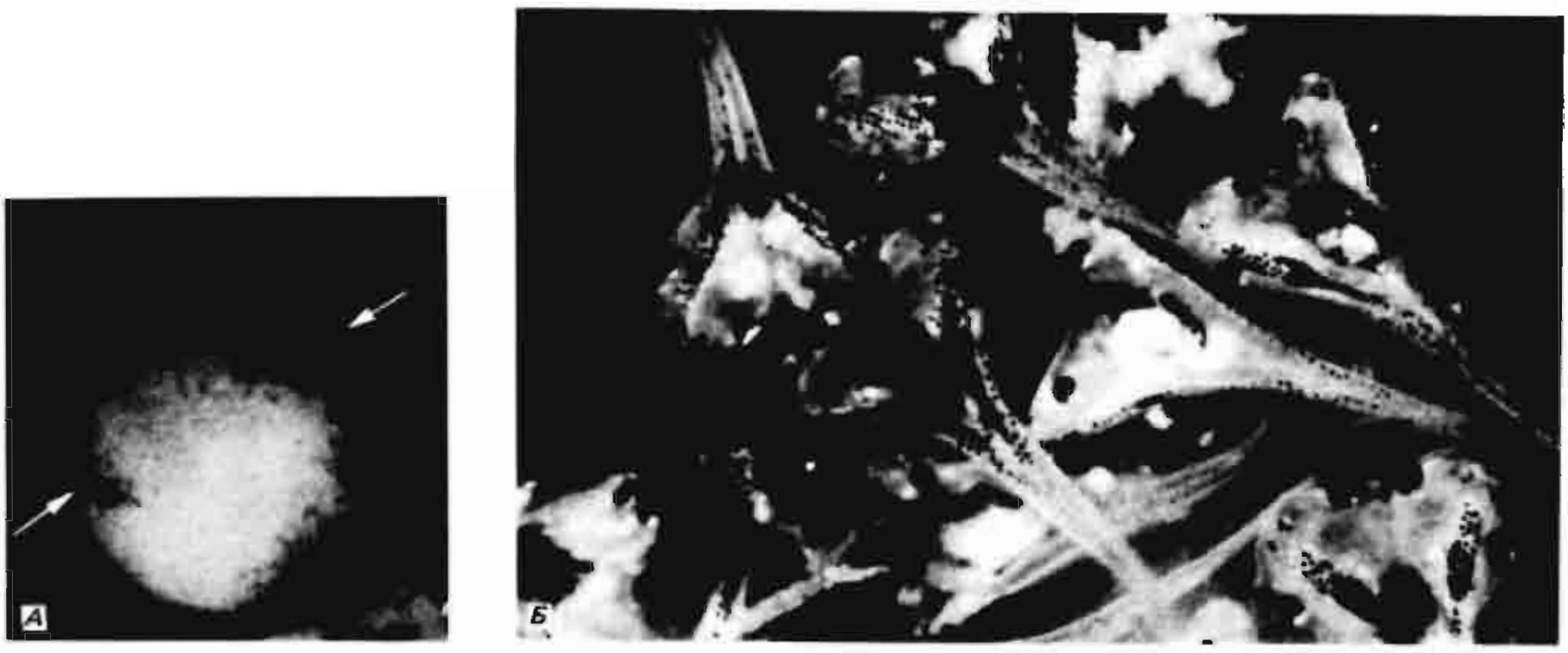


Рис. 4.19. Близнецовые бластопоры, образовавшиеся у одного зародыша в результате поворота яиц шпорцевой лягушки, лишенных студенистой оболочки, брюшной стороной вверх. *А*. Два бластопора, получившие разную информацию для своего образования: одну исходную (напротив места проникновения спермия в яйцо) и одну новую, возникшую в результате смещения цитоплазмы под влиянием центрифугирования. *Б*. В этих яйцах возникли две полные системы осевых структур, из которых образовались близнецы-головастики, соединенные в брюшном отделе. (Фотографии с любезного разрешения J. Gerhart.)

ждения, влияние силы тяжести оказалось возможным дублировать центрифугированием яиц в течение короткого времени (Black, Gerhart, 1985). Оплодотворенные яйца помещали в желатин для их иммобилизации и поворачивали так, чтобы место проникновения спермия в яйцо было либо удалено от ротора центрифуги, либо обращено к нему. Затем эти яйца подвергали слабому вращению (10 — 50 *g*) в течение 4 мин. Если воздействие оказывали в первые две трети (70%) периода первого цикла делений дробления, то смещение цитоплазмы, вызванное центрифугированием, преобладало над смещением цитоплазматических компонентов, индуцированным проникновением спермия. По прошествии этого времени (т. е. 70%) цитоплазма становится более ригидной и ее смещения под влиянием центрифугирования не наблюдается. Кроме того, если яйца подвергали четырехминутному центрифугированию при 30 *g* в период, равный 40—50% времени прохождения первого клеточного цикла, то возникало два места начала гаструляции, что приводило к развитию частично сросшихся близнецов (рис. 4.19). Блэк и Герхарт (Black, Gerhart, 1986) высказали гипотезу, что образование близнецов вызвано формированием двух областей взаимодействия: одна ось формируется там, где смещенная центрифугированием цитоплазма взаимодействует с лежащими над ней компонентами; другая формируется после того, как цитоплазма, смещающаяся под влиянием силы тяжести, возвращается в свое первоначальное положение, где она реагирует повторно. Близнецы могут также образоваться в нормальных гравитационных условиях, если яйцо поместить местом проникновения спермия кверху, освободив его при этом от оболочки оплодотворения (Gerhart et al., 1981). Возможность влиянием силы тяжести и центрифугированием вызвать образование двух осевых структур в яйцах, вполне нормальных в других отношениях, и, напротив, вызвать образование осевых структур в яйцах, у которых подавлено нормальное смещение цитоплазмы, убедительно свидетельствует о том, что вызванные этими воздействиями внутренние смещения замещают процесс, в норме участвующий в определении места, на котором начнется гаструляция.

Способность зародыша к образованию двух функциональных губ бластопора позволяет утверждать, что область серого серпа (где обычно начинается гаструляция) не является чем-то уникальным. Факторы, индуцирующие гаструляцию, по-видимому, возникают в результате взаимодействия между анимальной и вегетативной цитоплазмой; это взаимодействие, вероятно, активирует некий компонент в субкортикальной вегетативной цитоплазме.

Гимлих и Герхарт (Gimlich, Gerhart, 1984) провели серию опытов с трансплантацией, подтвердивших гипотезу о том, что фактор или факторы, инициирующие гаструляцию, первоначально содержатся в глубокой цитоплазме, а не в кортексе серого серпа. Эти авторы показали, что у зародыша шпорцевой лягушки на стадии 64 бластомеров три наиболее дорсально расположенных вегетативных бластоме-

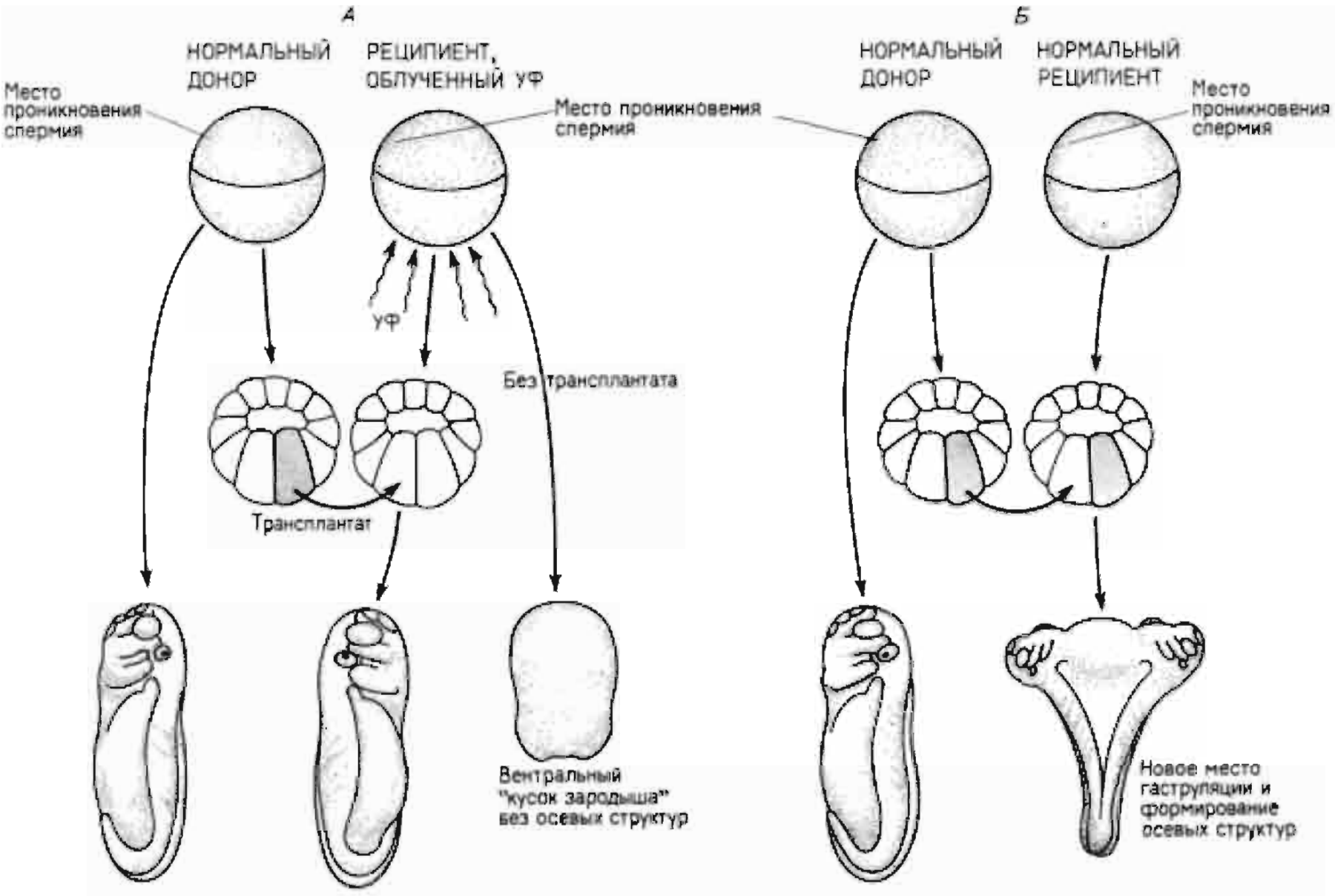


Рис. 4.20. Опыты с трансплантацией, показывающие, что за инициацию гаструляции ответственны вегетативные бластомеры, лежащие под областью проспективной спинной губы бластопора. *А*. Избавление от гибели облученного 64-клеточного зародыша путем пересадки ему вегетативных бластомеров, взятых из наиболее дорсального сегмента (выделен серым цветом) нормального зародыша той же стадии, в углубление, образовавшееся после удаления у него соответствующего числа вегетативных бластомеров. Без такой пересадки у облученного зародыша не происходит нормальной гаструляции. *Б*. Формирование спинной губы бластопора и осевых структур в новом месте после пересадки дорсально лежащих вегетативных бластомеров, взятых от одного зародыша на стадии 64 бластомеров, другому такому же зародышу в вентральную область вегетативного полушария. (По Gimlich, Gerhart, 1984.)

ра способны индуцировать образование спинной губы бластопора и полного комплекса осевых структур у облученных ультрафиолетовым светом реципиентов (которые иначе не могли бы гаструлировать) (рис. 4.20, *А*). Кроме того, эти три бластомера, лежащие под областью проспективной спинной губы бластопора, могут также индуцировать вторичную инвагинацию и образование осевых структур, будучи трансплантированы на брюшную сторону нормального необлученного 64-клеточного зародыша (рис. 4.20, *Б*). Следовательно, эта маленькая группа вегетативных бластомеров ответственна за появление в прилегающих к ним краевых клетках способности инвагинировать и формировать дорсальные мезодермальные структуры зародыша.

Представляется вероятным, что внутреннее перемещение цитоплазмы, ориентация которого в норме определяется проникновением спермия, является причиной асимметричного распределения субклеточных факторов. Эта асимметрия создает в яйце дорсовентральные различия, которые в конечном счете определяют положение бластопора. Кроме того, происходит прогрессивное накопление какого-то фактора (или факторов), необходимого для формирования спинной губы бластопора. Малацински и др. (Malacinski et al., 1980) не обнаружили в дорсальной области оплодотворенного яйца и на ранних стадиях дробления у амфибий активности, необходимой для формирования спинной губы бластопора. Однако такая активность в этой области выявлялась на стадиях средней и поздней бластулы. Ее можно было обнаружить и в вегетативных бластомерах, лежащих в наиболее дорсальном участке 64-клеточного зародыша лягушки. Следовательно, факторы, ответственные за формирование бластопора, по-видимому, локализуются в области, где будет за-

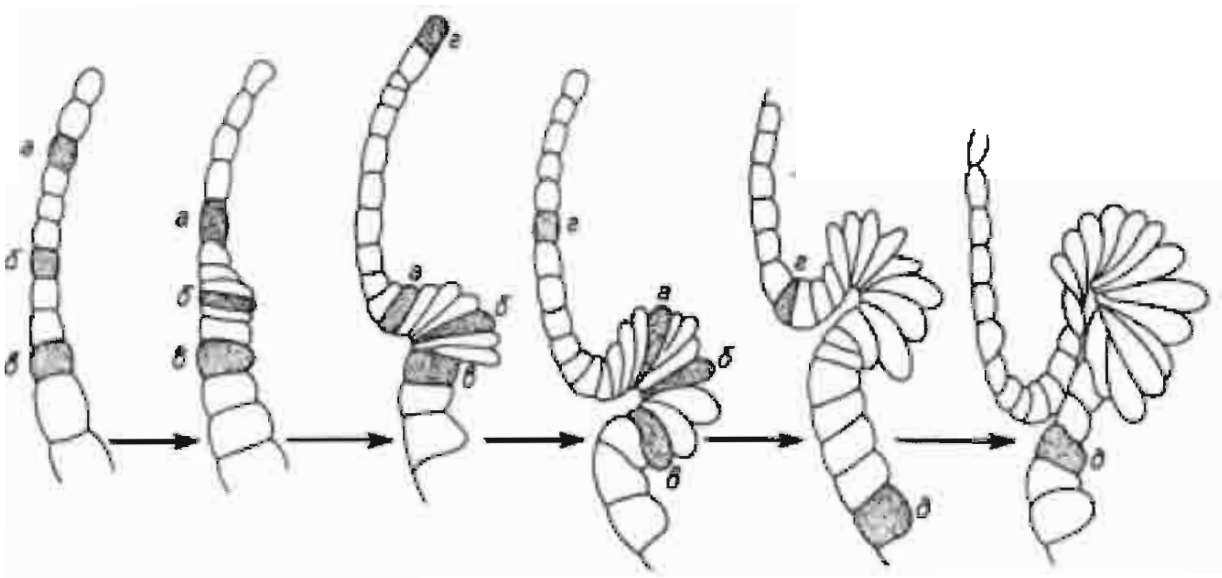


Рис. 4.21. Перемещения клеток при образовании спинной губы бластопора у шпорцевой лягушки. Цейтраферная съемка дает возможность проследить за изменением положения одной и той же клетки с самого начала гаструляции. (По Keller, 1978.)

кладываться бластопор, лишь незадолго до начала гаструляции. Эти вегетативные клетки затем взаимодействуют с клетками, лежащими непосредственно над ними (в области серого серпа), побуждая их гаструлировать и формировать дорсальные осевые структуры.

Клеточные движения и образование архентерона

Гаструляция начинается с погружения группы краевых энтодермальных клеток, лежащих на спинной поверхности, внутрь зародыша. Это движение клеток внутрь осуществляется в результате изменения их адгезивных свойств, сходных с изменениями, которые были описаны ранее для клеток вегетативной пластинки у морских ежей. Рис. 4.21 иллюстрирует образование колбовидных клеток в ранней гаструле амфибий.

Поскольку колбовидные клетки остаются в самой глубокой части бластопора и представляются тянущими за собой небольшой бластопор внутрь зародыша, долгое время считали, что именно они играют главную роль в формировании и увеличении размеров архентерона. Румблер (Rhumbler, 1902) предположил, что колбовидные клетки активно мигрируют в центр гаструлы в результате низкого поверхностного натяжения. Они могут также втягивать за собой новые соседние клетки, инициируя таким образом движение клеток внутрь зародыша.

В 1943—1944 гг. выдающийся эмбриолог Иоганн Гольтфретер (Holtfreter, 1943, 1944) получил данные, свидетельствующие о том, что так и происходит на самом деле. Он изолировал клетки ранней губы бластопора и культивировал их на стекле. Округлившиеся концы клеток, прикрепленные к стеклу, вели за собой движение остальной части тела этих клеток. Еще более убедительными были рекомбинационные опыты Гольтфретера, в которых клетки краевой зоны (дающие начало спинной губе бластопора) комбинировали с клетками внутренней энтодермы. Когда клетки дорсальной краевой зоны изолировали и помещали на слой клеток внутренней энтодермы, из будущих клеток спинной губы бластопора формировались колбовидные клетки, которые погружались в энтодерму, опускаясь ниже ее поверхности (рис. 4.22). Кроме того, по мере погружения они создавали углубление, напоминающее бластопор в начале его образования. Таким образом, Гольтфретер доказал, что способность инвагинировать во внутреннюю энтодерму является прирожденным свойством клеток дорсальной краевой зоны.

Сравнительно недавно Р. Келлер показал, что хотя клетки из области серого серпа действительно имеют внутренне присущую им способность инвагинировать в энтодерму, на самом деле колбовидные клетки играют менее активную роль, чем думали раньше. Келлер (Keller, 1981) обнаружил, что после того, как сформировались колбовидные клетки, они не имеют особого отношения к увеличению размеров архентерона; частичное или полное удаление этих клеток не предотвращает инволюции прилежащих

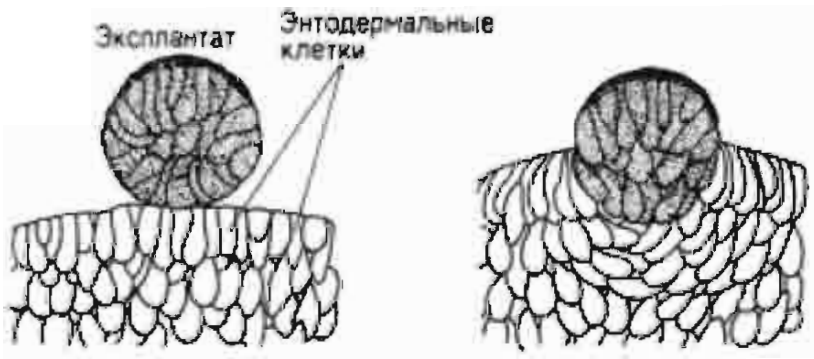


Рис. 4.22. Трансплантат, взятый из области спинной губы бластопора, погружается в слой энтодермальных клеток и формирует в нем углубление бластопора. (По Holtfreter, 1944.)

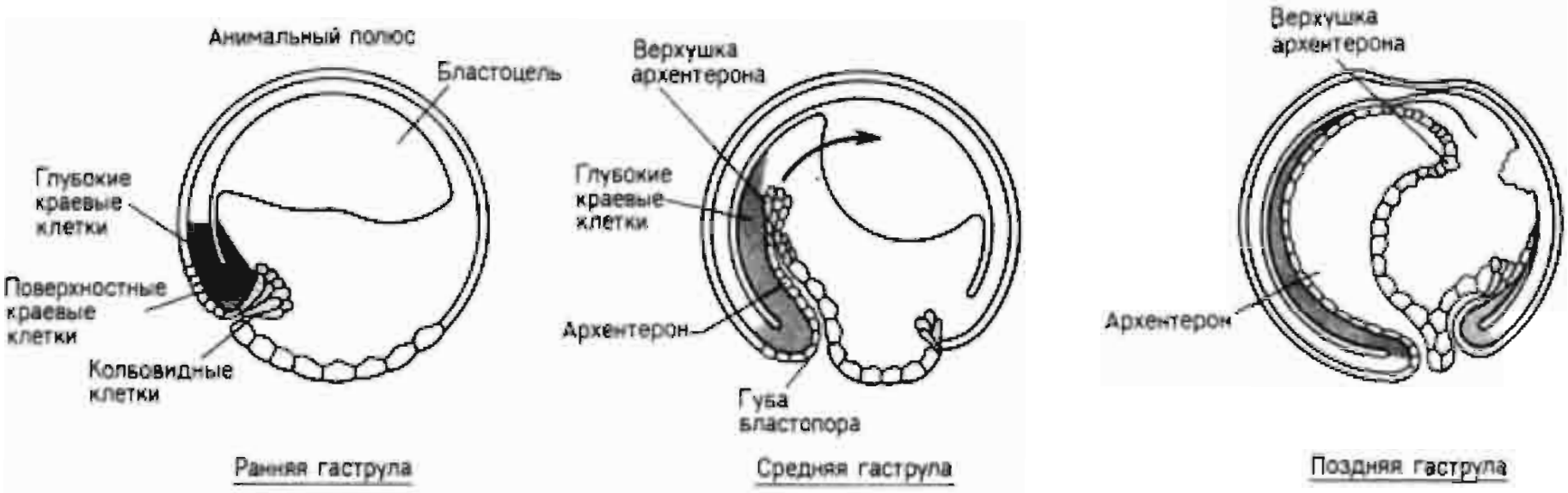


Рис. 4.23. Перемещение глубоких клеток краевой зоны относительно колбовидных клеток в период гаструляции у шпорцевой лягушки. Колбовидные клетки (выделены точками), происходящие из поверхностных энтодермальных клеток краевой зоны, становятся верхушкой архентерона. Инволюирующие клетки, которые образуют мезодерму (обозначены серым цветом), происходят из внутренних (глубоких) клеток краевой зоны. (По Keller, 1981.)

к ним клеток в бластопор. Гаструляция может происходить без колбовидных клеток. Главным фактором движения клеток внутрь зародыша является, вероятно, инволюция лежащих *под его поверхностью* краевых клеток, а не клеток, находящихся на поверхности. Эти лежащие под поверхностью **глубокие инволюирующие краевые клетки** вворачиваются внутрь и мигрируют к анимальному полюсу по внутренним поверхностям еще неинволюировавших глубоких клеток (рис. 4.23), а поверхностный слой формирует выстилку архентерона просто потому, что он прикреплен к активно мигрирующим глубоким клеткам.

Даже если колбовидные клетки в какой-то степени участвуют в формировании первоначального углубления бластопора, движение этих клеток зависит от их прикрепления к лежащим под ними глубоким клеткам. В то время как удаление *колбовидных клеток* не влияет на инволюцию глубоких или поверхностных клеток краевой зоны внутрь зародыша, удаление *глубоких клеток* краевой зоны и их замещение клетками анимальной области (которые в норме не претерпевают инволюции) останавливает формирование архентерона.

На рис. 4.24 делается попытка объединить результаты некоторых сравнительно недавних исследований (Keller, 1978, 1980, 1981; Keller, Schoenwolf, 1977) в виде модели, иллюстрирующей формирование архентерона. Согласно этой модели, во время начальных стадий гаструляции (рис. 4.24, *А*) краевая зона распространяется по направлению к вегетативному полюсу посредством интердигитации (вставления клеток из одного слоя в другой) нескольких слоев глубоких клеток, образующих в результате один тонкий слой. В то же самое время поверхностные клетки распространяются путем деления и уплощения. Морфология глубоких клеток, достигших бластопора, снова меняется, они формируют поток мезодермальных клеток, мигрирующих к анимальному полюсу по внутренней поверхности неинволюирующих глубоких клеток краевой зоны. В течение более поздних стадий гаструляции (рис. 4.24, *Б*) цилиндрические глубокие клетки уплощаются и растягиваются по мере того, как краевая зона продолжает смещаться в вентральном направлении (образуя широкий кольцевидный бластопор вокруг желточной пробки). Поток мезодермальных клеток продолжает мигрировать внутрь, и лежащий над ним слой поверхностных клеток (включая колбовидные) пассивно перемещается за ним в сторону анимального полюса, формируя энтодермальную крышу архентерона. Следовательно, хотя колбовидные клетки, возможно, и ответственны за образование начального углубления бластопора, однако движущая сила инволюции, по-видимому, заключена в глубоком слое краевых клеток. Кроме того, этот глубокий слой, вероятно, определяет продолжающуюся миграцию клеток внутрь зародыша.

Миграция инволюирующей мезодермы

Миграция клеток-предшественников мезодермы внутрь зародыша является частью удивительно хорошо координированной серии глобальных клеточных миграций. Подробная схема этих движений приведена на рис. 4.25. Один из наиболее важных аспектов гаструляции у амфибий — это схождение к центру (*конвергенция*) и удлинение (*растяжение*) **инволюирующей краевой зоны** (ИКЗ), которая представляет собой область, расположенную непосредственно над губой бластопора. В поверхностном слое этой зоны ($ИКЗ_{пов}$) находится материал энтодермальной крыши архентерона, а ее глубокий слой ($ИКЗ_{гл}$) содержит проспективные мезодермальные клетки (в том числе клетки хорды).

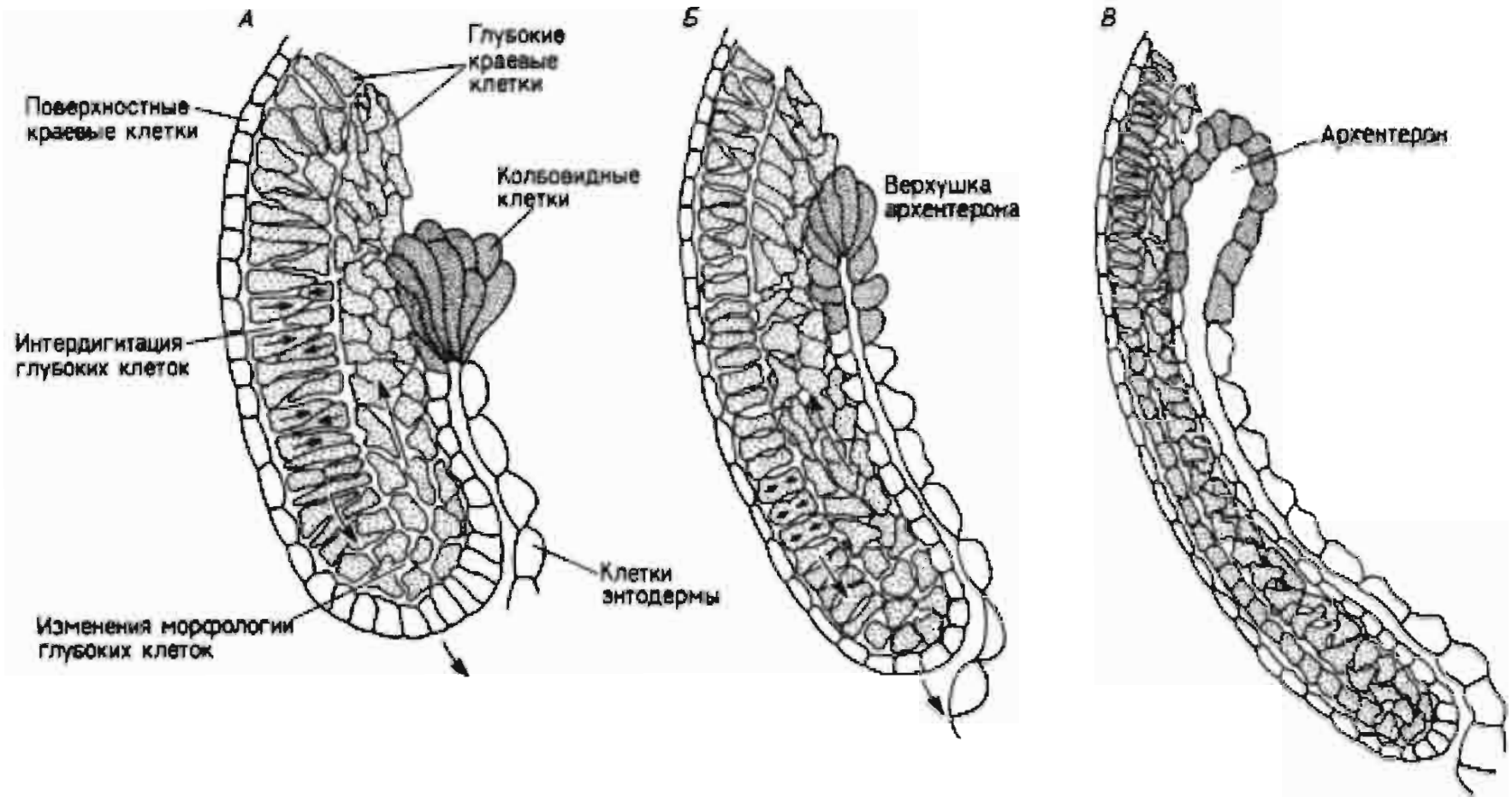


Рис. 4.24. Интегрированная модель клеточных движений в период гаструляции. *А*. Ранняя гаструла характеризуется интердигитацией слоев глубоких клеток краевой зоны и их инволюцией. *Б, В*. Зародыши на более поздних стадиях гаструляции. Глубокие краевые клетки уплощаются, а бывшие поверхностные клетки краевой зоны образуют стенку архентерона (гастроцеля). Колбовидные клетки выделены частыми точками. (По Keller, 1981.)

Во время гаструляции клетки **анимальной чаши и неинволюирующей краевой зоны** распространяются путем эпиболии, покрывая весь зародыш. Дорсальная часть неинволюировавших краевых клеток расширяется быстрее, чем вентральная, заставляя губы бластопора двигаться в вентральном направлении. Клетки из этих двух зон будут формировать эктодерму зародыша. Глубокая инволюирующая краевая зона представляет собой кольцо клеток, из которых образуются хорда, головная мезодерма, мезодерма сомитов и боковых пластинок. Во время гаструляции это кольцо инволюирует через губы бластопора, формируя мезодермальную мантию. Клетки-предшественники головной мезодермы, боковой и брюшной мезодермы распространяются во всю ширину зародыша, тогда как материал хорды и сомитов конвергирует в дорсальном направлении, образуя дорсальные осевые структуры. Клетки поверхностной инволюирующей краевой зоны также претерпевают **конвергентное растяжение**, формируя энтодермальные ткани крыши архентерона. Суббластопоральная энтодерма покрывается обрастающими ее клетками неинволюирующей краевой зоны и образует дно архентерона (Keller, 1986).

В процессе конвергентного растяжения ИКЗ$_{в}$ ее клетки сами перестраиваются, вставляясь между прилежащими к ним клетками и создавая тем самым тонкое удлиненное образование вместо первоначально широкой маленькой полоски клеток (рис. 4.26). Мы уже обсуждали сходный феномен при описании гаструляции у морского ежа, включающий в себя растяжение архентерона. Из многочисленных рядов клеток путем интеркаляции образуется меньшее число более длинных рядов клеток. Конвергентное растяжение мезодермы является, по-видимому, автономным, потому что движения клеток наблюдаются даже в том случае, когда они изолированы из остальной части зародыша (Keller, 1986).

Как инволюирующие клетки узнают, куда им надо двигаться сразу же после попадания внутрь зародыша? Имеются ли на внутренней поверхности крыши бластоцеля некие молекулы, облегчающие миграцию клеток? По-видимому, инволюирующие клетки-предшественники мезодермы мигрируют к анимальному полюсу по фибронектиновой сети, секретируемой клетками крыши бластоцеля. У амфибий незадолго до начала гаструляции презумптивная эктодерма крыши бластоцеля секретирует внеклеточный матрикс, который содержит волокна фибронектина (Boucaut et al., 1984; Nakatsuji et al., 1985) (рис. 4.27). Подобно инвагинирующей мезенхиме морского ежа, инволюирующая мезодерма перемещается по этим фибронектиновым волокнам. Это предположение было подтверждено фактом, что химически синтезированный «поддельный» фибронектин может конкурировать с фибронектином внекле-

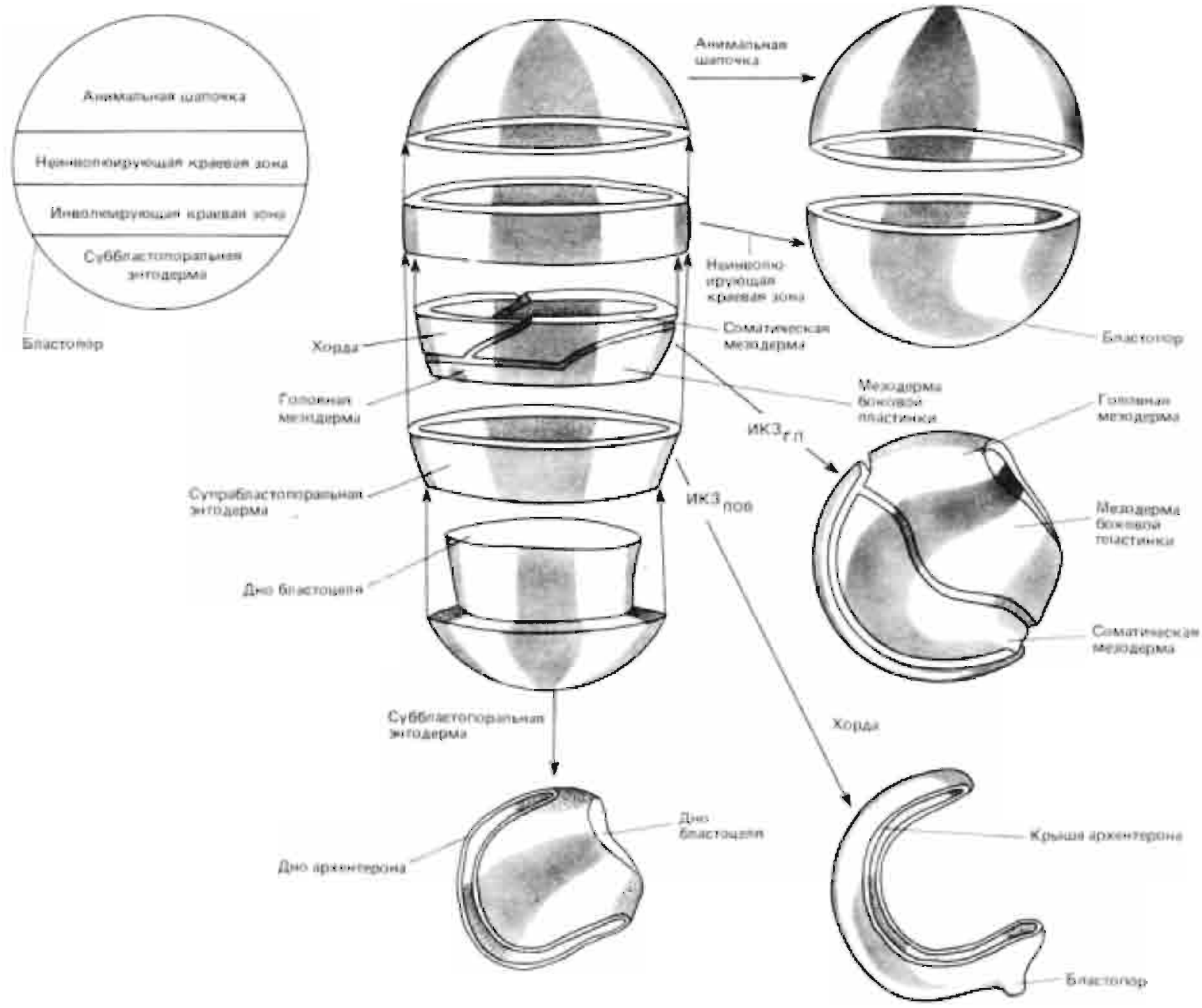


Рис. 4.25. Карты презумптивных зачатков у зародыша шпорцевой лягушки на стадии ранней гаструлы и движения клеточных пластов в период гаструляции каждой из четырех областей, показанных схематически на рисунке слева и представленных по отдельности на рисунках в центре, на которых ранняя гаструла дана как бы в разобранном виде; на рисунках справа эти зачатки спроецированы на конец гаструляции. В течение гаструляции апикальная анимальная шапочка распространяется равномерно по всем направлениям в сторону вегетативного полюса, тогда как клетки неинволюирующей краевой зоны сначала мигрируют вдоль будущей спинной стороны зародыша. Все вместе они будут окружать зародыш, превратившись в эктодерму. Глубокие клетки инволюирующей краевой зоны (ИКЗ$_{г.п}$) исходно представляют собой кольцо внутренних, расположенных по экватору клеток, содержащее клетки-предшественники хорды, головной и сомитной мезодермы и мезодермы боковых пластинок (на рисунке ИКЗ$_{г.п}$ изображена над ИКЗ$_{пов}$). В ходе инволюции это кольцо вворачивается внутрь, образуя мезодермальную мантию, в которой клетки-предшественники хорды расположены наиболее дорсально. Поверхностные клетки инволюирующей краевой зоны (ИКЗ$_{пов}$ изображена в виде отдельного кольца под ИКЗ$_{г.п}$) представляют собой будущие супрабластопоральные (лежащие над бластопором) энтодермальные клетки (материал прехордальной пластинки); краевая зона удлиняется в дорсальном направлении, образуя крышу архентерона (гастроцеля). Суббластопоральную (лежащую под бластопором) энтодерму в конечном счете окружают клетки неинволюирующей краевой зоны. Эти богатые желтком клетки образуют дно гастроцеля. Обратите внимание, что бластопор, закладывающийся первоначально на спинной стороне, сдвигается на брюшную сторону зародыша. (По Keller, 1986.)

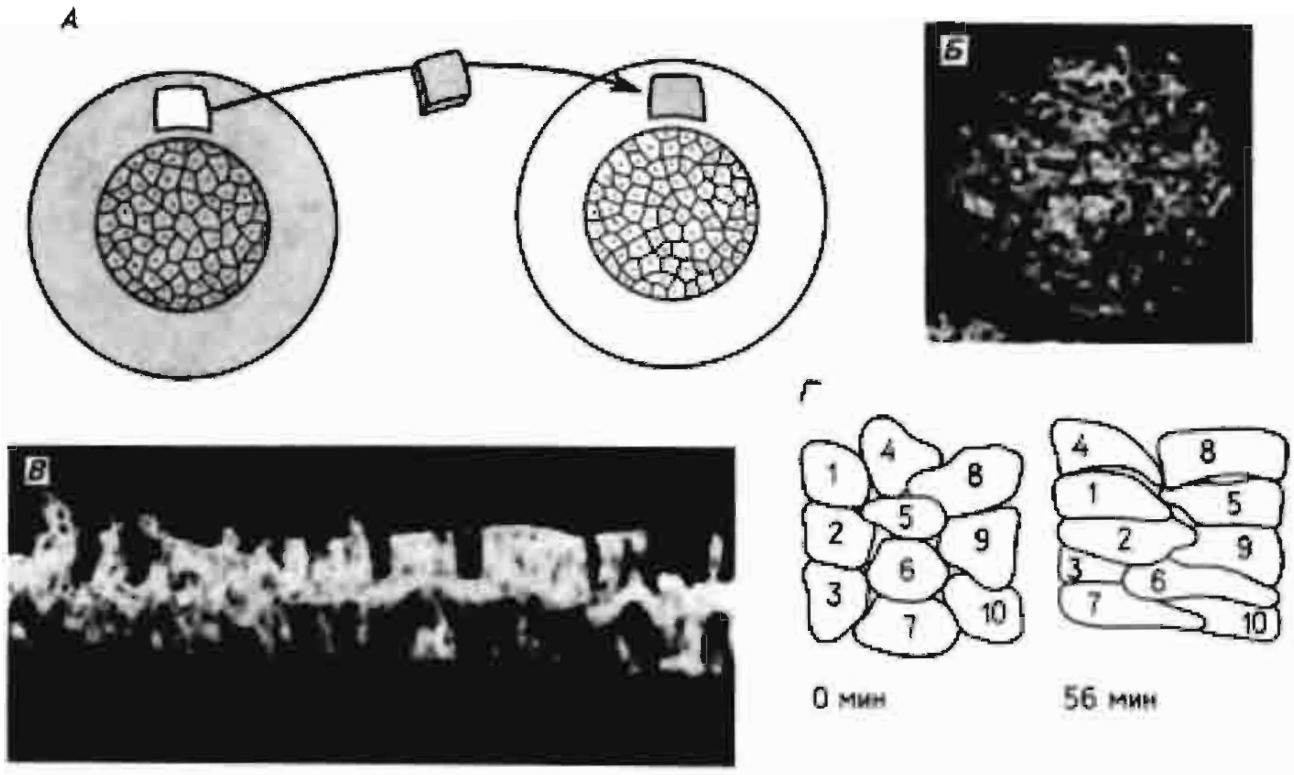


Рис. 4.26. Перераспределение клеток в процессе конвергентного растяжения мезодермы у зародыша шпорцевой лягушки. *А*. Дорсальная область ИКЗ$_{1,0}$ (которая образует хорду) взята от зародыша, меченного частицами флуоресцирующего декстрана, и пересажена немеченому зародышу. *Б*. После приживления меченые клетки (светлые) остаются на месте не рассеиваясь. *В*. Когда эти клетки участвуют в образовании хорды, они перемешиваются с клетками хозяина. *Г*. Перемещение отдельных меченых клеток при формировании хорды, прослеженное с помощью видеомагнитофонной записи in vitro. (По Keller et al., 1985; Keller, 1986; фотографии с любезного разрешения R. E. Keller.)

точного матрикса. Клетки связываются с определенным участком белка фибронектина, который содержит специфическую последовательность из 10 аминокислот:

Арг—Гли—Асп—Сер—Про—Ала—Сер—Сер—Лиз—Про.

Буко и др. (Boucaut et al., 1984) инъецировали большие количества этого декапептида в бластоцель зародыша тритона вскоре после начала гаструляции. Если фибронектин имеет существенное значение для миграции клеток, то клетки, связанные этим растворенным фрагментом пептида, а не фибронектиновым матриксом, должны будут остановиться. Неспособные найти свой путь мезодермальные клетки должны прекратить инволюцию. Именно это и произошло в опыте Буко (рис. 4.28). На внутренней стороне эктодермы не было видно мигрирующих клеток. Вместо этого клетки-предшественники мезодермы оставались на поверхности зародыша, образуя клеточную массу, свернутую в виде спирали. Другие синтетические декапептиды (в том числе другие фрагменты молекулы фибронектина) не препятствовали миграции. Сходные фибронектинсодержащие волокна были обнаружены в гаструле других хвостатых амфибий, а Деларю и его коллеги (Delarue et al., 1985) показали, что некоторые нежизнеспособные гибриды между двумя видами жаб (бесхвостых амфибий) погибают во время гаструляции, потому что они не секретируют фибрилл фибронектина. Следовательно, можно полагать, что путь миграции мезодермальных клеток у зародышей амфибий выстлан фибронектином.

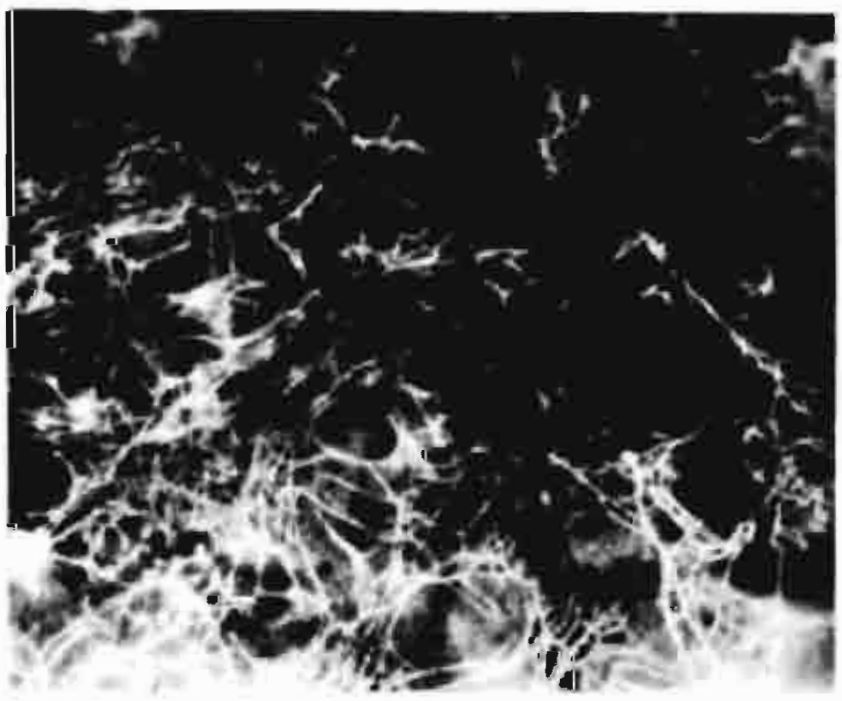


Рис. 4.27. Фибронектиновые фибриллы у зародыша тритона на стадии гаструлы, визуализированные с помощью флуоресцирующих антител к фибронектину. Иммунофлуоресценция выявляет фибриллярную сеть на базальной поверхности эктодермальных клеток, выстилающих крышу бластоцеля. (Из Boucaut et al., 1985; фотография с любезного разрешения J.-C. Boucaut.)

Эпиболия эктодермы

В то время как в области губ бластопора осуществляется инволюция, клетки-предшественники эктодермы распространяются по поверхности всего зародыша. Келлер (Keller, 1980) и Келлер и Шёнвольф (Keller, Schoenwolf, 1977) наблюдали изменения поверхностных и глубоких клеток в анимальной и краевой областях зародыша с помощью сканирующего электронного микроскопа. Основной механизм эпиболии у *Xenopus laevis* заключается, по-видимому, в увеличении числа клеток (посредством делений) и в одновременной интеграции нескольких слоев глубоких клеток в один (рис. 4.29). В результате трех циклов клеточных делений на стадии ранней гаструлы число глубоких клеток в анимальном полу-



Рис. 4.28. Зародыши тритона, гаструлирующие нормально (*А*, *Б*), и аномально гаструлирующие зародыши, которым в бластоцель были инъецированы растворы фибронектиновых фрагментов, связывающихся с инволюирующими клетками (*В*, *Г*). Нормальным зародышам был инъецирован контрольный раствор без фибронектина. (Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа.) *А*. Разрез зародыша на стадии средней гаструлы. *Б*. Общий вид зародыша на стадии желточной пробки (близко к концу гаструляции). *В*. Общий вид зародыша на конечной стадии «арестованной» (остановленной) гаструлы. *Г*. Разрез через такую аномальную гаструлу; у этих зародышей клетки-предшественники мезодермы, будучи связаны с синтетическим фибронектином, не могут найти нормальный выстланный фибронектином путь, по которому они должны мигрировать. Архентерон отсутствует, потому что неинволюировавшие клетки презумптивной мезодермы остались на поверхности. *1* — архентерон; *2* — бластопор; *3* — бластоцель; *4* — желточная пробка; *5* — мезодерма; *6* — эктодерма; *7* — энтодерма. (Из Boucaut et al., 1984; фотография с любезного разрешения J.-P. Thiery.)

шарии увеличивается на 45%. Одновременно происходит полное объединение этого огромного числа глубоких клеток в один слой. Самый поверхностный слой клеток распространяется посредством их деления и уплощения. Распространение клеток в дорсальной и вертикальной частях краевой зоны осуществляется, по-видимому, под действием того же механизма, хотя изменения формы клеток в этих участках зоны играют, вероятно, бо́льшую роль, чем в анимальной области. Результатом этих движений является эпиболия поверхностных и глубоких клеток анимального полушария и краевой зоны по поверхности яйца. Большинство клеток краевой зоны, как уже упоминалось, инволюирует, присоединяясь к потоку мезодермальных клеток внутри зародыша.

Итак, гаструляция у амфибий представляет со-

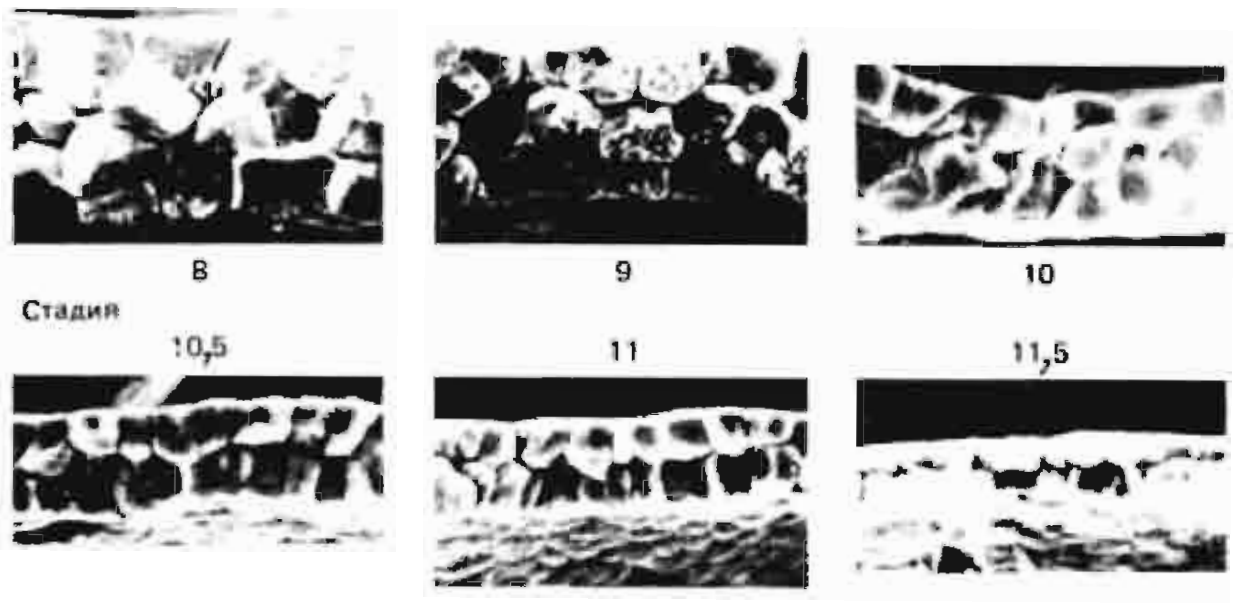


Рис. 4.29. Изменения в форме и расположении клеток в крыше бластоцеля у зародышей шпорцевой лягушки на стадиях 8 (средняя бластула), 9 (поздняя бластула) и на последовательных стадиях гаструляции от стадии 10 (начало гаструляции) до стадии 11,5 (большая желточная пробка). Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Keller, 1980; фотографии с любезного разрешения R. E. Keller.)

бой гармоническое сочетание нескольких отчетливо различающихся событий. Первым указанием на гаструляцию является локальная инвагинация энтодермальных колбовидных клеток в краевой зоне в строго определенное время и в строго определенном месте. Затем инволюция глубоких клеток через губу бластопора приводит к образованию архентерона и к перемещению осевой мезодермы в дорсальную область зародыша. В то же самое время клетки-предшественники эктодермы распространяются в вегетативном направлении посредством клеточных делений и интеграции ранее независимых клеточных слоев. Результатом этих клеточных движений является соответствующее размещение в зародыше трех зародышевых листков, подготавливающее их к дифференцировке в органы тела. До сих пор еще неизвестно, каким образом эти клетки узнают, когда им начинать и завершать их движения. И хотя получены интересные новые данные, Келлер (Keller, 1986) предостерегает: «Ни один морфогенетический процесс — особенно гаструляция у амфибий — еще не понят нами должным образом ни на клеточном уровне, ни на уровне клеточной популяции».

Гаструляция у птиц

Основные черты гаструляции у птиц

У зародышей птиц дробление приводит к образованию бластодиска, лежащего над желтком, объем которого колоссален. Эта инертная масса желтка под бластодиском накладывает некоторые ограничения на движения клеток. Поэтому гаструляция у птиц на первый взгляд кажется сильно отличающейся от гаструляции у морского ежа или лягушки. Однако мы скоро увидим огромное сходство между ними в этом отношении. Более того, мы увидим, что даже у зародышей млекопитающих, яйца которых совсем не имеют желтка, сохраняется такой же тип гаструляционных движений, как и у богатых желтком зародышей птиц и пресмыкающихся.

Центральные клетки бластодиска отделены от желтка подзародышевой полостью и кажутся светлыми, поэтому центр бластодиска называется area pellucida (светлое поле). Напротив, клетки, лежащие на периферии бластодиска, кажутся темными из-за их контакта с желтком. Они образуют area opaca, или темное поле (рис. 4.30). Бо́льшая часть клеток бластодермы остается на поверхности, формируя **эпибласт**, но некоторые клетки мигрируют по отдельности в подзародышевую полость и формируют там слой, называемый **первичным гипобластом** (рис. 4.31). Вскоре после этого пласт клеток из заднего края бластодермы (серп Коллера) мигрирует кпереди и присоединяется к первичному гипобласту, образуя вместе с ним **вторичный гипобласт**. Эти два слоя бластодермы (эпибласт и гипобласт) соединяются лишь у края area opaca, а пространство между ними представляет собой бластоцель. Таким образом, строение бластодиска у птиц не отличается от строения бластулы у амфибий или морских ежей.

Карта презумптивных зачатков у зародыша птиц ограничивается эпибластом. Клетки гипобласта не принимают участия в построении тела развивающегося зародыша. Они образуют часть внезародышевых оболочек органов, которые питают зародыш и защищают его. Все три зародышевых листка собственно зародыша (плюс значительная часть внезародышевых оболочек) формируются из клеток эпибласта. Карта презумптивных зачатков эпибласта куриного зародыша до начала гаструляции представлена на рис. 4.32. Презумптивные клетки хорды расположены в центре между презумптивной эктодермой и презумптивной энтодермой.

Основной структурой, характерной для процесса гаструляции у птиц, рептилий и млекопитающих, является **первичная полоска**. Впервые она обнаруживается как центрально расположенное утолщение клеточного пласта на заднем крае светлого поля (см. рис. 4.30). Это утолщение образуется в результате миграции клеток из латеральной области заднего отдела эпибласта к центру. Оно постепенно сужается, продвигаясь вперед и превращаясь в узкую дефинитивную первичную полоску. Эта полоска простирается кпереди от заднего края светлого поля на 60—75% всей его длины и маркирует передне-заднюю ось зародыша. По мере того как клетки конвергируют, образуя первичную полоску, в ней возникает углубление, называемое **первичной бороздкой**, через которую мигрирующие клетки попадают в бластоцель. Следовательно, первичная полоска птиц аналогична бластопору амфибий. На переднем конце первичной полоски имеется утолщение, называемое **первичной ямкой** или **гензеновским узелком**. В центре его находится воронкообразное углубление, через которое клетки могут проходить в бластоцель. Гензеновский узелок является функциональным эквивалентом спинной губы бластопора амфибий.

Как только сформировалась первичная полоска, клетки бластодермы начинают мигрировать через губы первичной полоски и далее в бластоцель (рис. 4.33). Подобно бластопору амфибий, первичная полоска представляет собой непрерывно меняющуюся популяцию клеток. Те клетки, которые мигрируют через гензеновский узелок, проходят в бластоцель и движутся в нем кпереди, формируя головную мезодерму и хорду; клетки, проходящие внутрь через боковые участки первичной полоски, дают начало большей части энтодермальных и мезодермальных органов. В отличие от клеток амфибий, которые мигрируют в бластоцель целыми пластами, клетки за-

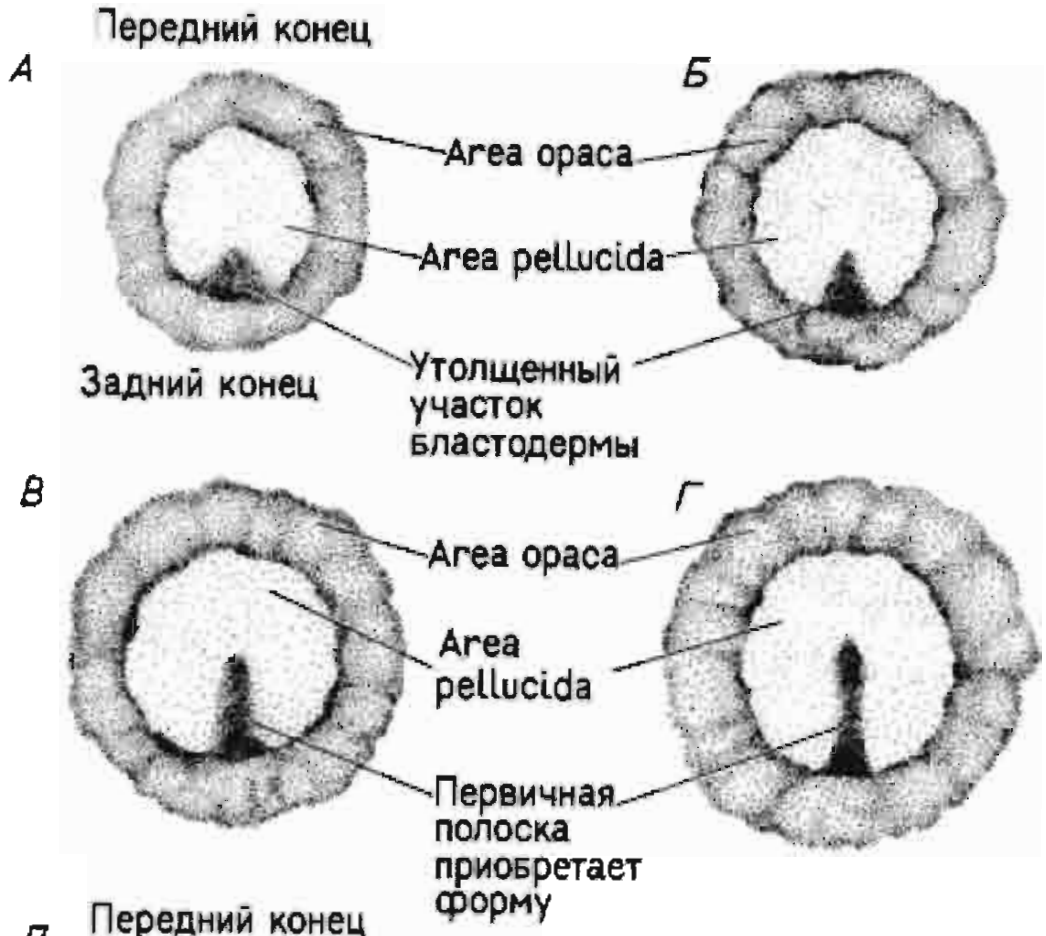


Рис. 4.30. Клеточные движения, участвующие в образовании первичной полоски. Вид с дорсальной стороны на бластодерму куриного зародыша. *А*. 3—4 ч. *Б*. 5—6 ч. *В*. 7—8 ч. *Г*. 10—12 ч. *Д*. 15—16 ч. *Е*. Общая схема этих движений клеток. (Из нескольких источников, главным образом из Spratt, 1946.)

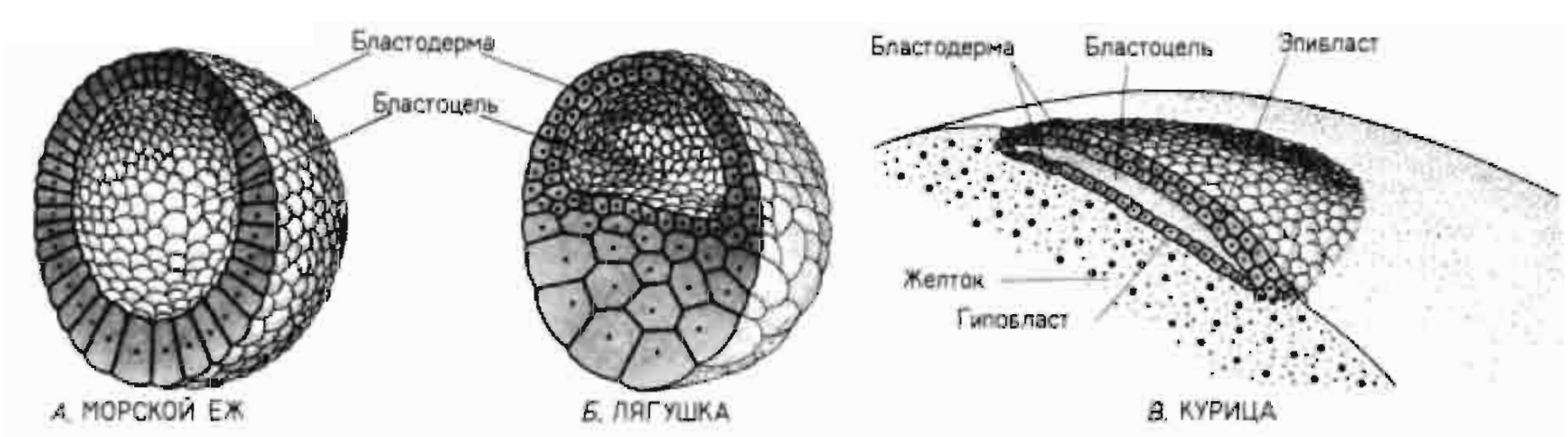


Рис. 4.31. Схематические изображения разрезов через бластулы иглокожих и ланцетника (*А*), амфибий (*Б*) и птиц (*В*). (По Carlson, 1981.)

родыша птиц вступают в первичную полоску индивидуально. Вместо того чтобы соединиться в пласт тесно связанных между собой клеток, мигрирующие клетки образуют в бластоцеле рыхлое скопление **мезенхимы**. Кроме того, в гаструле птиц не возникает настоящего архентерона.

По мере поступления клеток в первичную полоску она удлиняется в направлении будущего головного конца зародыша. В то же самое время клетки вторичного гипобласта продолжают мигрировать вперед от заднего края бластодермы. Удлинение первичной полоски, по-видимому, коррелировано с этим движением клеток вторичного гипобласта. Первыми через первичную полоску мигрируют клетки, предназначенные стать передней кишкой. Эта ситуация вновь оказывается сходной с той, что наблюдалась у амфибий. Попав в бластоцель, эти клетки движутся вперед и в конце концов замещают собой клетки гипобласта в переднем отделе зародыша. Следующие клетки, вступающие в бластоцель через гензеновский узелок, также движутся вперед, но не распространяются в вентральном направлении в такой степени, как презумптивные энтодермальные клетки. Они остаются между энтодермой и эпибластом, становясь впоследствии клетками головной мезодермы и хордомезодермы (хорды). Эти рано выселяющиеся в бластоцель клетки движутся вперед, приподнимая над собой передний участок эпибласта по срединной линии и образуя **головной отросток**. Между тем продолжается миграция клеток через первичную полоску. Попав в бластоцель, они подразделяются на два потока. Один из них движется вглубь и соединяется с гипобластом вдоль его средней линии, оттесняя клетки гипобласта в стороны. Из этих движущихся в глубине клеток происходят все энтодермальные органы, а также большая часть внезародышевых оболочек (остальные формируются гипобластом). Второй мигрирующий поток распространяется по бластоцелю в виде рыхлого пласта примерно посередине между гипобластом и эпибластом. Этот пласт дает начало мезодермальным участкам зародыша и внезародышевых оболочек. К 22 ч инкубации основная часть презумптивных энтодермальных клеток оказывается внутри зародыша, тогда как презумптивные мезодермальные клетки еще продолжают мигрировать внутрь в течение длительного времени.

Теперь начинается вторая фаза гаструляции. В то время как продолжается выселение клеток мезодермы, первичная полоска подвергается регрессии, в результате которой гензеновский узелок из своего положения вблизи центра area pellucida смещается к ее заднему краю (рис. 4.34). На этом пути он оставляет за собой дорсальную ось зародыша — головной отросток. По мере перемещения гензеновского узелка все далее кзади формируется остальной (задний)

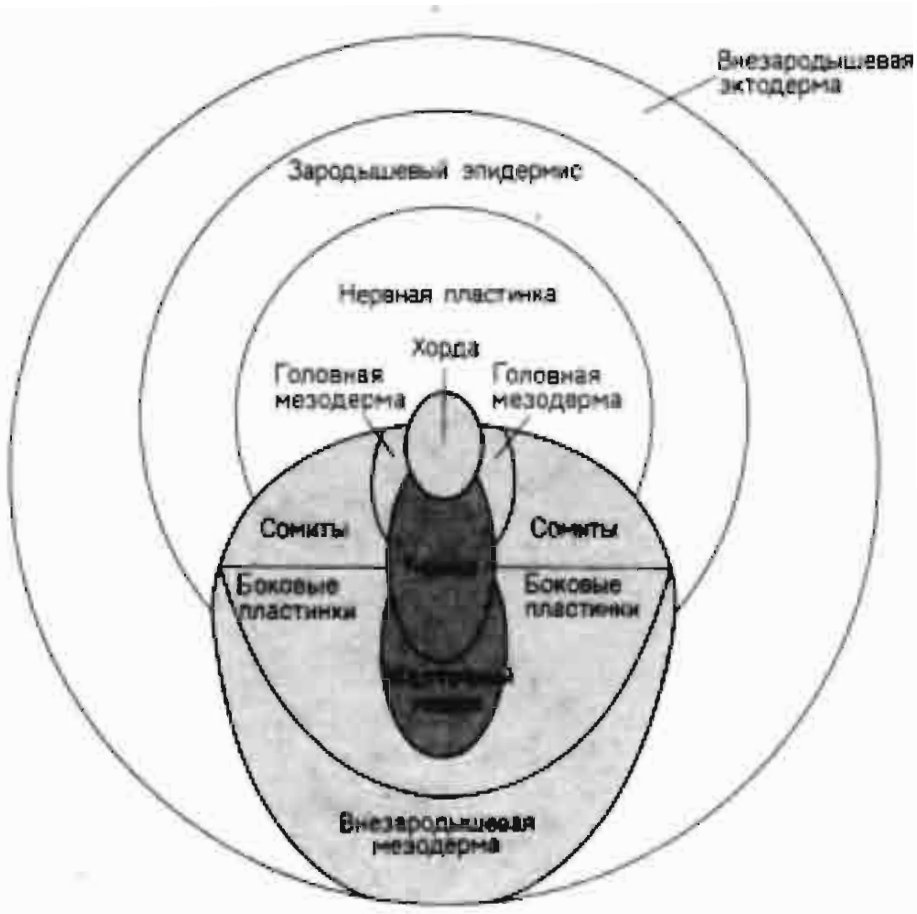


Рис. 4.32. Карта презумптивных зачатков зародыша птиц непосредственно перед началом гаструляции. Первичная полоска еще не образовалась, но впоследствии она будет простираться до области хорды. Презумптивная эктодерма обозначена белым, презумптивная мезодерма — светлосерым и презумптивная энтодерма — темносерым цветом. (По Balinsky, 1975.)

участок хорды. Наконец, узелок достигает своего окончательного положения на краю светлого поля, где и формирует анальную область зародыша на манер, свойственный истинно вторичноротым животным. К этому времени эпибласт состоит исключительно из презумптивных эктодермальных клеток.

В результате этого двухступенчатого процесса гаструляции зародыши птиц (и млекопитающих) обнаруживают отчетливый переднезадний градиент в зрелости их развития. В то время как клетки задних участков зародыша еще претерпевают гаструляцию, клетки на его переднем конце уже начинают формировать органы. В течение нескольких следующих дней становится очевидным, что передний конец зародыша более продвинут в своем развитии, чем его задний конец.

По мере того как презумптивные мезодермальные и энтодермальные клетки движутся внутрь, клетки-предшественники эктодермы окружают желток посредством эпиболии. Обрастание желтка эктодермой (снова напоминающее нам об эпиболии эктодермы у амфибий) — задача для Геркулеса, осуществление которой занимает бóльшую часть первых четырех дней инкубации и включает в себя непрерывное образование нового клеточного материала за счет запасов желтка, а также миграцию презумптивных эктодермальных клеток по нижней по-

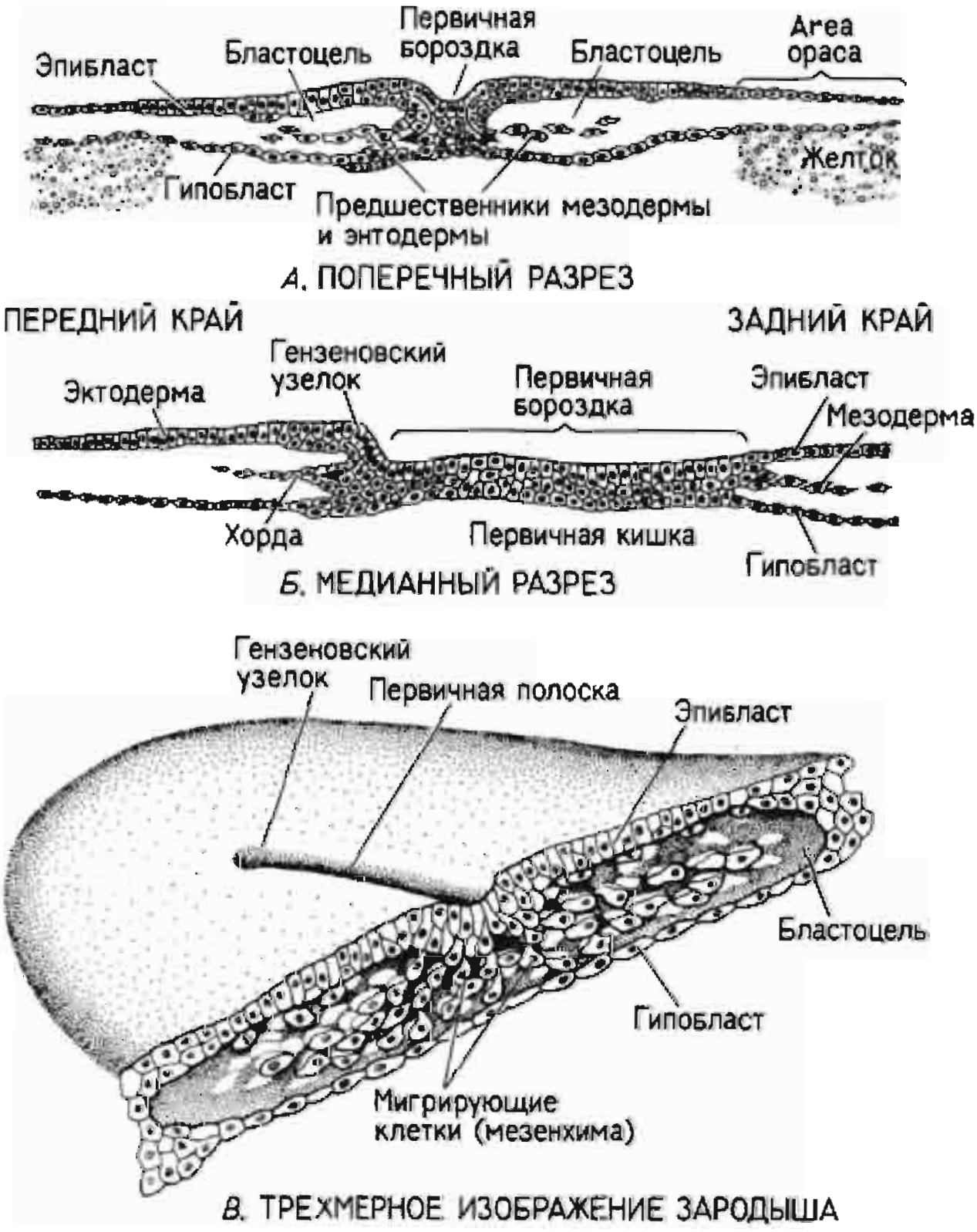


Рис. 4.33. Миграция энтодермальных и мезодермальных клеток через первичную полоску. *А*. Схематическое изображение поперечного среза зародыша в возрасте 17 ч. Показаны выселение мезодермальных и энтодермальных клеток в бластоцель и их миграция в стороны от первичной полоски. *Б*. Схематическое изображение медианного продольного среза через зародыш такого же возраста. Можно видеть, что мигрирующие через гензеновский узелок клетки объединяются, образуя хорду (головной отросток). *В*. Трехмерное изображение гаструлирующего куриного зародыша; показана связь между первичной полоской, мигрирующими клетками и двумя первичными слоями бластодермы. (*А* и *Б* — по Carlson, 1981; *В* — по Balinsky, 1975; Duband, Thiery, 1982.)

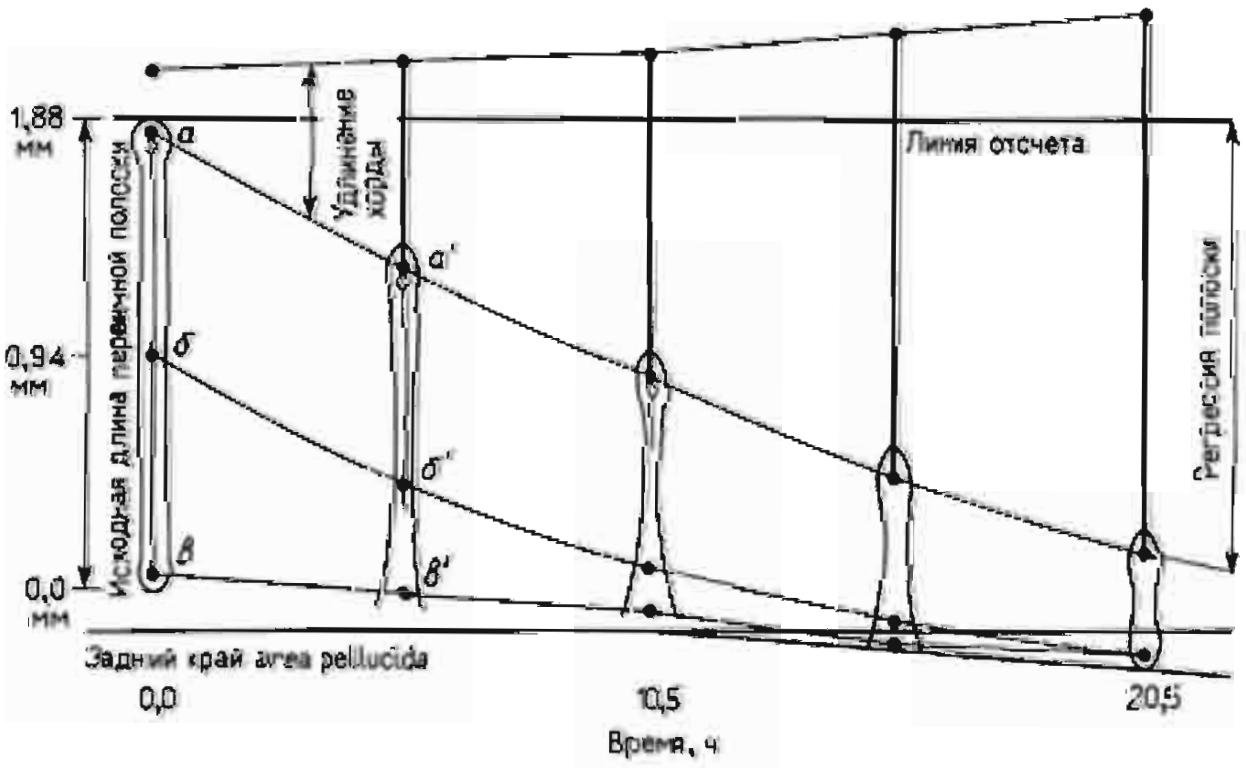


Рис. 4.34. Регрессия первичной полоски, оставляющей после себя материал хорды. Изучали изменение положения разных меток, поставленных на первичной полоске, после достижения ею максимальной длины. Этот момент принят за нуль при отсчете времени в часах. (По Spratt, 1947.)

верхности желточной оболочки. Итак, когда гаструляция у птиц близится к завершению, эктодерма окружает желток, энтодерма замещает гипобласт, а мезодерма располагается между этими двумя областями.

Механизмы гаструляции у птиц

РОЛЬ ГИПОБЛАСТА. Из гипобласта не образуется никаких клеток взрослого животного (Rosenquist, 1972), но он имеет существенное значение для правильного развития зародыша. В 1932 г. Уоддингтон (Waddington) показал, что этот нижний слой влияет на ориентацию осевых структур у куриного зародыша. Он разделял два клеточных слоя бластодиска вскоре после формирования первичной полоски. Соединяя их снова таким образом, чтобы длинные оси эпибласта и гипобласта стали почти перпендикулярными одна другой, он обнаружил, что первичная полоска отклоняется в соответствии с длинной осью гипобласта (рис. 4.35). Азар и Эйяль-Гилади (Azar, Eyal-Giladi, 1979, 1981) расширили эти наблюдения и показали, что гипобласт *индуцирует* формирование первичной полоски. Во-первых, *удаление гипобласта останавливало все последующее* развитие до тех пор, пока оставшийся эпибласт не регенерировал новый нижний слой. Во-вторых, когда удаляли популяцию клеток, происходящих из заднего края бластодермы, первичной полоски не образовывалось. Светлое поле превращалось в массу неорганизованной мезодермоподобной ткани. Следовательно, вторичный гипобласт, по-видимому, определяет формирование и ориентацию первичной полоски.

КЛЕТОЧНЫЕ ДВИЖЕНИЯ ВНУТРИ БЛАСТОЦЕЛЯ. У птиц, как и у амфибий, в процессе гаструляции апикальные концы клеток, проходящих через губу бластопора, сужаются и клетки становятся колбовидными (рис. 4.36). Сразу же после того, как эти клетки высвобождаются из первичной полоски и попадают в бластоцель, они уплощаются и включаются в поток независимо мигрирующих клеток, каждая из которых продвигается вперед, вытягивая и сокращая филоподии. В этой миграции важную роль могут играть внеклеточные сложные полисахариды. Одним из таких сложных полисахаридов является **гиалуроновая кислота**, линейный полимер глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. Это вещество продуцируется эктодермальными клетками и накапливается в бластоцеле, где оно сплошным слоем покрывает поверхность вступающих в бластоцель клеток. Фишер и Солурш (Fisher, Solursh, 1977) показали, что если этот материал подвергнуть перевариванию (инъецировав в бластоцель гиалуронидазу), мезенхимные клетки слипаются в кучки и не могут мигрировать. В ряде исследований было выявлено важное значение гиалуроновой кислоты, заключающееся в том, что она поддерживает мигрирующие клетки в диспергированном состоянии. Кроме того, гиалуроновая кислота впервые начинает накапливаться в бластоцеле точно к тому времени, когда в него попадают первые клетки. Сохранение клеток



Рис. 4.35. Изменение положения осевых структур у куриного зародыша в возрасте 24 ч, вызванное изменением положения гипобласта по отношению к развивающейся первичной полоске. На этом рисунке видно, что первичная полоска уже в значительной степени регрессировала. (Из Azar, Eyal-Giladi, 1979; фотография с любезного разрешения H. Eyal-Giladi.)

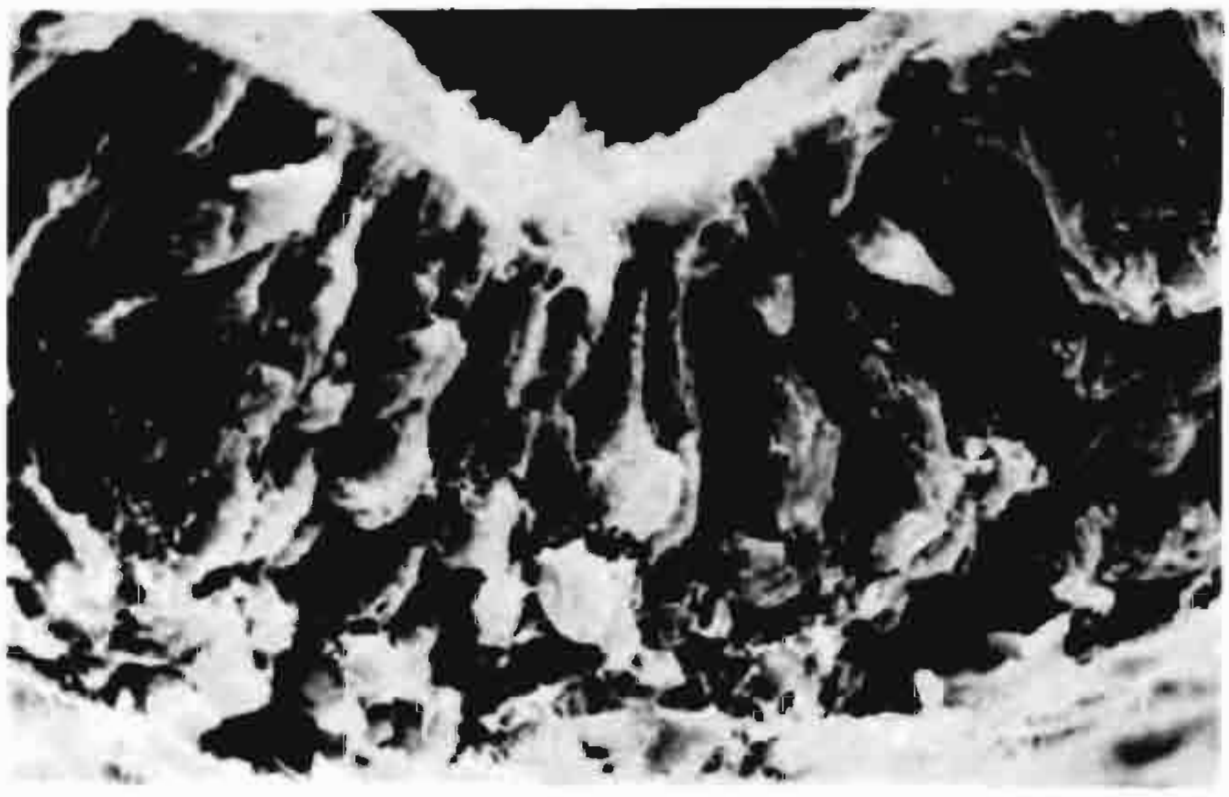


Рис. 4.36. Область первичной полоски у куриного зародыша в период гаструляции. (Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа.) Видны переходящие в бластоцель клетки эпибласта; апикальные концы этих клеток вытягиваются, и они становятся колбовидными. (Из Solursh, Revel, 1978; фотография с любезного разрешения M. Solursh.)

отделенными одна от другой обусловлено способностью гиалуроновой кислоты значительно увеличивать свой объем в воде. При попадании этого полимера в водную среду его объем возрастает более чем в 1000 раз. Следовательно, гиалуроновая кислота, по-видимому, является важным фактором, который сохраняет мезенхимные клетки диспергированными во время миграции и тем самым обеспечивает продолжение этого процесса.

Гиалуроновая кислота и другие полисахариды облегчают миграцию индивидуальных клеток, но они, по-видимому, не определяют направление движения этих клеток (Fisher, Solursh, 1979). Скорее всего, движения этих клеток коррелированы опять-таки с присутствием фибронектиновой сети во внеклеточной базальной мембране клеток эпибласта. Этот богатый фибронектином слой появляется на нижней поверхности верхнего пласта клеток незадолго до формирования первичной полоски и исчезает в области полоски. Внутри полоски клетки разделяются, и их можно видеть мигрирующими латерально по богатой фибронектином базальной мембране эпибласта (Duband, Thiery, 1982; рис. 4.37). Однако мы не располагаем четкими данными о том, что фибронектин имеет существенное значение для направления латерального движения клеток первичной полоски. Более подробно изменения поверхности клеток в период гаструляции будут обсуждаться в гл. 15.

ЭПИБОЛИЯ ЭКТОДЕРМЫ. Во время гаструляции клетки-предшественники эктодермы распространяются снаружи, окружая желток. Эти клетки соединены между собой плотными контактами и движутся как единое целое, а не по отдельности. У птиц верхняя поверхность темного поля плотно слипается с нижней поверхностью желточной оболочки и распространяется по ней. Такое же поведение обнаруживается и в условиях культивирования. Нью (New, 1959) показал, что изолированная бластодерма нормально распространяется по изолированной желточной оболочке, а Спратт (Spratt, 1963) обнаружил, что такого распространения не происходит по другим субстратам. Эти наблюдения подтверждают важную роль желточной оболочки в распространении клеточного пласта. Интересно, что только краевые клетки (т. е. клетки area opaca) прочно прикрепляются к поверхности желтка. Большая часть клеток бластодермы прикреплена рыхло или совсем не прикреплена к ней. Эти краевые клетки отличаются от остальных клеток изначально присущей им способностью простирать по желточной оболочке огромные (500 мкм) цитоплазматические отростки. Считается, что эти удлиненные филоподии являются локомоторным аппаратом краевых клеток.

Имеется несколько групп данных, свидетельствующих о том, что краевые клетки темного поля являются действующей силой в эпиболии эктодермы. Во-первых, бластодерма распространяется по желтку только тогда, когда распространяются ее края. Во-вторых, если краевые клетки отрезаны от остальной части бластодермы, то они продолжают распространяться по желтку одни. Отсюда, по-видимому, следует, что клетки-предшественники эктодермы приводятся в движение активно мигрирующими клетками area opaca (Schlesinger, 1958). Существуют также специфические взаимоотношения между мембранами краевых клеток и нижней поверхностью желточной оболочки. Нью (New, 1959) показал, что, когда бластодерму помещают на желточную оболочку верхней стороной вниз (в контакт с желточной мембраной приходят глубокие клетки), края бластодермы заворачиваются кверху так, что краевые клетки верхнего слоя снова приходят в контакт с поверхностью желтка (рис. 4.38). Таким образом, существует, по-видимому, специфическое узнавание краевыми клетками area opaca внутренней поверхности желточной оболочки; это узнавание существенно для миграции эктодермы, окружающей желток в процессе эпиболии.

Гаструляция у млекопитающих

И птицы, и млекопитающие являются потомками рептилий. Поэтому нет ничего удивительного

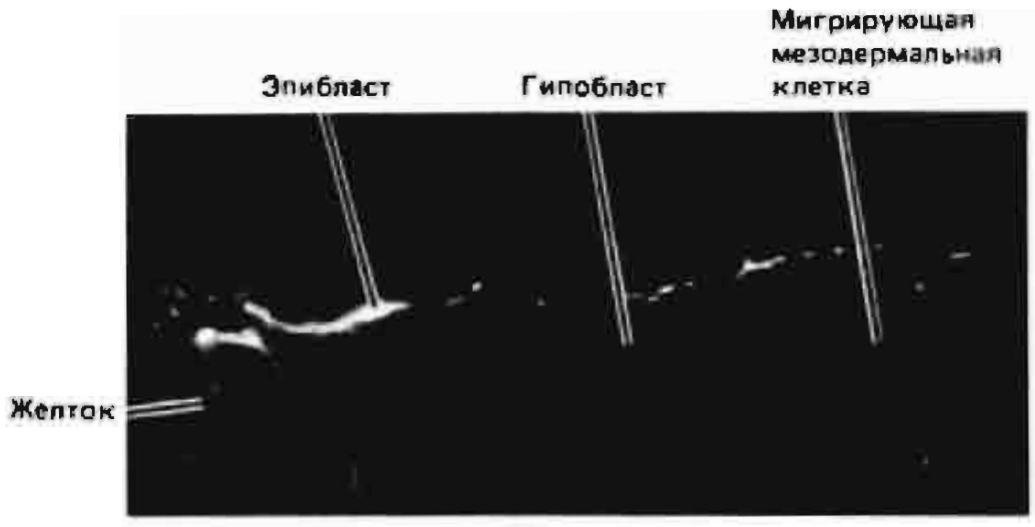


Рис. 4.37. Миграция клеток куриного зародыша по содержащей фибронектин базальной мембране эпибласта. Флуоресцирующие антитела метят матрикс, отделяющий клетки эпибласта от клеток среднего слоя, мигрирующих между эпибластом и гипобластом. (Из Duband, Thiery, 1982; фотография с любезного разрешения J. L. Duband.)

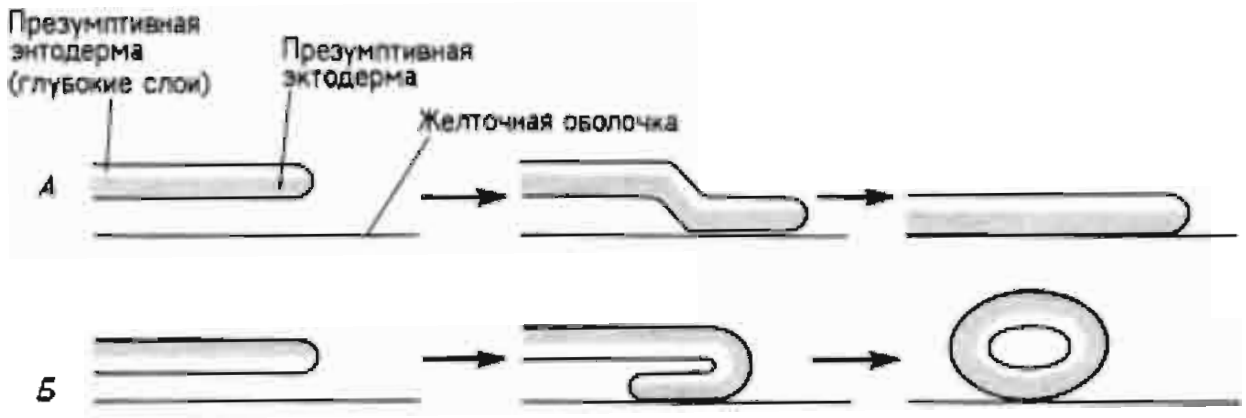


Рис. 4.38. Изучение способности клеток-предшественников эктодермы к миграции. *А*. Если бластодерму куриного зародыша поместить на желточную оболочку так, что с поверхностью оболочки контактируют клетки-предшественники эктодермы, то краевые клетки мигрируют по этой поверхности и покрывают ее. *Б*. Если же бластодерму поместить на желточную оболочку так, что с поверхностью желточной оболочки контактируют ее глубокие слои, то она сворачивается таким образом, что клетки поверхностного слоя могут прилипнуть к оболочке и мигрировать по ней. В результате образуется замкнутый пузырек. (По New, 1959.)

в том, что развитие млекопитающих имеет много общего с развитием рептилий и птиц. Удивительно то, что особенности движений гаструляции, возникшие у рептилий и птиц в эволюции как адаптация к развитию зародышей из яиц, богатых желтком, сохранились при развитии млекопитающих даже в отсутствие больших запасов желтка в яйце. Внутренняя клеточная масса, которую можно представить себе сидящей на верхушке воображаемого шара желтка, следует инструкциям, которые кажутся более подходящими для предков млекопитающих.

Вместо того чтобы развиваться самостоятельно, большинство млекопитающих разработали замечательную стратегию развития внутри своей матери. Зародыш млекопитающих получает питательные вещества непосредственно от матери, а не пользуется накопленным желтком. Эта эволюция повлекла за собой резкие перемены в материнской анатомии (такие, как расширение нижнего отдела яйцевода, образующее матку), а также развитие у плода органа, способного к усвоению материнской пищи. Этот орган плода — **плацента** — происходит первично из эмбриональных клеток трофобласта, дополненного мезодермальными клетками, происходящими из внутренней клеточной массы.

Происхождение различных тканей раннего зародыша млекопитающих суммировано на рис. 4.39. Первое разделение клеток в пределах внутренней клеточной массы заключается в формировании слоя **гипобласта**, называемого иногда первичной энтодермой (рис. 4.40). Эти клетки, отделяясь от внутренней клеточной массы, вселяются в полость бластоцисты, где из них образуется **энтодерма желточного мешка**. Как и у зародышей птиц, у млекопитающих эти клетки не участвуют в построении какой-либо части организма новорожденного. Оставшуюся на поверхно-



Рис. 4.39. Схема, иллюстрирующая происхождение различных тканей у зародышей человека и макака-резуса. (По Luckett, 1978.)

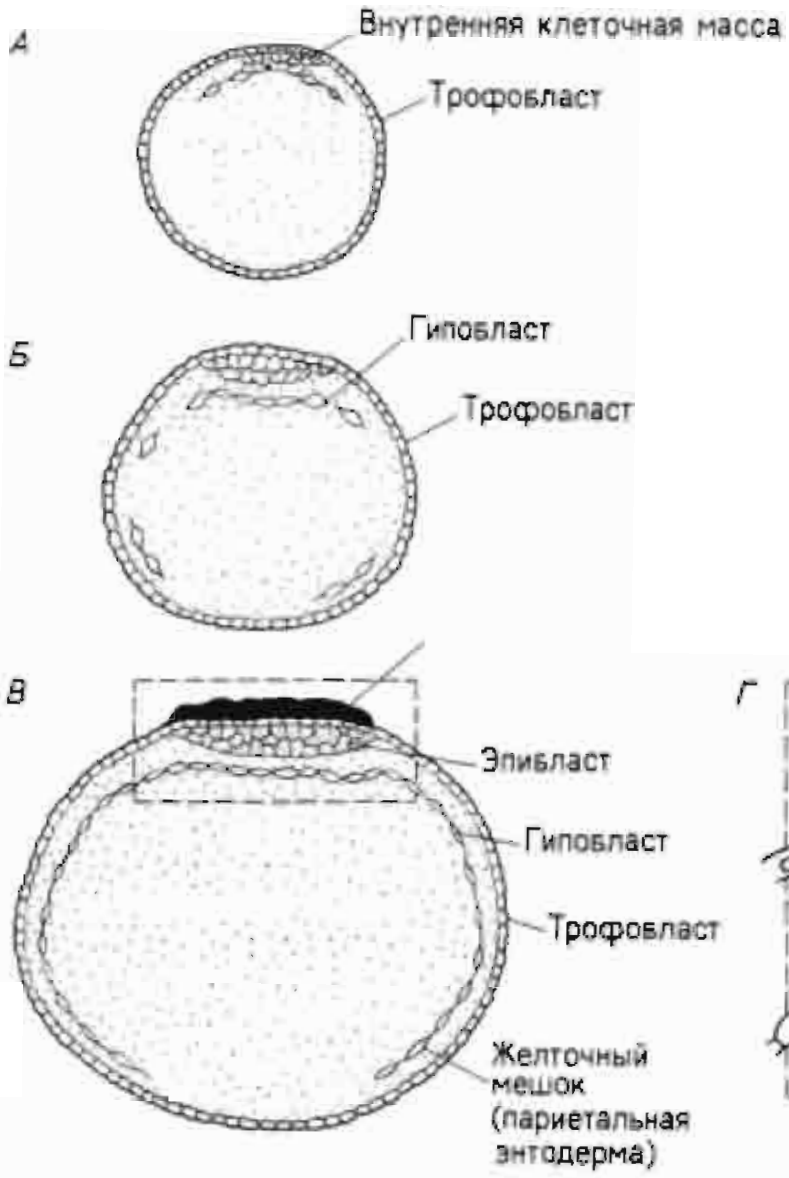


Рис. 4.40. Бластоциста млекопитающих непосредственно перед началом гаструляции. Внутренняя клеточная масса расщепляется на клетки гипобласта, выстилающие трофобласт и образующие энтодерму желточного мешка (*А*—*В*), и на бластодиск (*Г*), состоящий из двух слоев (эпибласта и гипобласта); происходит это примерно так же, как у зародышей птиц. У некоторых млекопитающих трофобласт может разделяться на полярный (покрывающий внутреннюю клеточную массу) и муральный. (По Carlson, 1981.)

сти часть внутренней клеточной массы, лежащую над гипобластом, теперь следует считать **эпибластом**. Эпибласт затем расщепляется посредством мелких трещин, которые в конце концов сливаются, отделяя **зародышевый эпибласт** от других клеток эпибласта, образующих выстилку **амниона** (рис. 4.41). После образования выстилки амнион наполняется секретом, называемым амниотической жидкостью, которая служит «поглотителем шоков», или амортизатором, и в то же время предотвращает высыхание развивающегося зародыша.

Считается, что эмбриональный эпибласт содержит все клетки, необходимые для образования самого зародыша. В этом отношении он сходен с эпибла-

Рис. 4.41. Формирование амниона у зародыша человека. Гипобласт находится вблизи внутренней клеточной массы, и его клетки делятся, формируя синцитиальный трофобласт, который внедряется в матку. Тем временем эпибласт расщепляется на амниотическую эктодерму и зародышевый эпибласт. Все последующее развитие зародыша будет осуществляться исключительно за счет зародышевого эпибласта. (По Carlson, 1981.)

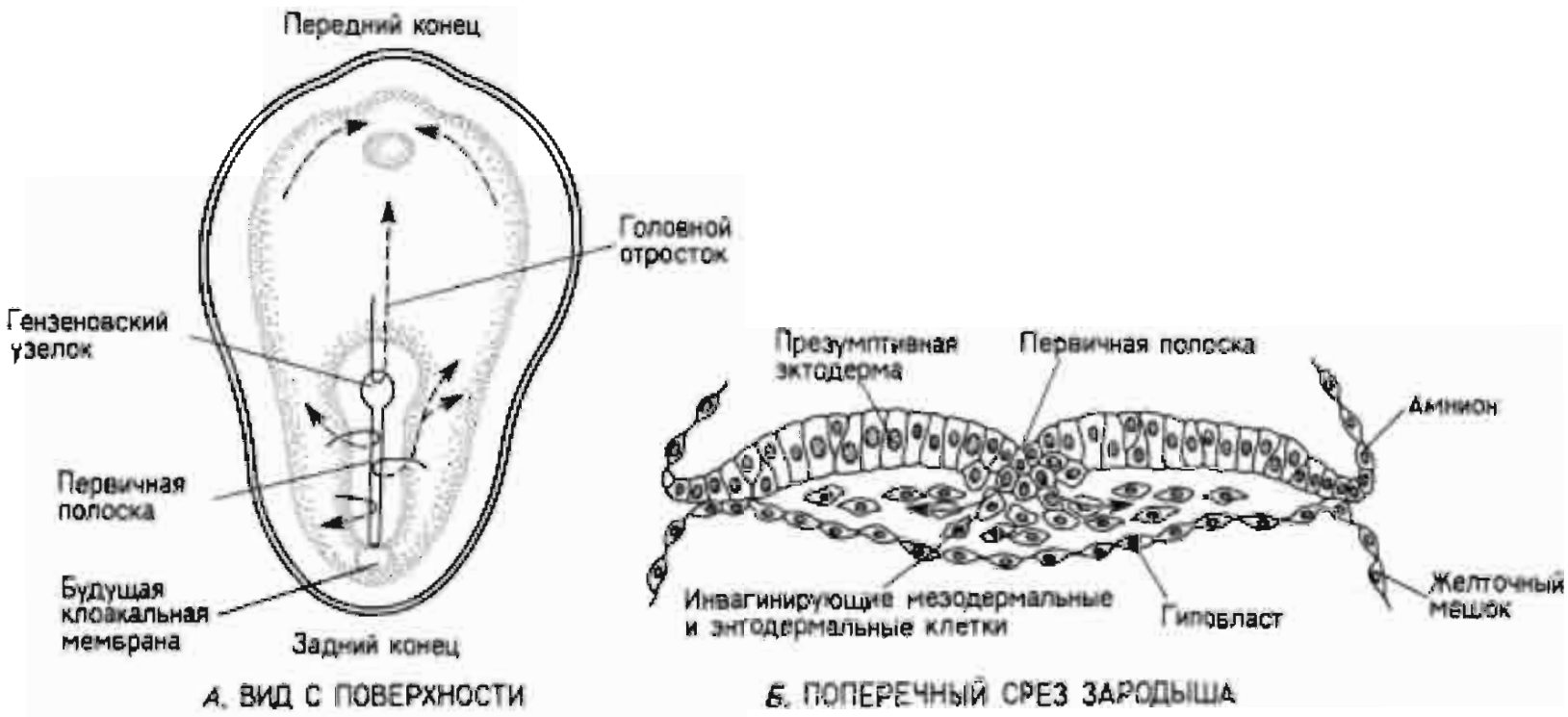


Рис. 4.42. Клеточные движения в период гаструляции у млекопитающих. *А*. Схематическое изображение дорсальной поверхности зародышевого эпибласта (эктодерма амниона удалена). Как и у куриных зародышей, клетки, мигрирующие через гензеновский узелок, движутся к переднему (головному) концу, образуя материал хорды, тогда как клетки, мигрирующие через первичную полоску, движутся в латеральном направлении, становясь предшественниками мезодермы и энтодермы. Штриховыми стрелками показаны движения инвагинировавших клеток. *Б*. Поперечный разрез зародыша. (По Langman, 1981.)

стом птиц. На заднем крае эмбрионального эпибласта образуется локальное утолщение, в итоге дающее начало первичной полоске, через которую мигрируют клетки-предшественники энтодермы и мезодермы (рис. 4.42). Как и у зародыша птиц, клетки, мигрирующие между слоями гипобласта и эпибласта, покрыты гиалуроновой кислотой, синтез которой начинается с момента формирования первичной полоски (Solursh, Morriss, 1977).

В то время как в зародышевом эпибласте наблю-

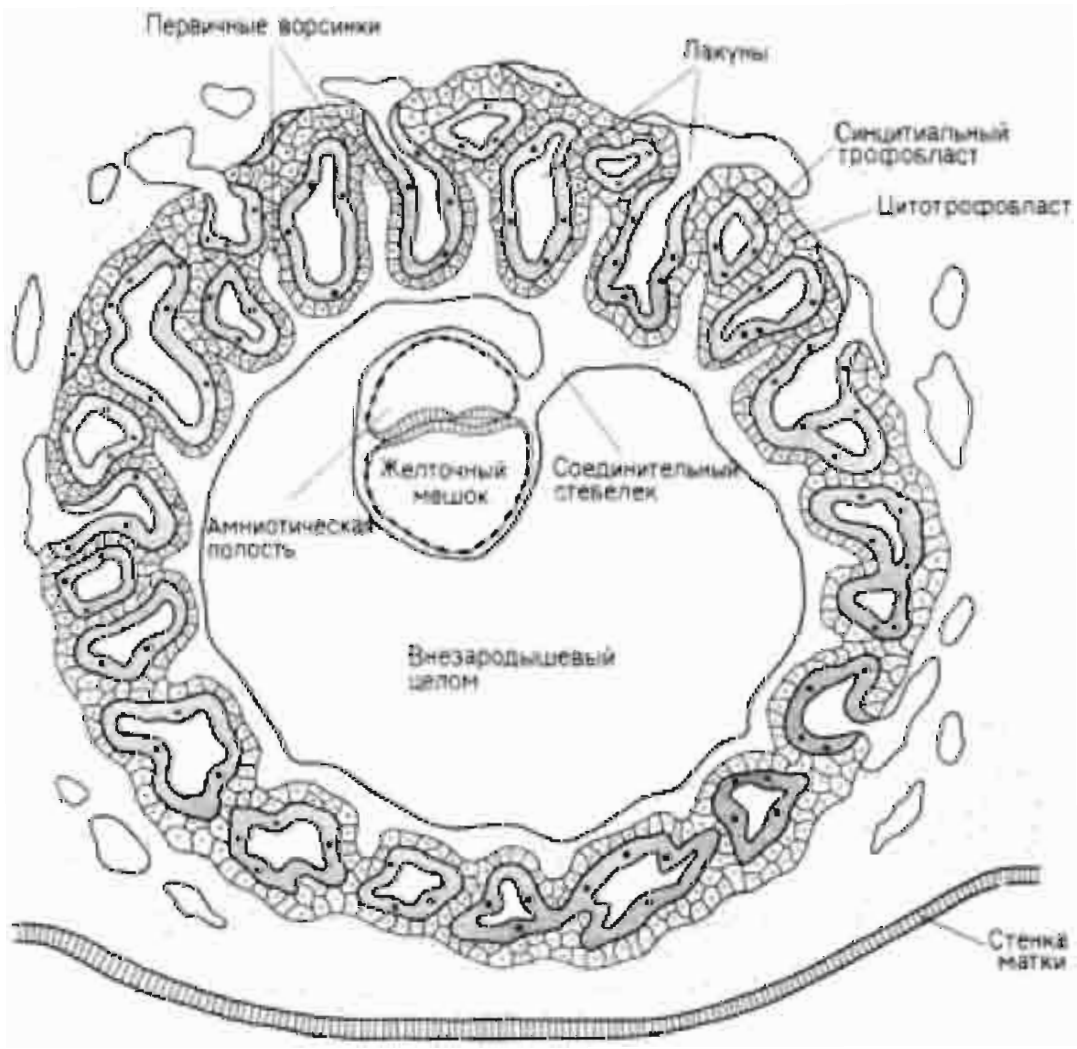


Рис. 4.43. Схематическое изображение гаструлирующего зародыша человека к концу третьей недели беременности. Сформировались амниотическая полость (между амниотической эктодермой и зародышевым эпибластом) и желточный мешок (образованный гипобластом). В будущей передней области хорда приподнимает эпибласт, а клетки трофобласта, формирующие плаценту, приходят в контакт с кровеносными сосудами матки. Зародыш связан с трофобластом стебельком внезародышевой мезодермы (ножкой тела), в котором вскоре будут проходить кровеносные сосуды плода к плаценту. (По Langman, 1981.)

даются движения клеток, напоминающие движения клеток при гаструляции у рептилий и птиц, из клеток внезародышевых тканей образуются органы, характерные только для млекопитающих и обеспечивающие выживание плода в матке. Хотя исходные клетки трофобласта кажутся вполне нормальными, часть их образует популяцию, в которой деления ядер не сопровождаются цитокинезом. Первый тип — нормально делящиеся клетки — составляет слой, называемый **цитотрофобластом**, тогда как второй тип клеток формирует **синцитиальный трофобласт**. Эта последняя ткань внедряется в слизистую матки, замуровывая в ней зародыша. Матка в свою очередь посылает в эту область кровеносные сосуды, где они затем контактируют с синцитиальным трофобластом. Вскоре после этого мезодермальная ткань простирается кнаружи от гаструлирующего зародыша (рис. 4.43). Лакетт (Luckett, 1978) показал, что эта ткань мигрирует через первичную полоску, но становится внезародышевой, а не зародышевой мезодермой и входит в ворсинки трофобласта. Из внезародышевой мезодермы формируются кровеносные сосуды, несущие питательные вещества от матери к зародышу. Узкий **соединительный стебелек** из внезародышевой мезодермы соединяет зародыш с трофобластом, а затем формирует сосуды **пупочного канатика**. Полностью развитый орган, состоящий из ткани трофобласта и содержащий внезародышевые кровеносные сосуды, называется **хорионом**; сливаясь со стенкой матки, хорион образует плаценту. Хорион может очень плотно прилегать к материнским тканям, но при этом очень легко отделяться от них (как это наблюдается в **контактной плаценте** у свиньи) или может быть настолько глубоко интегрирован в матку, что их нельзя разделить без повреждения и матери, и развивающегося плода (так устроена **отпадающая**, или **децидуальная**, плацента большинства млекопитающих, включая человека).

Дополнительные сведения и гипотезы

Функция хориона

Выше уже упоминалось о двух функциях внезародышевых тканей, производных трофобласта. Первая функция — это функция самого трофобласта, которую он осуществляет в процессе имплантации бластоцисты в стенку матки. Вторая начинает выполняться после формирования кровеносных сосудов — это транспорт растворимых веществ между плодом и матерью. На рис. 4.44 показана связь между зародышевыми и внезародышевыми структурами у шестинедельного плода человека. Видно, что плод заключен в амнион и, кроме того, защищен еще хорионом. Можно легко различить кровеносные сосуды, входящие в хорион и выходящие из него, а также ворсинки, простирающиеся от наружной поверхности хориона. Эти ворсинки содержат кровеносные сосуды и увеличивают площадь хориона, доступную для материнской крови. Таким образом, хотя кровеносные сосуды плода и матери нигде не сливаются, растворенные в крови вещества могут диффундировать через ворсинки (рис. 4.45). Этим способом мать снабжает плод питательными веществами и кислородом, а плод отправляет в кровеносную систему матери конечные продукты обмена (главным образом диоксид углерода и мочевину).

Но это еще не все, что плод посылает матери. Третья функция хориона — регуляторная. Он продуцирует **хорионический гонадотропин** — пептидный гормон, способный побуждать другие клетки плаценты (и материнского яичника) к синтезу **прогестерона**. Прогестерон — это стероидный гормон, который поддерживает стенку матки утолщенной и пол-



Рис. 4.44. Человеческий зародыш и плацента через 40 дней беременности. Зародыш лежит в амнионе, и можно видеть его кровеносные сосуды, простирающиеся в ворсинки хориона. Сферическое образование справа от зародыша — желточный мешок. (Фотография из коллекции Института Карнеги в Вашингтоне; с любезного разрешения C. F. Reather.)

ной кровеносных сосудов. После первой трети беременности яичник у приматов можно удалить, при этом развитие плода будет продолжаться, потому что хорион сам способен продуцировать этот стероид, необходимый для сохранения беременности (Zander, Münstermann, 1956). Прогестерон плаценты используется также надпочечниками плода как субстрат для выработки биологически важных кортикостероидных гормонов. Третий гормон, продуцируемый хорионом,— **хорионический соматомаммотропин** (часто называемый плацентарным лактогеном). Этот гормон стимулирует развитие молочных желез матери, а позже способствует выработке молока у нее.

Недавние исследования показали, что хорион может выполнять и другую функцию, а именно защиту плода от иммунного ответа матери. Каждая особь с нормальной иммунной системой может узнать чужие клетки в своем теле и отторгнуть их. Это выражается в отторжении пересаженных кожи и других органов у генетически различающихся индивидуумов. Гликопротеины, ответственные за это отторжение, называются **антигенами главного комплекса тканевой совместимости** и различаются у разных индивидуумов. Антигены тканевой совместимости ребенок наследует и от отца, и от матери, и мать способна отторгать пересаженные ей кожу или какой-либо орган собственного ребенка, потому что он содержит отцовские антигены. Как же в таком случае плод может в течение 9 мес сохраняться в теле матери? Почему мать не отторгает плод, как она делает это с органом, пересаженным ей от своего собственного ребенка?

Известно, что экспрессия отцовских антигенов начинается в развитии рано и что эти антигены обнаруживаются в клетках синцитиального трофобласта. Следовательно, локализация отцовских антигенов, по-видимому, такова, что они должны стимулировать иммунный ответ матери. Одна из гипотез для объяснения того, почему материнская иммунная система не отторгает плод, состоит в том, что хорион продуцирует вещества, блокирующие иммунную реакцию матери. Рассмотрим одно исследование, поддерживающее эту гипотезу. Данные, полученные в этом исследовании, показали (McIntire, Faulk, 1979), что клеточные мембраны синцитиального трофобласта у человека содержат вещество, которое подавляет деление некоторых клеток иммунной системы. Клеточный иммунный ответ, который приводит к отторжению, обусловлен клетками особого типа, так называемыми **Т-лимфоцитами** или просто **Т-клетками**. Т-клетки могут быстро делиться, когда встречаются с другой клеткой, содержащей иные антигены главного комплекса тканевой совместимости. Затем они помогают другим Т-клеткам разрушить чужие клетки или ткань. Реактивность Т-клеток оценивали в культуре смешанных лимфоцитов, определяя клеточную пролиферацию в смеси

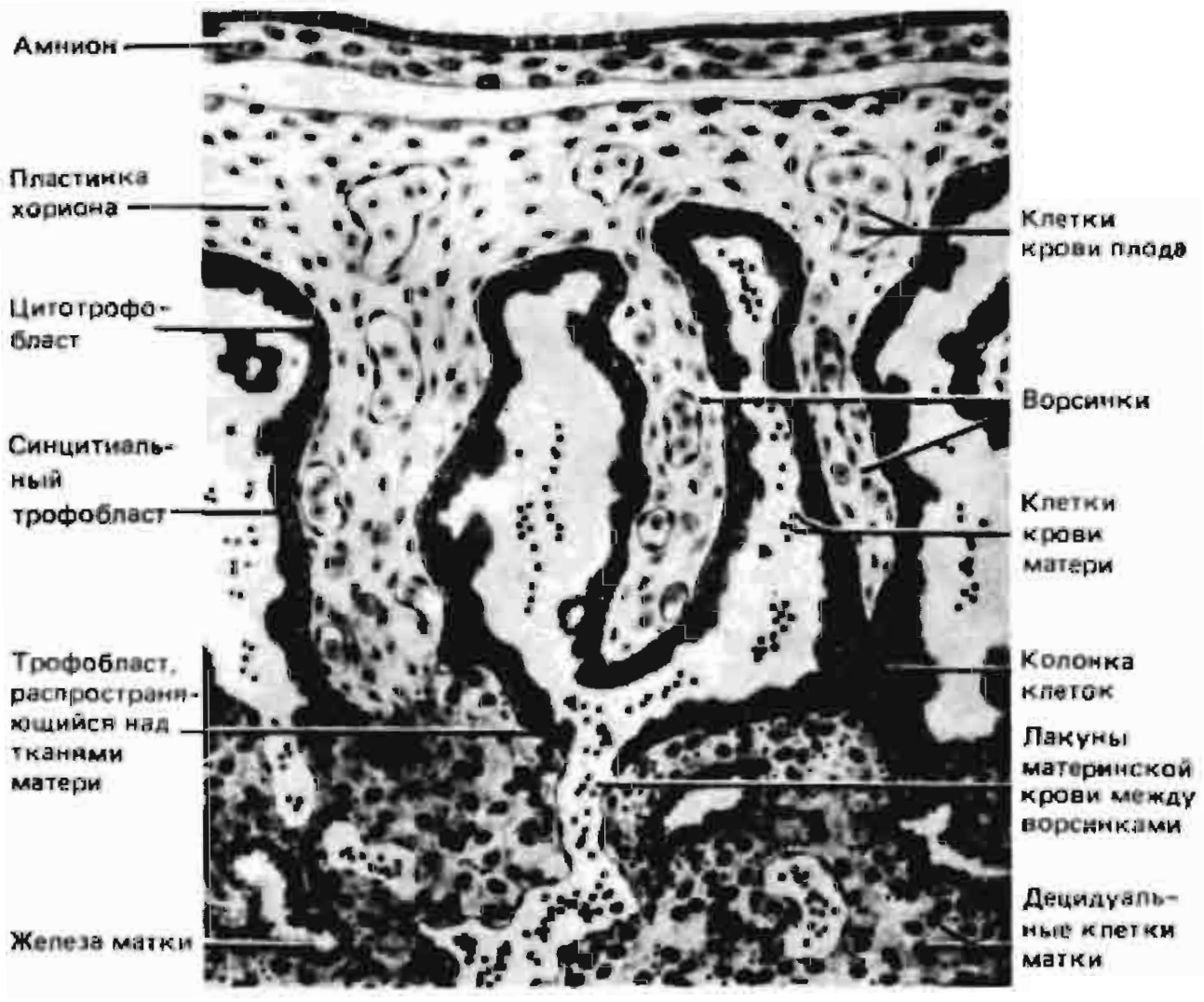


Рис. 4.45. Связь между ворсинками хориона и материнской кровью в матке. (По Hill, 1932.)

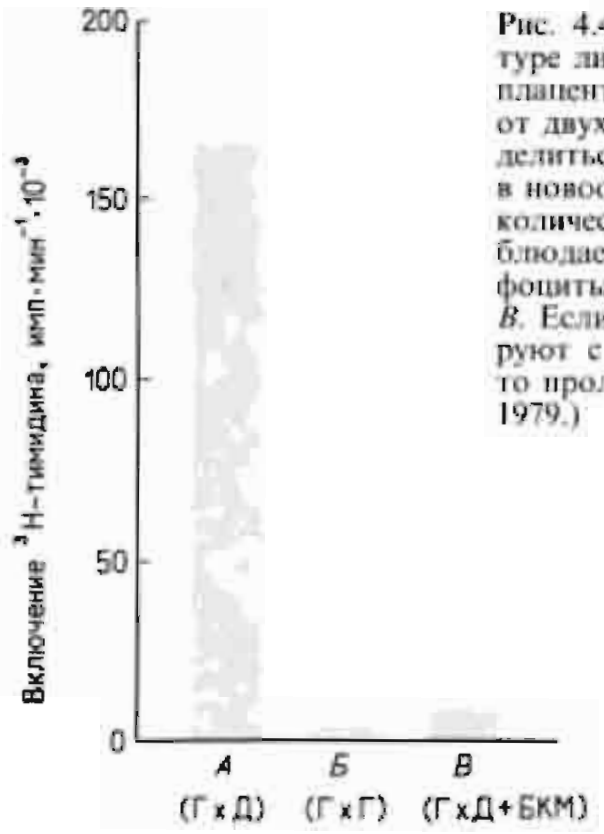


Рис. 4.46. Подавление пролиферации в смешанной культуре лимфоцитов материалом, экстрагированным из плаценты. *А*. Если смешать вместе лимфоциты, взятые от двух индивидуумов Г. и Д., то они начинают активно делиться, так как узнают чужие антигены. Поэтому в новообразованную ДНК будут включаться большие количества радиоактивного тимидина. *Б*. Этого не наблюдается в том случае, когда смешивают вместе лимфоциты, полученные от одного и того же индивидуума. *В*. Если смесь лимфоцитов (указанную на *А*) инкубируют с белками клеточных мембран трофобласта (БКМ), то пролиферация подавляется. (По McIntire, Faulk, 1979.)

двух популяций лимфоцитов. Если лимфоциты, взятые от индивидуума Г., смешивали с его же лимфоцитами, но предварительно облученными, чтобы предотвратить пролиферацию, то необлученные лимфоциты не делились (рис. 4.46). Однако, когда такие же лимфоциты смешивали с облученными лимфоцитами Д., необлученные лимфоциты Г. быстро делились и включали в ДНК радиоактивные предшественники. Реакцию можно было подавить добавлением к смеси экстракта белков клеточных мембран (БКМ) синцитиального трофобласта. Экстракты из других органов, приготовленные тем же способом, не подавляли деления клеток. Следовательно, клеточный иммунный ответ, по-видимому, может быть подавлен веществом, обнаруженным в клеточных мембранах синцитиального трофобласта. Вероятно, это только один из возможных путей, которыми хорион защищает плод от иммунной системы матери. Поэтому хорион следует считать сложным органом с несколькими функциями, каждая из которых способствует развитию лишенных желтка зародышей млекопитающих в теле матери.

Итак, при изучении гаструляции мы встречаемся с серией поразительно хорошо координированных клеточных движений, с помощью которых бластомеры, образовавшиеся в период дробления, перераспределяются и начинают взаимодействовать со своими новыми соседями. Кроме того, хотя между гаструляционными движениями у морских ежей, амфибий, птиц и млекопитающих имеются различия, некоторые механизмы этих движений являются общими для всех них. Каждая группа решает проблему — как привести клетки-предшественники мезодермы и энтодермы внутрь тела зародыша, одновременно окружив их клетками-предшественниками эктодермы. Отличающаяся от других по количеству и распределению желтка в яйце, а также живущая в разных условиях окружающей среды, каждая группа организмов нашла в процессе эволюции свой способ достижения этой цели. Итак, условия для формирования первых органов зародыша подготовлены.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Anstrom J. A., Chin J. E., Leaf D. S., Parks A. L., Raff R. A. (1987). Localization and expression of msp 130, a primary mesenchyme lineage-specific cell surface protein of the sea urchin embryo. Development **101**, 255-265.

Azar Y., Eyal-Giladi H. (1979). Marginal zone cells — the primitive streak inducing component of the primary hypoblast in the chick. J. Embryol. Exp. Morphol. **52**, 79-88.

Azar Y., Eyal-Giladi H. (1981). Interaction of epiblast and hypoblast in the formation of the primitive streak and the embryonic axis in chick, as revealed by hypoblast rotation experiments. J. Embryol. Exp. Morphol. **61**, 133-141.

Balinsky B. I. (1975). Introduction to Embryology, 4th Ed. Saunders, Philadelphia.

Black S. D., Gerhart J. (1985). Experimental control of the site of embryonic axis formation in *Xenopus laevis* eggs centrifuged before first cleavage. Dev. Biol. **108**, 310-324.

Black S. D., Gerhart J. (1986). High frequency twinning of *Xenopus laevis* embryos from eggs centrifuged before first cleavage. Dev. Biol. **116**, 228-240.

Boucaut J.-C., D'Arribere T., Poole T. J., Aoyama H., Yamada K. M., Thiery J. P. (1984). Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: A competitive peptide inhibition of fibronectin function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryos. J. Cell Biol. **99**, 1822-1830.

Boucaut J.-C., D'Arribere T., Li S. D., Boulekbache H., Yamada K. M., Thiery J. P. (1985). Evidence for the role of fibronectin in amphibian gastrulation. J. Embryol. Exper. Morphol. **89** [Supp.], 211-227.

Carlson B. M. (1981). Patten's Foundations of Embryology, 4th Ed. McGraw-Hill, New York.

Cooke J. (1986). Permanent distortion of positional system of *Xenopus* embryo by brief early perturbation in gravity. Nature **319**, 60-63.

Delarue M., D'Arribere T., Aimar C., Boucaut J.-C. (1985). Bufonid nucleocytoplasmic hybrids arrested at the early gastrula stage lack a fibronectin-containing fibrillar extra-

cellular matrix. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **194**, 275-280.

Duband J. L., Thiery J. P. (1982). Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. Dev. Biol. **94**, 337-350.

Ettensohn C. A. (1985). Gastrulation in the sea urchin embryo is accompanied by the rearrangement of invaginating epithelial cells. Dev. Biol. 112, 383-390.

Fink R. D., McClay D. R. (1985). Three cell recognition changes accompany the ingression of sea urchin primary mesenchyme cells. Dev. Biol. **107**, 66-74.

Fisher M., Solursh M. (1977). Glycosaminoglycan localization and role in maintenance of tissue spaces in the early chick embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. **42**, 195-207.

Galileo D. S., Morrill J. B. (1985). Patterns of cells and extracellular material of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata; Echinoidea) embryo, from hatched blastula to late gastrula. J. Morphol. **185**, 387-402.

Gerhart J., Ubbels G., Black S., Hara K., Kirschner M. (1981). A reinvestigation of the role of the grey crescent in axis formation in *Xenopus laevis*. Nature **292**, 511-516.

Gerhart J. and seven others (1986). Amphibian early development. Bio-Science **36**, 541-549.

Gibbins J. R., Tilney L. G., Porter K. R. (1969). Microtubules in the formation and development of the primary mesenchyme of *Arbacia punctulata*. Dev. Biol. **18**, 523-539.

Gimlich R. L., Gerhart J. C. (1984). Early cellular interaction promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. Dev. Biol. **104**, 117-130.

Gustafson T., Wolpert L. (1961). Studies on the cellular basis of morphogenesis in sea urchin embryos: Directed movements of primary mesenchyme cells in normal and vegetalized larvae. Exp. Cell Res. **24**, 64-79.

Gustafson T., Wolpert L. (1967). Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. Biol. Rev. **42**, 442-498.

Hardin J. D., Cheng L. Y. (1986). The mechanisms and mechanics of archenteron elongation during sea urchin gastrulation. Dev. Biol. **115**, 490-501.

Harkey M. A., Whiteley A. M. (1980). Isolation, culture and differentiation of echinoid primary mesenchyme cells. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **189**, 111-122.

Heifetz A., Lennarz W. J. (1979). Biosynthesis of N-glycosidically linked glycoproteins during gastrulation of sea urchin embryos. J. Biol. Chem. **254**, 6119-6127.

Hill J. P. (1932). The developmental history of primates. Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol] **221**, 45-178.

Holtfreter J. (1943). A study of the mechanics of gastrulation: Part I. J. Exp. Zool. **94**, 261-318.

Holtfreter J. (1944). A study of the mechanics of gastrulation: Part II. J. Exp. **95**, 171-212.

Hörstadius S. (1939). The mechanics of sea urchin development, studied by operative methods. Biol. Rev. **14**, 132-179.

Karp G. C., Solursh M. (1974). Acid mucopolysaccharide metabolism, the cell surface, and primary mesenchyme cell activity in the sea urchin embryo. Dev. Biol. **41**, 110-123.

Karp G. C., Solursh M. (1985). Dynamic activity of the filopodia of sea urchin embryonic cells and their role in directed migration of the primary mesenchyme *in vitro*. Dev. Biol. **112**, 276-283.

Katoh H., Hayashi M. (1985). Role of fibronectin in primary mesenchyme cell migration in the sea urchin. J. Cell Biol. **101**, 1487-1491.

Keller R. E. (1975). Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. I. Prospective areas and morphogenetic movements of the superficial layer. Dev. Biol. **42**, 222-241.

Keller R. E. (1976). Vital dye mapping of the gastrula and neurula of *Xenopus laevis*. II. Prospective areas and morphogenetic movements in the deep layer. Dev. Biol. **51**, 118-137.

Keller R. E. (1978). Time-lapse cinemicrographic analysis of superficial cell behaviour during and prior to gastrulation in *Xenopus laevis*. J. Morphol. **157**, 223-248.

Keller R. E. (1980). The cellular basis of epiboly: An SEM study of deep cell rearrangement during gastrulation of *Xenopus laevis*. J. Embryol. Exp. Morphol. **60**, 201-243.

Keller R. E. (1981). An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in the gastrulation of *Xenopus laevis*. J. Exp. Zool. **216**, 81-101.

Keller R. E. (1986). The cellular basis of amphibian gastrulation. In: L. Browder (ed.), Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis, Vol. 2. Plenum Press, New York, pp. 241-327.

Keller R. E., Schoenwolf G. C. (1977). An SEM study of cellular morphology, contact, and arrangement as related to gastrulation in *Xenopus laevis*. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **182**, 165-186.

Keller R. E., Danilchik M., Gimlich R., Shin J. (1985). Convergent extension by cell intercalation during gastrulation of *Xenopus laevis*. In: G. M. Edelman (ed.), Molecular Determinants of Animal Form. Alan R. Liss, New York, pp. 111-141.

Kirschner M. W., Gerhart J. C. (1981). Spatial and temporal changes in the amphibian egg. Bioscience **31**, 381-388.

Landstrom U., Løvtrup S. (1979). Fate maps and cell differentiation in the amphibian embryo: An experimental study. J. Embryol. Exp. Morphol. **54**, 113-130.

Langman J. (1981). Medical Embryology, 4th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

Lillie F. R. (1902). Differentiation without cleavage in the egg of the annelid *Chaetopterus pergamentaceous*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **14**, 477-499.

Løvtrup S. (1975). Fate maps and gastrulation in amphibia: A critique of current views. Can. J. Zool. **53**, 473-479.

Luckett W. P. (1978). Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. Am. J. Anat. **152**, 59-98.

Landmark C. (1986). Roles of bilateral zones of ingressing superficial cells during gastrulation of *Ambystoma mexicanum*. J. Emb. Exp. Morph. **97**, 47-62.

Malacinski G. M., Chung H. M., Asashima M. (1980). The association of primary embryonic organizer activity with the future dorsal side of amphibian eggs and early embryos. Dev. Biol. **77**, 449-462.

McIntire J. A., Faulk W. P. (1979). Trophoblast modulation of maternal allogeneic recognition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4029-4032.

Moore A. R. (1941). On the mechanism of gastrulation in *Dendraster excentricus*. J. Exp. Zool. **87**, 101-111.

Moore A. R., Burt A. S. (1939). On the locus and nature of the forces causing gastrulation in the embryos of *Dendraster excentricus*. J. Exp. Zool. **82**, 159-171.

Morrill J. B. (1986). Scanning electron microscopy of embryos. In: T. Schroeder (ed.), Methods in Cell Biology. Academic Press, New York.

Morrill J. B., Santos L. L. (1985). A scanning electron micrographical overview of cellular and extracellular patterns during blastulation and gastrulation in the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. In: R. H. Sawyer and R. M. Showman (eds.), The Cellular and Molecular Biology of Invertebrate Development. U. South Carolina Press, pp. 3-33.

Nakatsuji N., Johnson K. E. (1983). Conditioning of a culture substratum by the ectodermal layer promotes attachment and oriented locomotion by amphibian gastrula mesodermal cells. J. Cell Sci. **59**, 43-60.

Nakatsuji N., Smolira M. A., Wylie C. C. (1985). Fibronectin visualized by scanning electron microscope immunocytochemistry on the substratum for cell migration in *Xenopus laevis* gastrulae. Dev. Biol. **107**, 264-268.

Neff A. W., Wakahara M., Jurand A., Malacinski G. M. (1984). Experimental analysis of cytoplasmic rearrangements which

follow fertilization and accompany symmetrization of inverted *Xenopus* eggs. J. Embryol. Exper. Morphol. **80**, 197-224.
New D. A. T. (1959). Adhesive properties and expansion of the chick blastoderm. J. Embryol. Exp. Morphol. **7**, 146-164.
Newport J. W., Kirschner M. W. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. I. Characterization and timing of cellular changes at midblastula stage. Cell **30**, 675-686.
Pasteels J. (1948). Les bases de la morphogenese chez les vertebres anamniotes au function de la structure de l'oeuf. Folia Biotheoret. (Leiden) **3**, 83-108.
Penners A., Schleip W. (1928). Die Entwicklung der Schultzeschen Doppelbildungen aus dem Ei von *Rana fusca*. Teil V. und VI. Z. Wissen Zool. **131**, 1-156.
Pfluger E. (1883). Uber den Einfluss der Schwerkraft auf die Teilung der Zellen. Pfluegers Arch. **32**, 1-79.
Rhumbler L. (1902). Zur Mechanik des Gastrulationvorganges insbesundere der Invagination. Eine Entwicklungsmechanische Studie. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **14**, 401-476.
Rosenquist G. C. (1972). Endoderm movements in the chick embryo between the short streak and head process stages. J. Exp. Zool. **180**, 95-104.
Rugh R. (1951). The Frog: Its Reproduction and Development. Blakiston, Philadelphia.
Schlesinger A. B. (1958). The structural significance of the avian yolk in embryogenesis. J. Exp. Zool. **138**, 223-258.
Schroeder T. (1981). Development of a "primitive" sea urchin (*Eucidaris tribuloides*): Irregularities in the hyaline layer, micromeres, and primary mesenchyme. Biol. Bull. **161**, 141-151.
Sharf S., Gerhart J. (1983). Axis determination in the eggs of *Xenopus laevis*: A critical period before first cleavage, identified by the common effects of cold, pressure, and ultraviolet irradiation. Dev. Biol. **99**, 75-87.
Solursh M., Morriss G. M. (1977). Glycosaminoglycan synthesis in rat embryos during the formation of the primary mesenchyme and neural folds. Dev. Biol. **57**, 75-86.
Solursh M., Revel J. P. (1978). A scanning electron microscope study of cell shape and cell appendages in the primitive streak region of the rat and chick embryo. Differentiation **11**, 185-190.
Spemann H., Mangold H. P. (1924). Induction of embryogenic primordia by the implantation of organizer from different species. In: B. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology (1974). Hafner, New York, pp. 144-184.
Spratt N. T., Jr. (1946). Formation of the primitive streak in the explanted chick blastoderm marked with carbon particles. J. Exp. Zool. **103**, 259-304.
Spratt N. T., Jr. (1947). Regression and shortening of the primitive streak in the explanted chick blastoderm. J. Exp. Zool. **104**, 69-100.
Spratt N. T., Jr. (1963). Role of the substratum, supracellular continuity, and differential growth in morphogenetic cell movements. Dev. Biol. **7**, 51-63.
Sugiyama K. (1972). Occurrence of mucopolysaccharides in the early development of the sea urchin embryo and its role in gastrulation. Dev. Growth Differ. **14**, 62-73.
Tilney L. C., Gibbins J. R. (1969). Microtubules in the formation and development of the primary mesenchyme in *Arbacia punctulata*. II. An experimental analysis of their role in the development and maintenance of cell shape. J. Cell Biol. **41**, 227-250.
Trinkaus J. P. (1984). Cells into Organs: The Forces that Shape the Embryo, 2nd Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
Vogt W. (1929). Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit ortlicher Vitalfarbung. II. Teil Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **120**, 384-706.
Waddington C. H. (1932). Experiments in the development of chick and duck embryos cultivated *in vitro*. Philos. Trans. Roy. Soc. Lond. [Biol.] **13**, 221.
Wessel G. M., Marchase R. B., McClay D. R. (1984). Ontogeny of the basal lamina in the sea urchin embryo. Devel. Biol. **103**, 235-245.
Zander J., Munstermann A. M. von (1956). Progesteron in menschlichem Blut und Geweben. III. Klin. Wschr. **34**, 944-953.



Глава 5

Раннее развитие позвоночных. Производные эктодермы, их органо- и гистогенез

Если вы хотите изумиться — именно этот процесс вызовет у вас чувство подлинного изумления. Все начинается с одной клетки, образовавшейся в результате слияния спермия с яйцом; эта клетка делится сначала на две, затем на четыре, на восемь и т. д., и на определенной стадии возникает некая клетка, все потомки которой дают начало головному мозгу. Само существование такой клетки уже представляется одним из удивительнейших феноменов на Земле. Людям следовало бы не думать ни о чем другом, кроме нее, взывая друг к другу в бесконечном удивлении.

ЛЬЮИС ТОМАС (1979)

Жизнь сама сметает границы, возведенные нами между отдельными науками и отраслями знания.

ГАНС ДЖОНАС (1966)

Основные черты развития позвоночных

В 1828 г. Карл Эрнст фон Бэр, выдающийся эмбриолог того времени [1], писал: «Я зафиксировал в спирте двух маленьких зародышей, забыв пометить их. А теперь не могу определить, к какому роду животных они относятся. Они могут быть ящерицами, мелкими птицами или даже млекопитающими!» Рис. 5.1 помогает нам понять его затруднение. Этот рисунок иллюстрирует сформулированные Бэром четыре общих закона эмбриологии. Детально изучив развитие куриного зародыша и сравнив его с развитием зародышей других позвоночных, он сформулировал четыре общих правила, проиллюстрированных здесь на примере нескольких позвоночных животных.

1. *Признаки, общие для той или иной большой группы животных, появляются в эмбриогенезе раньше, чем специализированные.* Зародыши всех позвоночных (рыб, рептилий, амфибий, птиц и млекопитающих) сразу после гаструляции очень похожи друг на друга. Только позже в развитии возникают признаки, характерные для класса, отряда и, наконец, для вида (рис. 5.1). Все зародыши позвоночных имеют жаберные щели, хорду, нервную трубку и пронефросы.

2. *Менее общие признаки развиваются из более общих, пока, наконец, не появятся наиболее специализированные.* У некоторых рыб пронефросы функционируют на протяжении всей жизни животного. Этот тип почек можно обнаружить у зародышей всех других позвоночных. Однако у более высокоорганизованных видов животных такие почки никогда не функционируют, хотя и участвуют в последующем развитии более специализированных почек. У всех позвоночных кожа поначалу сходна. Только позднее в коже развиваются структуры, характерные для определенной группы животных: чешуя рыб и рептилий, перья птиц или волосы, когти и ногти млекопитающих. Точно также раннее развитие конечности в сущности одинаково у всех позвоночных. Только позже становятся очевидными различия между плавниками, ногами, крыльями и руками.

3. *Каждый зародыш данного вида не проходит в своем развитии через взрослые стадии других животных, но все более и более отдаляется от них.* Жаберные щели зародышей птиц и млекопитающих не похожи в деталях на жаберные щели взрослых рыб.

[1] К. Э. фон Бэр открыл хорду, впервые описал яйцо у млекопитающих и человека и создал излагаемую ниже концепцию развития.

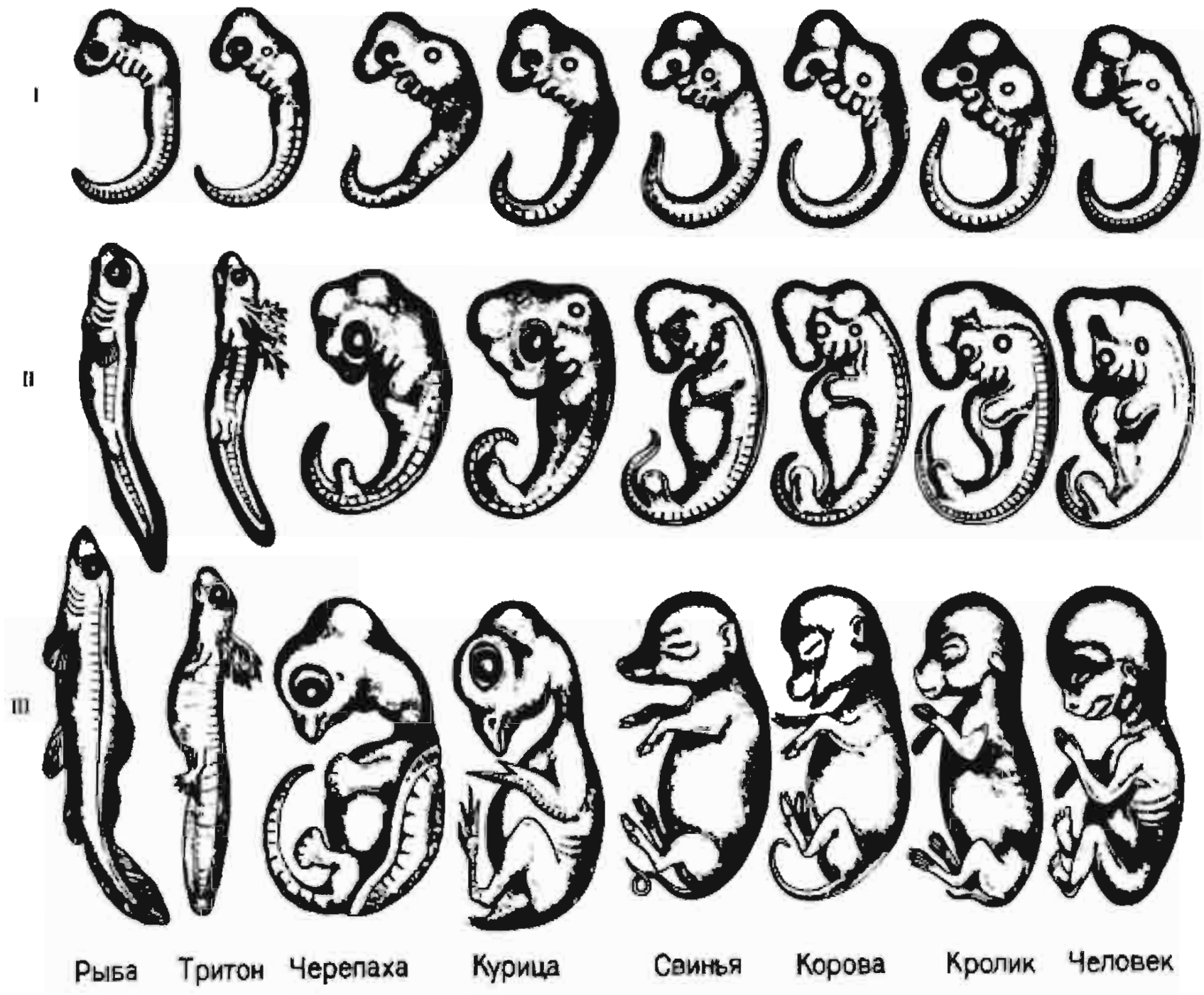


Рис. 5.1. Иллюстрация к закону Бэра. Ранние зародыши позвоночных обнаруживают черты, общие для всего подтипа. По мере развития зародыши становятся узнаваемыми как члены их класса, их отряда, их семейства и, наконец, их вида. (Из Romanes, 1901.)

Они скорее напоминают жаберные щели *зародышей* рыб и *зародышей* других позвоночных. И если у рыб они сохраняются и превращаются в настоящие жаберные щели, то у млекопитающих они преобразуются в такие структуры, как, например, евстахиевы трубы (находящиеся между полостью среднего уха и ротовой полостью).

4. *Следовательно, ранний зародыш более высокоорганизованного животного никогда не подобен взрослой особи низкоорганизованного животного, а подобен только раннему зародышу этого последнего.*

Фон Бэр видел, что различные группы животных на ранних стадиях развития сохраняют некоторые общие черты; эти черты в процессе дальнейшего развития изменяются, становясь все более и более характерными для данного вида. Зародыш человека никогда не проходит стадии, эквивалентной взрослой рыбе или птице. Вначале для всех этих зародышей характерны некие общие признаки. Затем зародыши начинают все сильнее отличаться друг от друга, т. е. происходит процесс дивергенции, и никто из них не повторяет стадии развития других [1].

[1] Эта работа фон Бэра была предана забвению после того, как Эрнст Геккель осуществил синтез германского романтизма и дарвинизма, утверждая, что «Онтогенез (индивидуальное развитие) повторяет филогенез (эволюционную историю вида)». В связи с этим различные стадии развития человеческого зародыша рассматривались как соответствующие взрослым стадиям организмов, стоящих на более низкой ступени эволюционной лестницы. Такая точка зрения была научно дискредитирована даже раньше, чем была предложена, однако Геккель обладал редким умением показать товар лицом, а его теория с легкостью «объясняла» человеческий прогресс. Поэтому она распространилась в биологии и общественных науках со сверхъестественной скоростью прежде, чем было показано, что в ее основе лежат ложные предпосылки (см. Gould, 1977).

Эти заключения были чрезвычайно важны для Чарлза Дарвина, потому что эволюционная классификация зависела от нахождения таких признаков сходства, которые доказывали бы происхождение различных животных от общего предка. «Общность строения зародышей,— писал Дарвин в «Происхождении видов» (1859),— свидетельствует об общности происхождения». Дарвин действительно полагал, что эмбриология предоставляет наиболее веские данные в пользу его эволюционной теории. Фон Бэр, конечно, не был эволюционистом, когда он опубликовал свои четыре закона в 1828 г. Он вообще никогда не был им. Фон Бэр полагал, что обнаружил божественный план, по которому развиваются все организмы в такой группе, как позвоночные. Поскольку все более ранние эволюционные теории рассматривали эволюцию как единую неветвящуюся серию трансформаций, наблюдения фон Бэра часто использовались как аргумент против теории эволюции. Дарвин, однако, понял, что работа Бэра поддерживает его эволюционную гипотезу, согласно которой несколько разных типов организмов могли произойти от общего предка путем наследования модификаций, приобретаемых в процессе эмбрионального развития. Причина, по которой зародыши человека, рыбы и птицы имеют жаберные щели, заключается в том, что эти животные произошли от общего предка, чьи зародыши имели такие жаберные щели. Более того, в разных группах организмов из жаберных щелей формировались разные органы (жабры у рыб, евстахиевы трубы у млекопитающих), потому что изменялся план строения тела общего предка и эти изменения отбирались разными условиями среды.

Фон Бэр также установил, что в развитии позвоночных имеются общие черты. Три зародышевых листка у всех позвоночных дают начало разным органам, и эти различия в производных разных зародышевых листков одинаковы для любых животных, будь то рыба, лягушка или птица. Из **эктодермы** образуются кожа и нервы; из **энтодермы** — дыхательная и пищеварительная трубки, а из **мезодермы** — соединительная ткань, клетки крови, мочеполовая система и части большинства внутренних органов. В этой главе мы рассмотрим раннее развитие эктодермы, сосредоточив внимание на развитии нервной системы. Следующая глава будет посвящена раннему развитию мезодермальных и энтодермальных органов.

Нейруляция

У позвоночных в результате гаструляции образуется зародыш, состоящий из внутреннего энтодермального, промежуточного мезодермального и наружного эктодермального листков. Непосредственно под дорсальным участком эктодермы располагается материал хордомезодермы. Взаимодействие этого материала с лежащей над ним эктодермой является одним из наиболее важных во всем развитии: оно побуждает эктодерму формировать полую **нервную трубку**, которая даст начало головному и спинному мозгу. Итак, мы приступаем к изучению новой фазы развития — **органогенеза**, т. е. образования специфических тканей и органов. Действие, посредством которого хордомезодерма инициирует развитие нервной трубки из эктодермы, называется **первичной эмбриональной индукцией**, а клеточный ответ на индукцию, приводящий к трансформации плоского слоя эктодермальных клеток в полую нервную трубку, называется **нейруляцией**. Последовательность событий, осуществляющихся в период нейруляции, представлена в виде схемы на рис. 5.2. В эктодерме образуются клетки трех типов: 1) клетки нервной трубки, 2) клетки эпидермиса кожи и 3) клетки нервного гребня, мигрирующие из области, которая соединяет нервную трубку с эпидермисом. Зародыш, претерпевающий эти изменения, называется **нейрулой**. Явление первичной эмбриональной индукции будет подробно рассмотрено в гл. 8. Здесь же мы будем говорить о реакции на нее различных тканей эктодермального происхождения.

Процесс нейруляции у зародышей лягушки представлен на рис. 5.3. Механизмы образования нервной трубки у амфибий, рептилий, птиц и млекопитающих, по-видимому, сходны (Gallera, 1971), поэтому мы рассмотрим этот процесс у разных



Рис. 5.2. Схема образования нервной трубки у амфибий и амниот. Эктодермальные клетки представлены либо как предшественники нервного гребня (обозначен черным цветом) и нервной трубки (обозначена белым), либо как предшественники эпидермиса (обозначен серым цветом). Сомкнувшись по будущей срединспинной линии, эктодермальные складки образуют наружный слой — покровный эпителий — и лежащую внутри нервную трубку, которые соединены посредством клеток нервного гребня. (По Balinsky, 1975.)

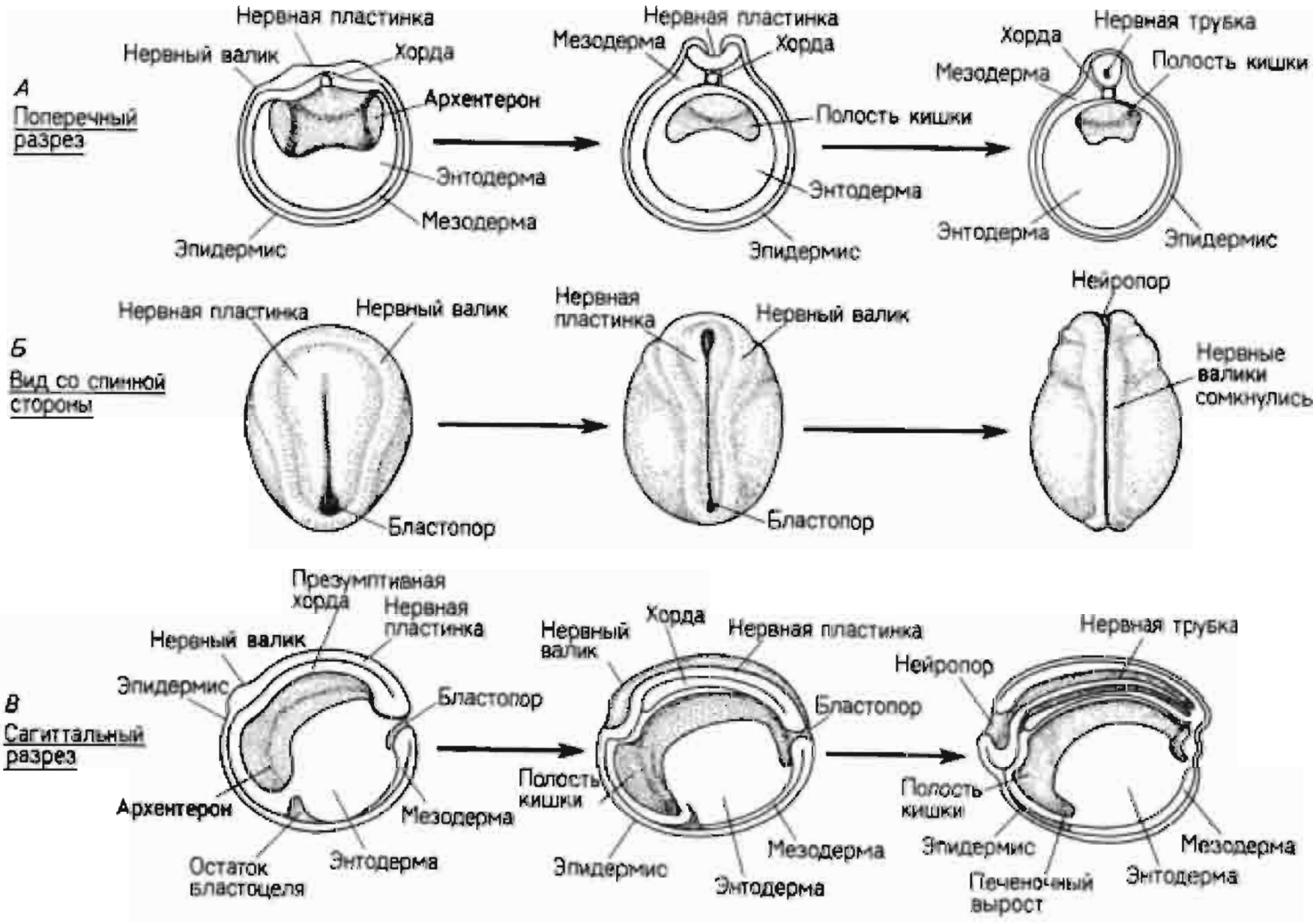


Рис. 5.3. Процесс нейруляции у зародыша лягушки, изображенный в трех проекциях (*А*, *Б*, *В*) на стадиях ранней (*слева*), средней (*в центре*) и поздней (*справа*) нейрулы. *А*. Поперечные разрезы через середину зародыша. *Б*. Вид на целый зародыш со спинной стороны. *В*. Сагиттальные разрезы через медианную плоскость зародыша. (По Balinsky, 1975.)

групп в том же порядке, в котором начали наш обзор развития зародышей этих групп [1]. Первым указанием на то, что данный участок эктодермы предназначен стать нервной тканью, является изменение формы клеток (рис. 5.4). Эктодермальные клетки, расположенные в центре дорсальной области, становятся удлиненными, тогда как клетки, предназначенные для образования эпидермиса, уплощаются. Удлинение дорсальных эктодермальных клеток приводит к тому, что эти проспективные нейральные области приподнимаются над окружающей их эктодермой, образуя **нервную пластинку**. Она занимает не менее 50% площади всей эктодермы. Вскоре после образования нервной пластинки ее края утолщаются и движутся вверх, образуя **нервные валики**, а в центре нервной пластинки возникает U-образный **нервный желобок**, разделяющий зародыша на будущие правую и левую половины (рис. 5.3 и 5.5). Нервные валики, приподнимаясь, движутся навстречу друг другу и в конечном счете сливаются по среднеспинной линии зародыша. В результате нервная пластинка превращается в лежащую под эктодермальным эпителием нервную трубку. Клетки в области, соединяющей этот эпителий с нервной трубкой, являются клетками **нервного гребня**. Позднее эти клетки мигрируют по всему зародышу, давая начало нескольким клеточным популяциям, в том числе пигментным клеткам и клеткам периферической нервной системы.

[1] По способу образования нервной трубки костистые рыбы и костные ганоиды отличаются от других классов позвоночных. У рыб она формируется не путем образования и последующего слияния складок наружной эктодермы, а закладывается в виде плотного клеточного тяжа, погружающегося в зародыш. Этот тяж постепенно становится полым и превращается в нервную трубку. У млекопитающих только самый задний участок нервной трубки формируется путем образования в нем полости (путем кавитации).

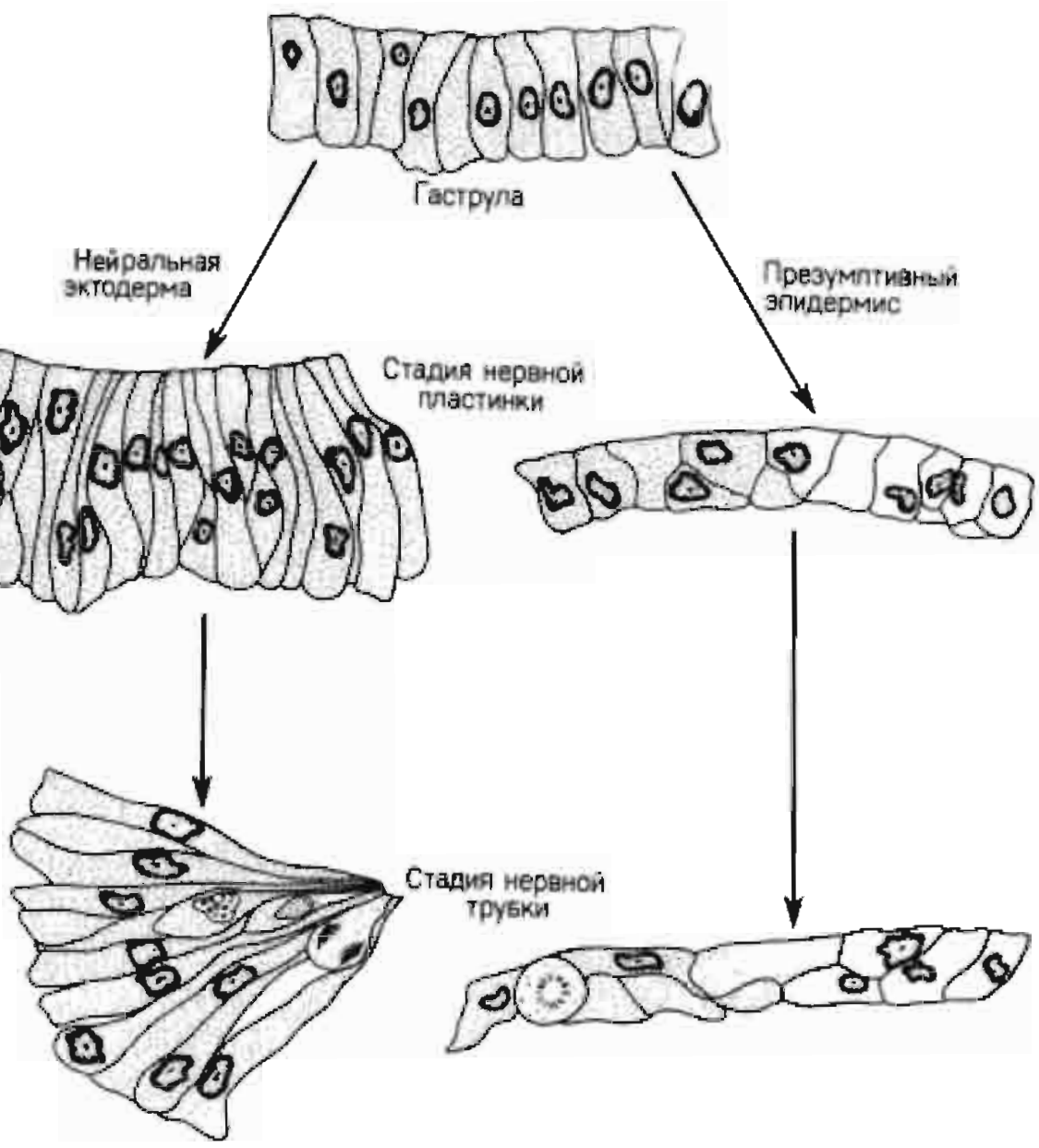


Рис. 5.4. Схема, иллюстрирующая изменения формы клеток эктодермы в период гаструляции у тритона. К концу гаструляции клетки образуют однослойный эпителий. Во время нейруляции нейральные эпителиальные клетки удлиняются, образуя нервную пластинку, а затем при формировании нервной трубки их апикальные концы сужаются. Презумптивные эпидермальные клетки в процессе нейруляции уплощаются. (По Burnside, 1971.)



Рис. 5.5. Формирование нервной трубки у куриного зародыша. Удлиненные клетки нейрального эпителия образуют трубку, тогда как уплощенные эпидермальные клетки перемещаются по направлению к срединеспинной линии зародыша. Микрофотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Фотография с любезного разрешения K. W. Tosney.)

Нервная трубка и происхождение центральной нервной системы

Формирование нервной трубки происходит неодновременно во всей эктодерме. Это лучше всего видно на таких позвоночных, как птицы и млекопитающие, у которых зародыш удлиняется по продольной оси до начала нейруляции. На рис. 5.6 этот процесс проиллюстрирован на примере куриного зародыша. Нейруляция в головной области продвинулась уже далеко, тогда как в хвостовом отделе еще продолжается гаструляция. Регионализация нервной трубки является также результатом изменений ее формы. В головном конце (где будет формироваться головной мозг) стенка трубки широкая и толстая. В ней рядом вздутий и сужений обозначены различные отделы (компартменты) головного мозга. Однако каудальнее головного отдела она сохраняет вид простой, сужающейся по направлению к хвосту трубки. Два открытых конца нервной трубки называются соответственно **передним** и **задним нейропором**. У млекопитающих амниотическая жидкость в течение некоторого времени протекает через нервную трубку, входя и выходя из этих отверстий (рис. 5.7). Однако если к 27 дню беременности задний нейропор еще остается открытым (или если он вскоре после замыкания снова разрывается), то возникает spina bifida — нарушение развития, тяжесть которого зависит от того, насколько большой участок нервной трубки остается открытым. Несмыкание переднего нейро-

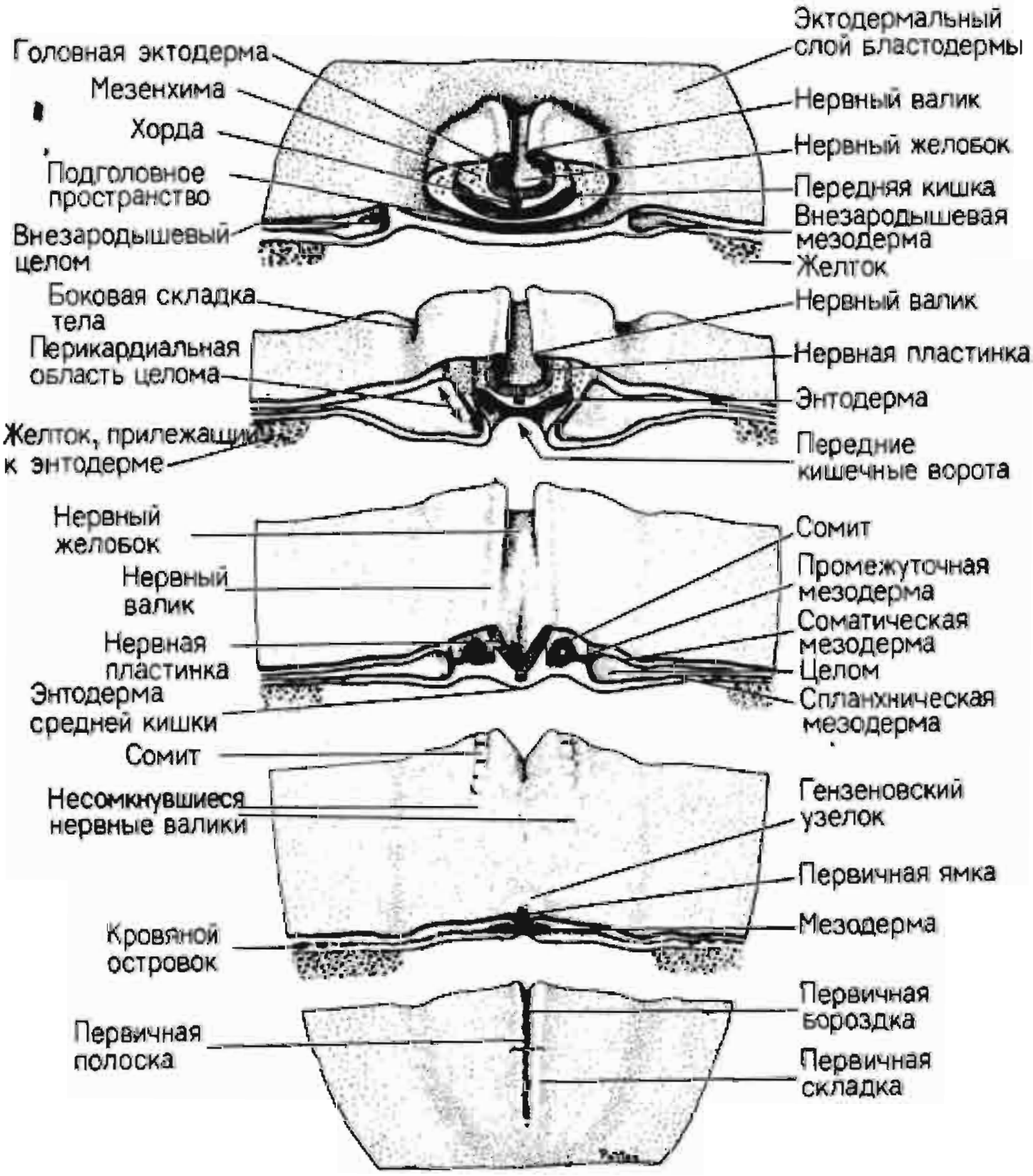


Рис. 5.6. Трехмерное изображение 24-часового куриного зародыша. В головной области заканчивается нейруляция, тогда как в хвостовой области продолжается гаструляция. (Из Patten, 1971; по Huettner, 1949.)

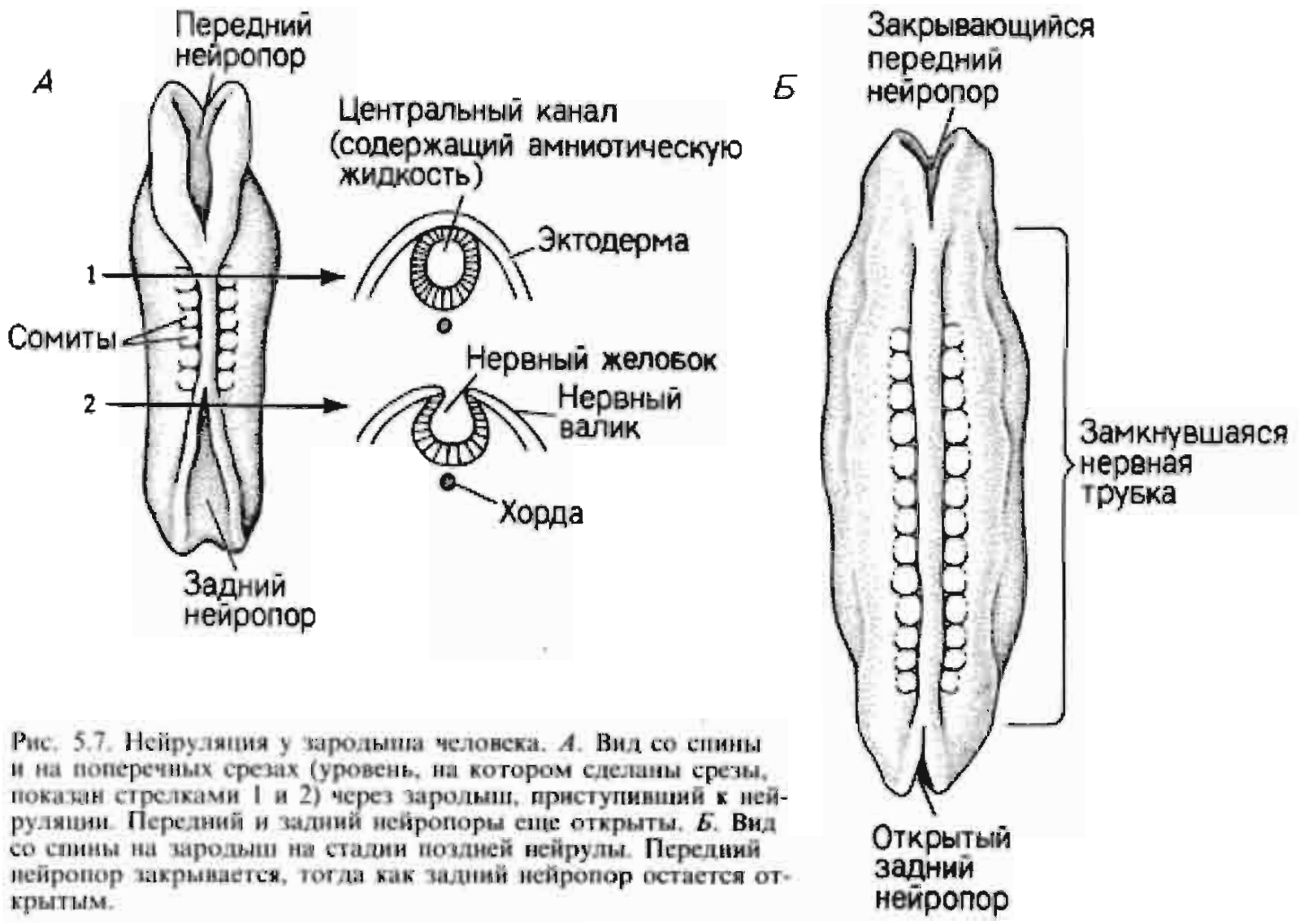


Рис. 5.7. Нейруляция у зародыша человека. *А*. Вид со спины и на поперечных срезах (уровень, на котором сделаны срезы, показан стрелками 1 и 2) через зародыш, приступивший к нейруляции. Передний и задний нейропоры еще открыты. *Б*. Вид со спины на зародыш на стадии поздней нейрулы. Передний нейропор закрывается, тогда как задний нейропор остается открытым.

нора приводит к анэнцефалии, исход которой летален. Сохраняющийся контакт переднего мозга с амниотической жидкостью вызывает его дегенерацию. Развитие переднего мозга плода прекращается, и свод черепа не формируется. У человека такая аномалия развития встречается не очень редко, примерно в 0,1% случаев всех беременностей. Дефекты смыкания нервной трубки теперь могут быть обнаружены во время беременности с помощью различных физических и химических тестов.

Механизм формирования нервной трубки

Формирование нервной трубки тесно связано с изменениями формы клеток, в которых участвуют микротрубочки и микрофиламенты. Эктодермальные клетки удлиняются по мере того, как случайно ориентированные микротрубочки выстраиваются в них параллельно удлиняющейся оси клетки (рис. 5.8). Эту стадию формирования нервной трубки можно блокировать колхицином, ингибитором полимеризации микротрубочек (Burnside, 1973). Второе изменение формы клеток состоит в их апикальном сужении — они принимают вид цилиндра; это изменение связано с образованием кольца актиновых микрофиламентов, окружающих апикальные края клеток. Сокращение этих микрофиламентов вызывает эффект «ремешка, стягивающего кисет (или старинный кошелек)»,— они стягивают апикальный конец каждой клетки. Было показано (Burnside, 1971; Karfunkel, 1972), что у зародышей, культивируемых в присутствии цитохалазина В, нейроэпителиальные клетки удлиняются, но не могут сузиться, и поэтому нервные валики не образуются. Актин связан с миозином, из которого он способен получать энергию для сокращения (Nagele, Lee, 1980), а также с апикальной мембраной. Эта связь осуществляется через **спектрин** — интегральный белок плазматической мембраны, который может соединяться с микрофиламентами внутри клетки (Sadler et al., 1986). Локализация спектрина точно соответствует расположению микрофиламентов, что позволяет предположить активное их участие в изменении формы клеток.

Совместными усилиями биологов и математиков удалось показать, что одних лишь этих изменений — удлинения и сжатия — вполне достаточно, чтобы плоский слой клеток превратился в полую трубку внутри зародыша (Odell et al., 1981). При машинном моделировании нейруляции были заданы следующие условия: исходный слой эктодермы состоит из кубовидных клеток, расположенных бок о бок, но тесно соединенных вместе апикальными концами (рис. 5.9). На этих концах имеются пучки микрофи-

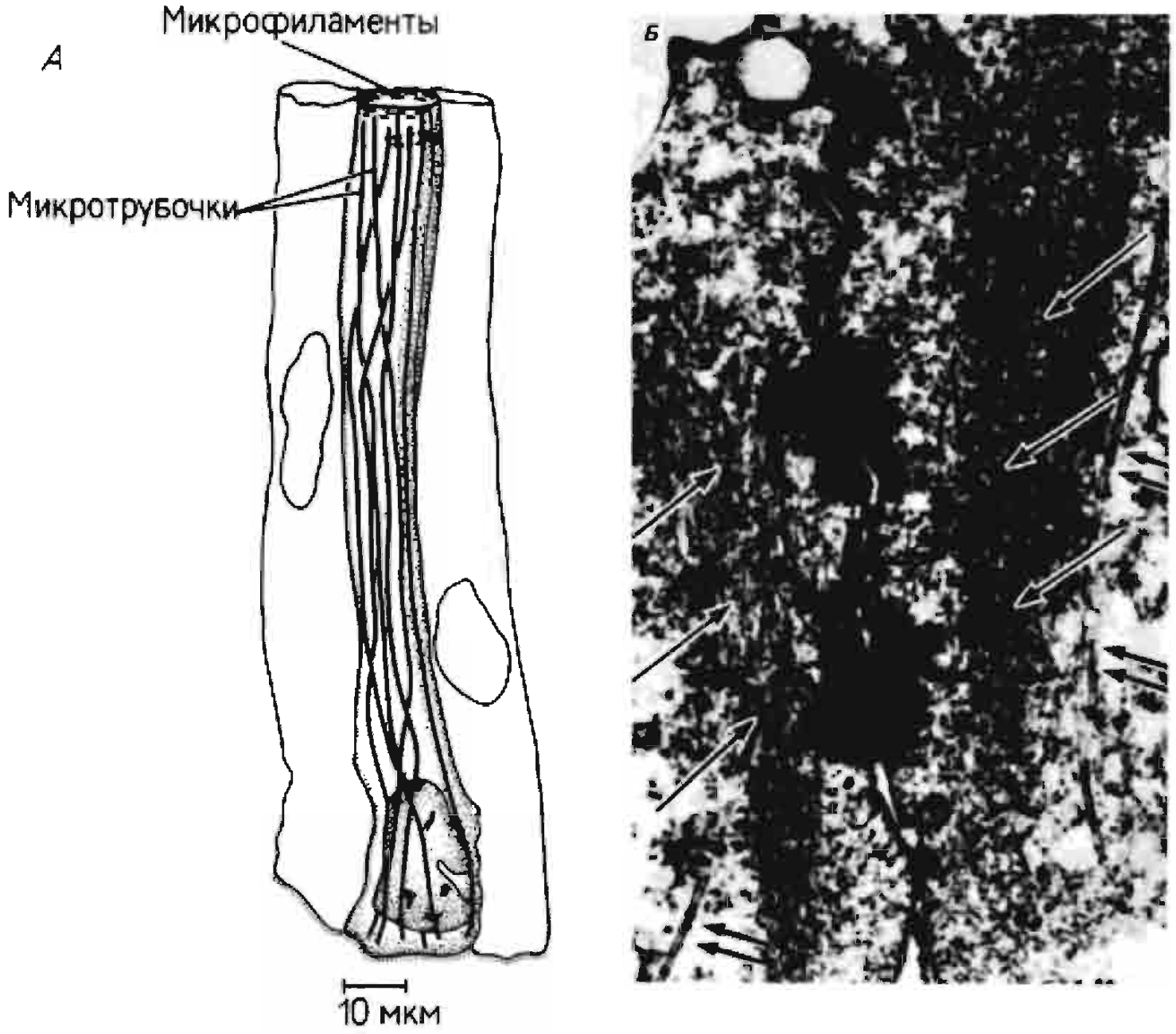
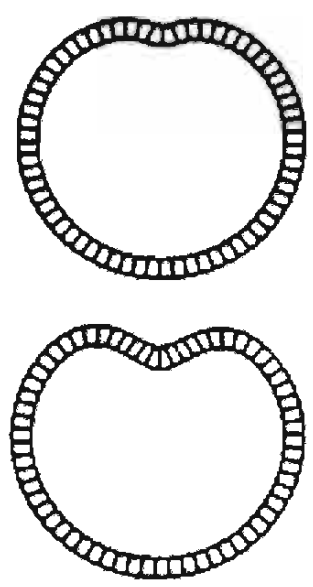


Рис. 5.8. Ориентация микротрубочек и микрофиламентов в клетках нервной пластинки. *А*. Микротрубочки выстроились вдоль длинной оси клетки; микрофиламенты окружают ее верхушку. Микрофиламенты часто бывают прикреплены к десмосомам, специфическим структурам на клеточной мембране в месте контакта между двумя клетками. *Б*. Пучки апикальных микрофиламентов (показаны длинными одиночными стрелками), видимые вблизи десмосом по обеим сторонам межклеточных контактов. Видны также микротрубочки (указаны короткими двойными стрелками). (Из Burnside, 1971; фотография с любезного разрешения B. Burnside.)



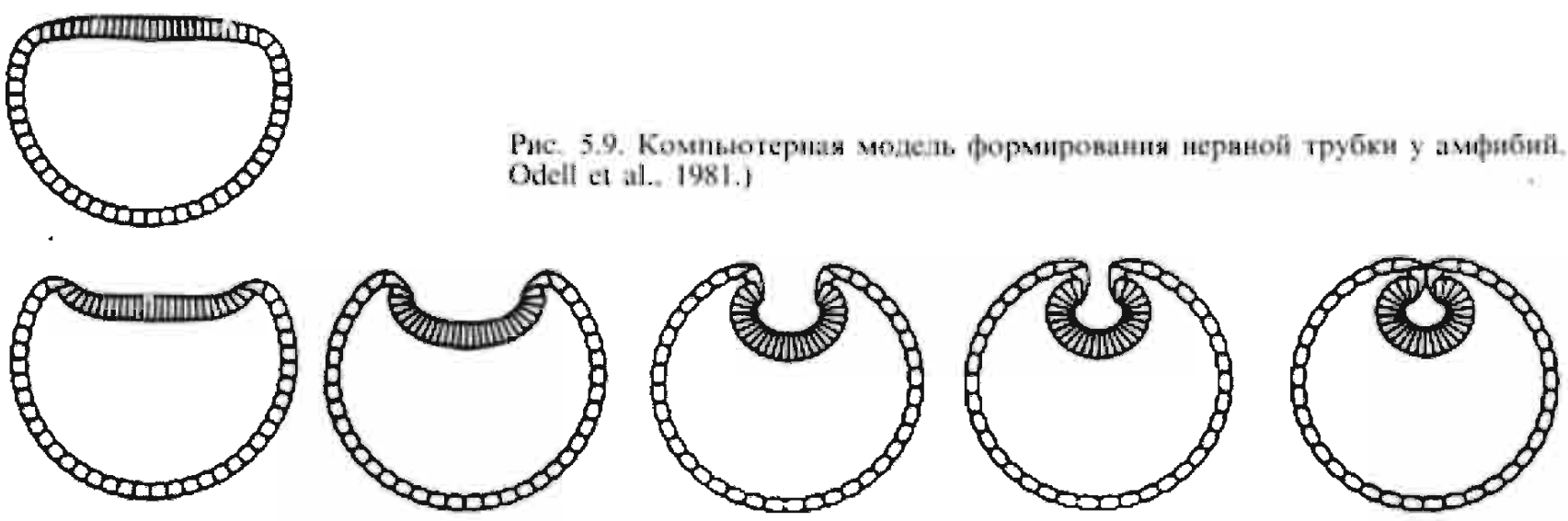


Рис. 5.9. Компьютерная модель формирования нервной трубки у амфибий. (По Odell et al., 1981.)

ламентов. Главное условие, которое необходимо было проверить в этой модели, заключалось в том, что способность «ремешка в кошельке» к растяжению ограничена. Предполагалось, что сверх этого порога упругости начинается сокращение ремешка, стягивающее кольцо в окружность меньшего диаметра, чем предыдущая. Оставшуюся часть клетки принимали за упругое тело постоянного объема, а апикальный конец каждой клетки считали тесно связанным с апикальными концами соседних клеток. Следовательно, сокращение микрофиламентов в одной клетке должно растягивать окружность апикального конца любой из прилежащих клеток и индуцировать волну сокращений по мере того, как клетки последовательно растягиваются выше их порога упругости и сокращаются. Таким образом генерируется волна сокращений во всех клетках, которые прочно связаны своими апикальными концами. Когда такое ограничение упругости было запрограммировано в компьютере, результат моделирования показал, что нейруляция должна происходить тем самым способом, который описан при эмбриологических наблюдениях.

Дифференцировка нервной трубки

ФОРМИРОВАНИЕ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА. Разные участки нервной трубки дифференцируются в разные отделы центральной нервной системы одновременно тремя различными путями. На анатомическом уровне в нервной трубке возникают расширения и сужения, а ее полости образуют камеры головного и спинного мозга. На гистологическом (тканевом) уровне клеточные популяции в стенке нервной трубки перераспределяются разными способами, формируя разные функциональные отделы головного и спинного мозга. И наконец, на цитологическом (клеточном) уровне сами клетки нейрального эпителия дифференцируются с образованием многочисленных типов нейронов и опорных (глиальных) клеток. Ранние стадии развития головного мозга у большинства позвоночных очень сходны, но, поскольку головной мозг человека представляется наиболее интересным органом в животном царстве, мы сосредоточим внимание на развитии того, что, как предполагают, делает человека — *Homo* — человеком разумным — *Homo sapiens*.

У раннего зародыша млекопитающих нервная трубка на всем ее протяжении прямая. Однако даже раньше, чем сформируется задний участок трубки, самая передняя ее часть претерпевает чрезвычайно резкие изменения. Она раздувается, подразделяясь на три первичных мозговых пузыря (рис. 5.10): **первичный передний мозг** (prosencephalon), **средний мозг** (mesencephalon) и **первичный задний мозг** (rhombencephalon). К тому времени, когда замкнется задний конец нервной трубки, по бокам развивающегося переднего мозга образуются вторичные расширения — **глазные пузыри**. Кроме того, будущий головной мозг изгибается таким образом, что места изгиба отмечают границы полостей мозга. Два основных изгиба называются головным и затылочным (шейным).

Первичный передний мозг затем подразделяется на передний **конечный мозг** (telencephalon) и расположенный каудальнее его **промежуточный мозг** (diencephalon) (рис. 5.11). Конечный мозг впоследствии формирует **большие полушария** головного мозга, промежуточный — таламическую и гипоталамическую области, а также область, получающую нервные импульсы от глаз; средний мозг на отделы не подразделяется, а его полость в конце концов становится третьим желудочком, или сильвиевым водопроводом. Первичный задний мозг подразделяется на **будущий продолговатый мозг** (myelencephalon) и лежащий впереди него **собственно задний мозг** (metencephalon). Myelencephalon в конечном счете становится **продолговатым мозгом** (medulla oblongata).

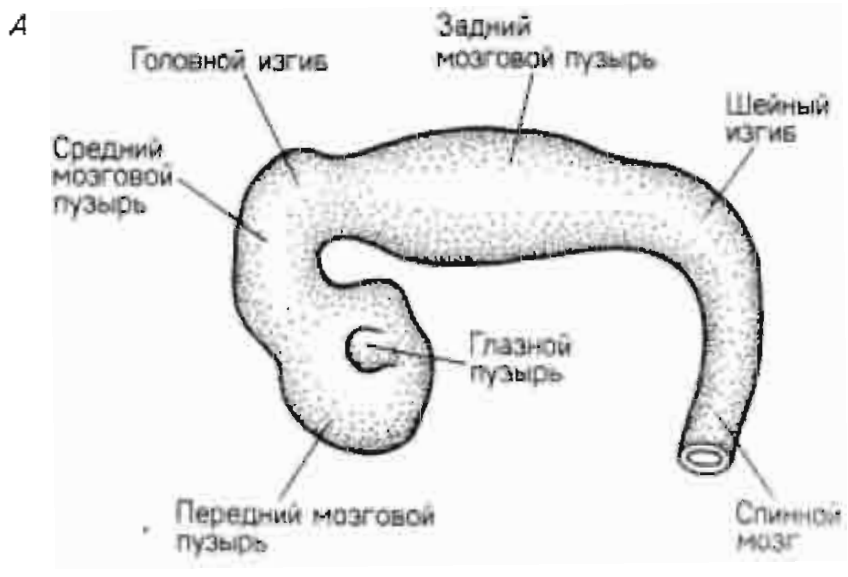


Рис. 5.10. Ранняя стадия развития головного мозга (четырехнедельный зародыш человека). *А.* Вид сбоку. *Б.* Схематическое изображение головного мозга, распрямленного в медианной плоскости, показывающее образование первичных мозговых пузырей в нервной трубке. (По Langman, 1969.)



Рис. 5.11. Дальнейшее развитие головного мозга. Мозг шестинедельного зародыша человека. *А*. Вид сбоку. *Б*. Схематическое изображение головного мозга, распрямленного в медианной плоскости; видно образование вторичных мозговых пузырей в нервной трубке. (По Langman, 1969.)

нейроны которого формируют нервы, регулирующие деятельность дыхательной, желудочно-кишечной и сердечно-сосудистой систем. А задний мозг формирует **мозжечок** (cerebellum) — отдел мозга, ответственный за координацию движений, поддержание позы и чувство равновесия. Развитие специализированных отделов головного мозга суммировано на рис. 5.12.

Процесс образования мозговых пузырей у раннего зародыша характеризуется чрезвычайно высокой скоростью и, кроме того, тем, что эти огромные вздутия образуются в основном за счет увеличения размеров полостей, а не за счет утолщения их стенок. У куриного зародыша объем головного мозга между третьими и пятыми сутками развития увеличивается в 30 раз. Полагают, что такое быстрое увеличение

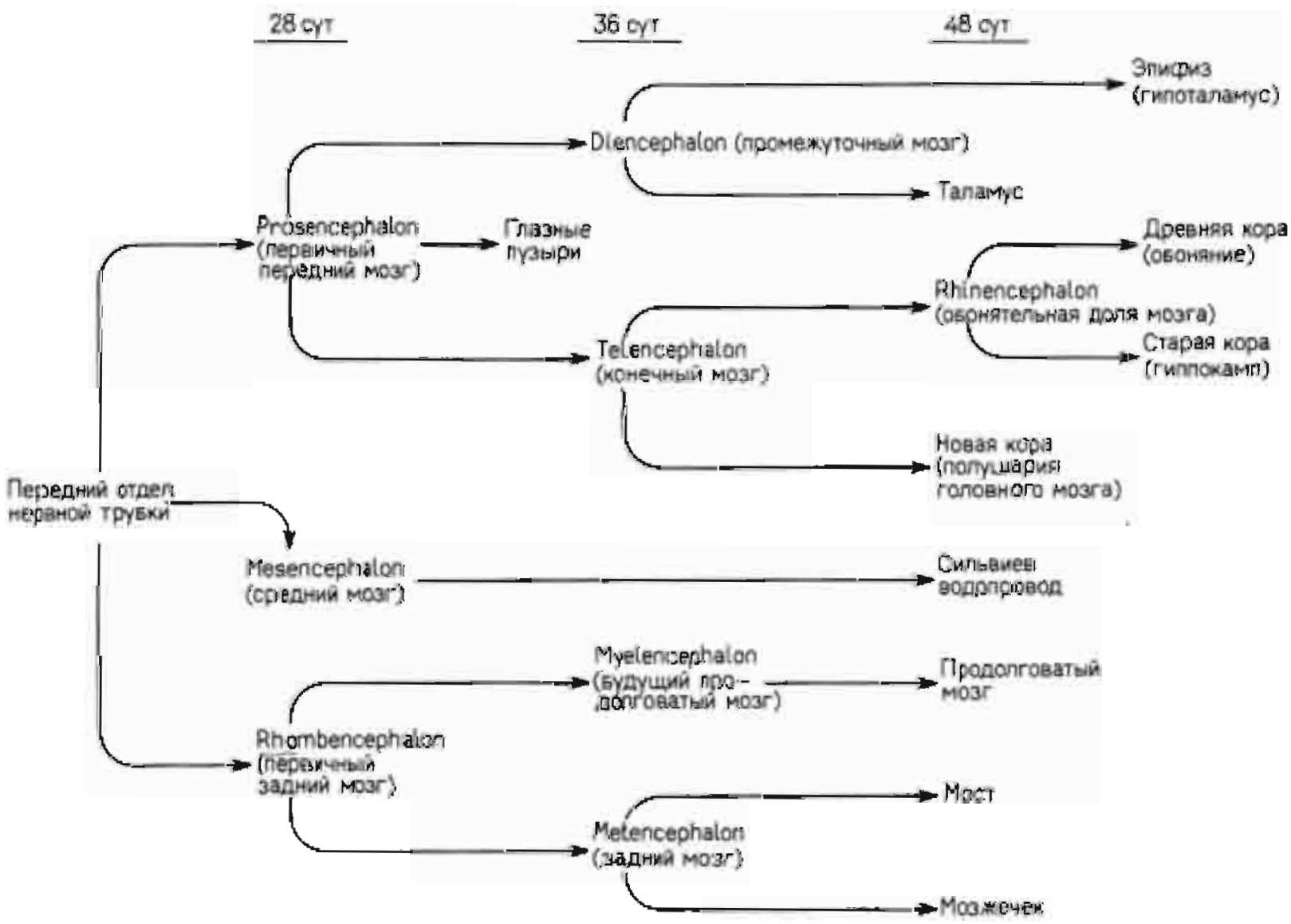


Рис. 5.12. Региональная специализация в период раннего развития головного мозга человека.

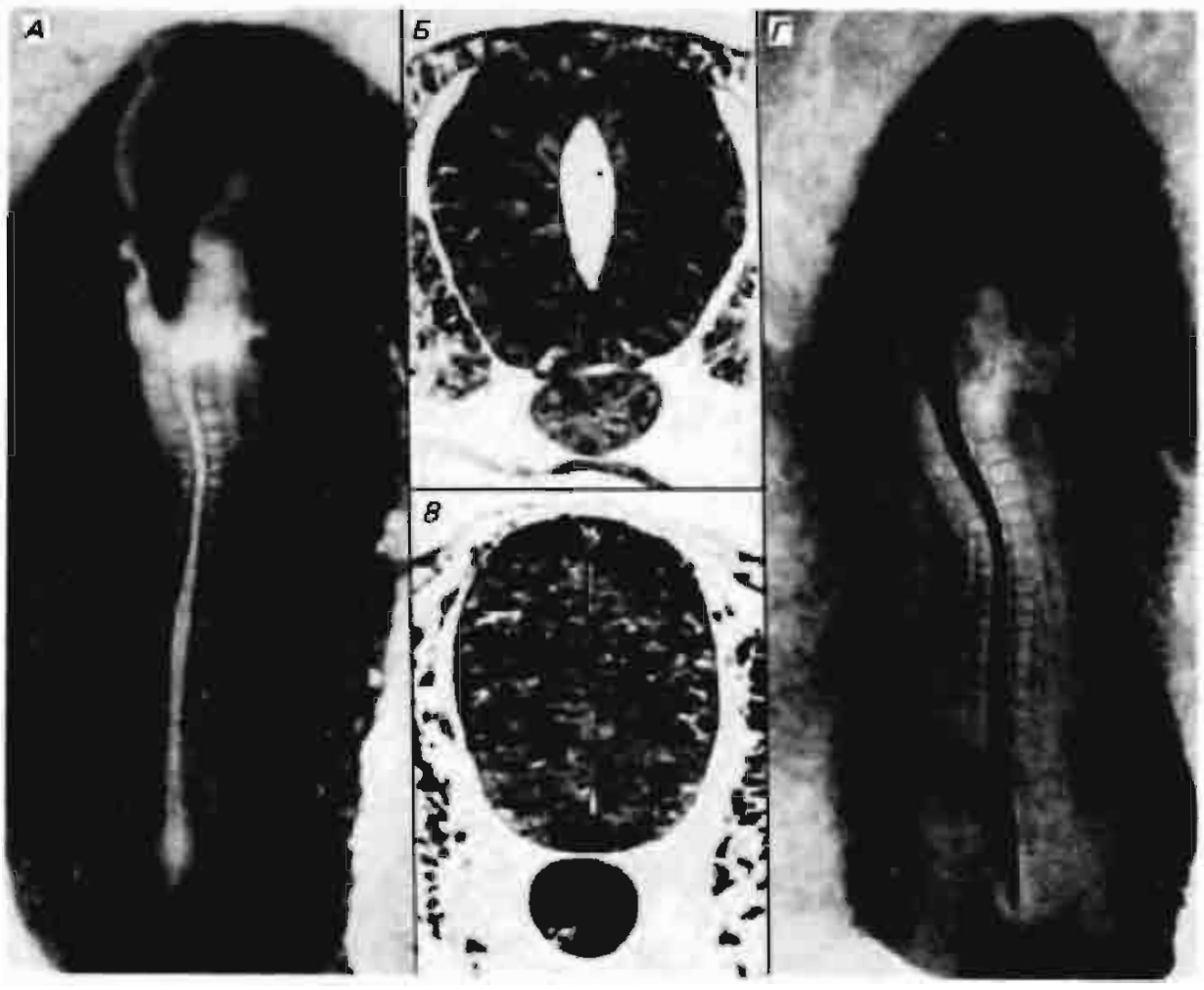


Рис. 5.13. Перетораживание участка нервной трубки, делающее возможным дальнейшее расширение области будущего головного мозга. *А*. Краситель, инъецированный в передний участок нервной трубки трехдневного куриного зародыша, заполняет полость головного мозга, но не поступает в спинной мозг. *Б, В*. Разрезы через нервную трубку куриного зародыша на уровне основания головного мозга: *Б* — до образования перегородки; *В* — во время перетораживания нервной трубки. *Г*. Исчезновение перегородки в нервной трубке после первоначального увеличения объема головного мозга позволяет красителю проникнуть в полость спинного мозга. (Фотографии с любезного разрешения M. Desmond.)

размеров вызвано давлением на стенки нервной трубки заключенной в ней жидкостью. Давление этой жидкости по логике вещей должно было бы уменьшаться в результате ее проникновения в полость спинного мозга, однако этого не происходит. Несколькими авторами (Schoenwolf, Desmond, 1984; Desmond, Shoenwolf, 1986) было показано, что в нервной трубке куриного зародыша до замыкания заднего нейропора возникает сужение, отделяющее будущий головной мозг от спинного (рис. 5.13). (Такая же преграда образуется и у зародыша человека: Desmond, 1982.) Если у куриного зародыша снять давление жидкости в передней части такой перетороженной нервной трубки, то скорость увеличения объема головного мозга значительно снижается и он будет содержать гораздо меньше клеток, чем головной мозг интактных контрольных зародышей. В норме после первоначального быстрого увеличения объемов желудочков (полостей) головного мозга перетороженный участок нервной трубки снова открывается.

АРХИТЕКТОНИКА ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ НА ТКАНЕВОМ УРОВНЕ. Исходно нервная трубка образована слоем герминативного нейрального эпителия толщиной в одну клетку. Этот слой представляет собой быстро делящуюся клеточную популяцию. Сауэр (Sauer, 1935) и другие исследователи показали, что клетки этой популяции располагаются в один слой; каждая клетка простирается от края, обращенного к просвету нервной трубки, до ее наружного края. Однако ядра клеток находятся на разных уровнях, и потому создается впечатление, что стенка нервной трубки многослойна. Такое положение ядер зависит от стадии клеточного цикла (рис. 5.14). Синтез ДНК (S-фаза) происходит тогда, когда ядро клетки располагается у ее наружного конца; по мере приближения к фазе митоза оно мигрирует по направлению к просвету трубки. Митоз осуществляется вблизи того конца клетки, который обращен к просвету нервной трубки. В период раннего развития 100% клеток нервной трубки включают радиоактивный тимидин в ДНК (Fujita, 1964). Однако вскоре некоторые клетки перестают включать предшественники ДНК, показывая тем самым, что они более не участвуют в синтезе ДНК и в митозе. Эти клетки представляют собой молодые нейроны или глиальные (опорные) клетки; они мигрируют к периферии нервной трубки, где происходит их дальнейшая дифференцировка (Fujita, 1966; Jacobson, 1968). Она зависит от положения, которые займут эти нейробласты, оказавшись вне области делящихся клеток (Jacobson, 1978; Letourneau, 1977).

В то время как клетки, лежащие у просвета нервной трубки, продолжают делиться, мигрирующие клетки образуют второй слой вокруг исходного слоя клеток нервной трубки. Этот второй слой постепенно утолщается по мере того, как все большее число клеток добавляется к нему из герминативного нейрального эпителия; этот слой называют **плащевым** (рис. 5.15, *А*), а герминативный эпителий теперь но-

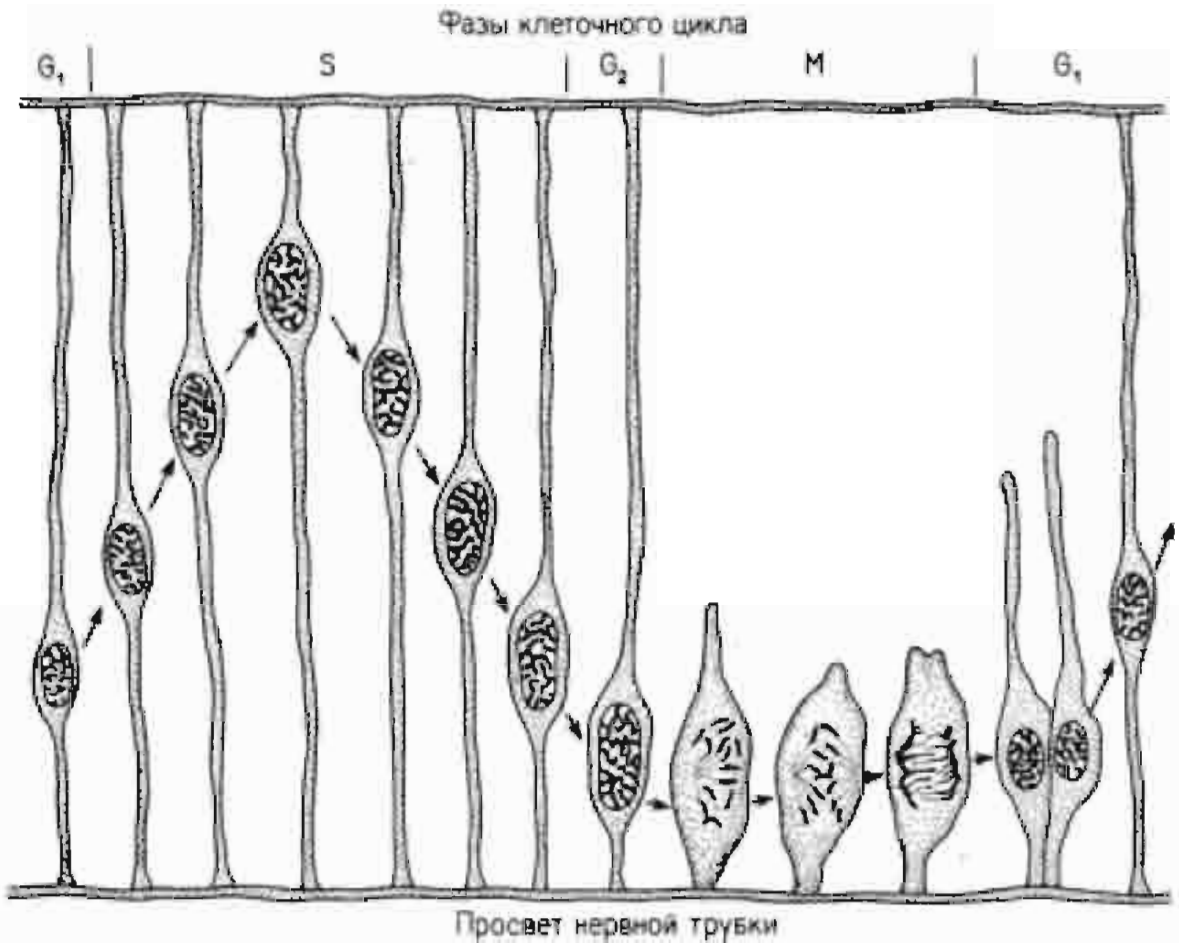


Рис. 5.14. Нейроэпителиальная клетка нервной трубки куриного зародыша. Схематическое изображение фронтального среза, на котором показана связь между положением ядра в нейроэпителиальной клетке и фазой клеточного цикла. Митотические ядра обнаруживаются у внутренней поверхности нервной трубки, обращенной к ее просвету. (По Sauer, 1935.)

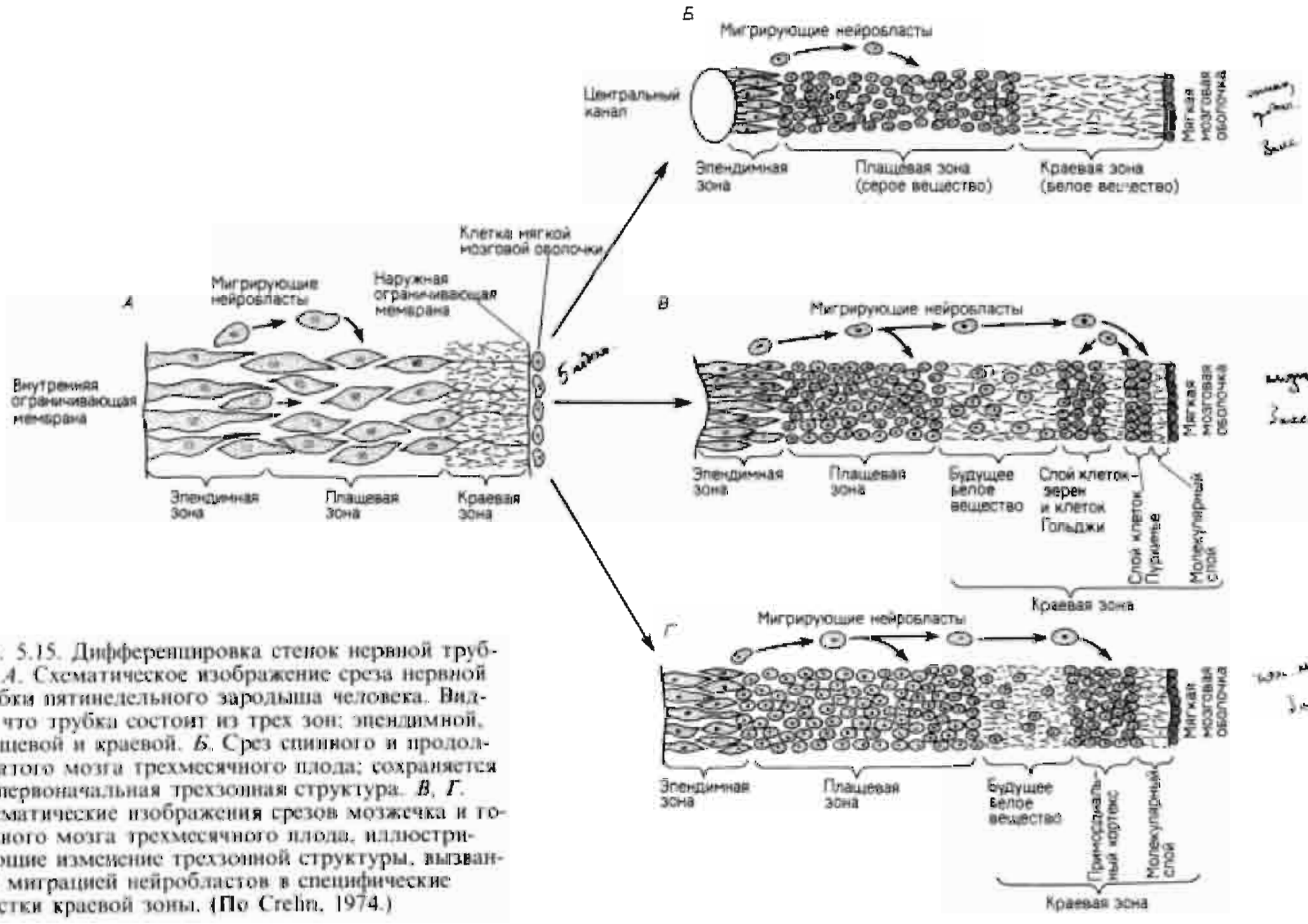


Рис. 5.15. Дифференцировка стенок нервной трубки. *А*. Схематическое изображение среза нервной трубки пятинедельного зародыша человека. Видно, что трубка состоит из трех зон: эпендимной, плащевой и краевой. *Б*. Срез спинного и продолговатого мозга трехмесячного плода; сохраняется их первоначальная трехзонная структура. *В*, *Г*. Схематические изображения срезов мозжечка и головного мозга трехмесячного плода, иллюстрирующие изменение трехзонной структуры, вызванное миграцией нейробластов в специфические участки краевой зоны. (По Crelin, 1974.)

сит название **эпендимного слоя**. Дифференцировка клеток плащевого слоя приводит к образованию как нейронов, так и глиальных клеток. Нейроны устанавливают между собой связи и посылают в направлении от просвета аксоны, образуя вблизи него бедный клетками **краевой слой**. В конце концов глиальные клетки заключают аксоны этого слоя в миелиновые футляры, придающие им беловатую окраску. Поэтому плащевой слой, содержащий тела нейронов, часто называют **серым веществом**, а содержащий их аксоны краевой слой — **белым веществом**.

В спинном и продолговатом мозге основная трехкомпонентная структура — эпендимный, плащевой и краевой слои — сохраняется в течение всего развития. Серое вещество (плащ, или мантия) постепенно принимает форму бабочки, окруженной белым веществом, и оба они заключены в соединительнотканный чехол. По мере дифференцировки нервной трубки в ней образуется **продольная борозда** (sulcus limitans), делящая ее на дорсальную и вентральную половины. Дорсальная половина получает информацию от чувствительных (сенсорных) нейронов, вентральная участвует в осуществлении различных двигательных (моторных) функций.

В головном мозге, однако, миграция клеток, дифференциальный рост и селективная гибель клеток вызывают модификацию трехзонной структуры, особенно в мозжечке (рис. 5.15, *Б—Г*). В глубоких слоях мозжечка вблизи просвета из нейробластов формируются скопления нейронов, называемые ядрами. Каждое ядро работает как функциональная единица, служащая промежуточной ретрансляционной станцией между наружными частями мозжечка и другими частями мозга. Другие нейробласты серого вещества мигрируют по наружной поверхности развивающегося мозжечка, образуя новый герминативный слой вблизи наружной границы нервной трубки. Нейробласты, происходящие из клеток этого слоя, мигрируют обратно в развивающееся белое вещество мозжечка, в котором формируют **зернистый слой**. Из исходного эпендимного слоя возникают разнообразные нейроны и глиальные клетки, включая отличающиеся от других нейронов крупные **клетки Пуркинье**. Каждый нейрон Пуркинье имеет огромный **дендритный аппарат**, который подобен опахалу над луковицеобразным телом клетки (рис. 5.16, *А*). Типичная клетка Пуркинье может образовывать до 100 000 синапсов с другими нейронами — больше, чем любой другой из изученных нейронов. У каждого нейрона Пуркинье имеется тонкий **аксон**, соединяющий его с другими клетками в глубоких ядрах мозжечка.

Таким образом, развитие пространственной организации мозжечка является решающим условием его правильного функционирования. В сущности все импульсы регулируют активность клеток Пуркинье, которые представляют собой единственные эфферентные нейроны коры мозжечка. Для осуществления такой регуляции необходимо, чтобы дифференцировка соответствующих клеток происходила в надлежащем месте и была координированной во времени.

Пониманию механизмов, обусловливающих упорядоченность расположения нейронов мозжечка в пространстве, способствовал анализ неврологических мутаций у мышей. Известно свыше 30 мутаций, влияющих на распределение этих нейронов. Мутация *staggerer*, по-видимому, вызвана дефектами клеток Пуркинье, которые у мутантов мельче, чем у нормальных мышей, и имеют короткие слабоветвящиеся дендриты (рис. 5.16, *Б*). Клетки зернистого слоя у мутантов образуются своевременно и мигрируют нормально, но затем погибают. По мнению некоторых авторов (Sidman, 1974; Sotelo, Changeaux, 1974), эти клетки погибают потому, что им не удается установить связь с дендритами клеток Пуркинье. Мыши с дефектами клеток Пуркинье меньше по размерам, для них характерна своеобразная шатающаяся походка, и они непрерывно дрожат.

Многие мутации, обусловливающие дефекты клеток мозжечка, были обнаружены по легкораспознаваемому фенотипу таких мутантов. У них всегда бывает нарушено чувство равновесия и затруднены движения. Фенотип мутантов weaver (качание) схо-

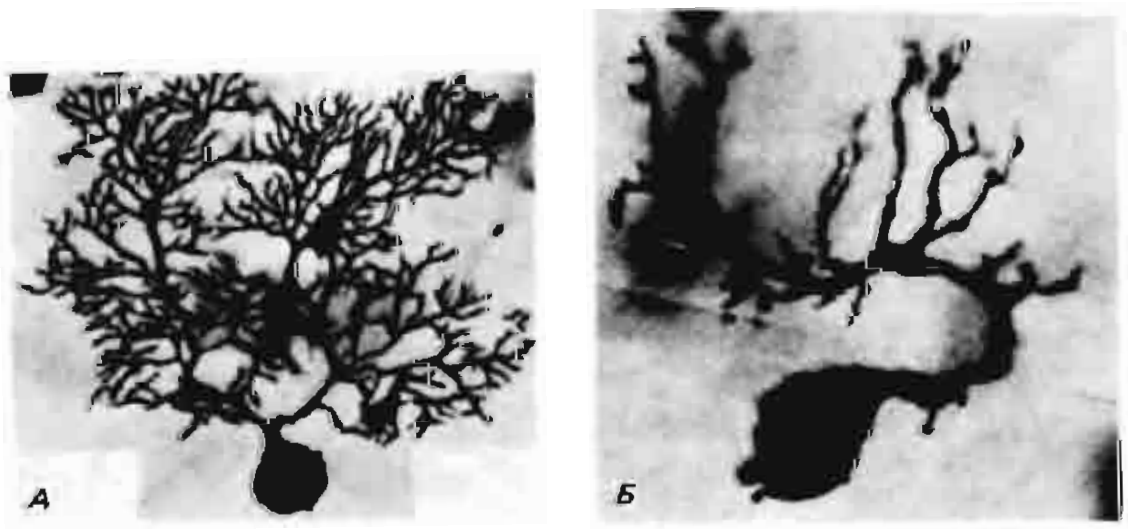


Рис. 5.16. Нейроны Пуркинье. *А*. Нейрон Пуркинье у нормальной мыши. *Б*. Недоразвитый нейрон у мыши, несущей мутацию *staggerer* (шатающаяся походка). У этого мутанта нарушена функция мозжечка, что приводит к характерному изменению походки. (Из Berry et al., 1980; фотографии с любезного разрешения M. Berry.)

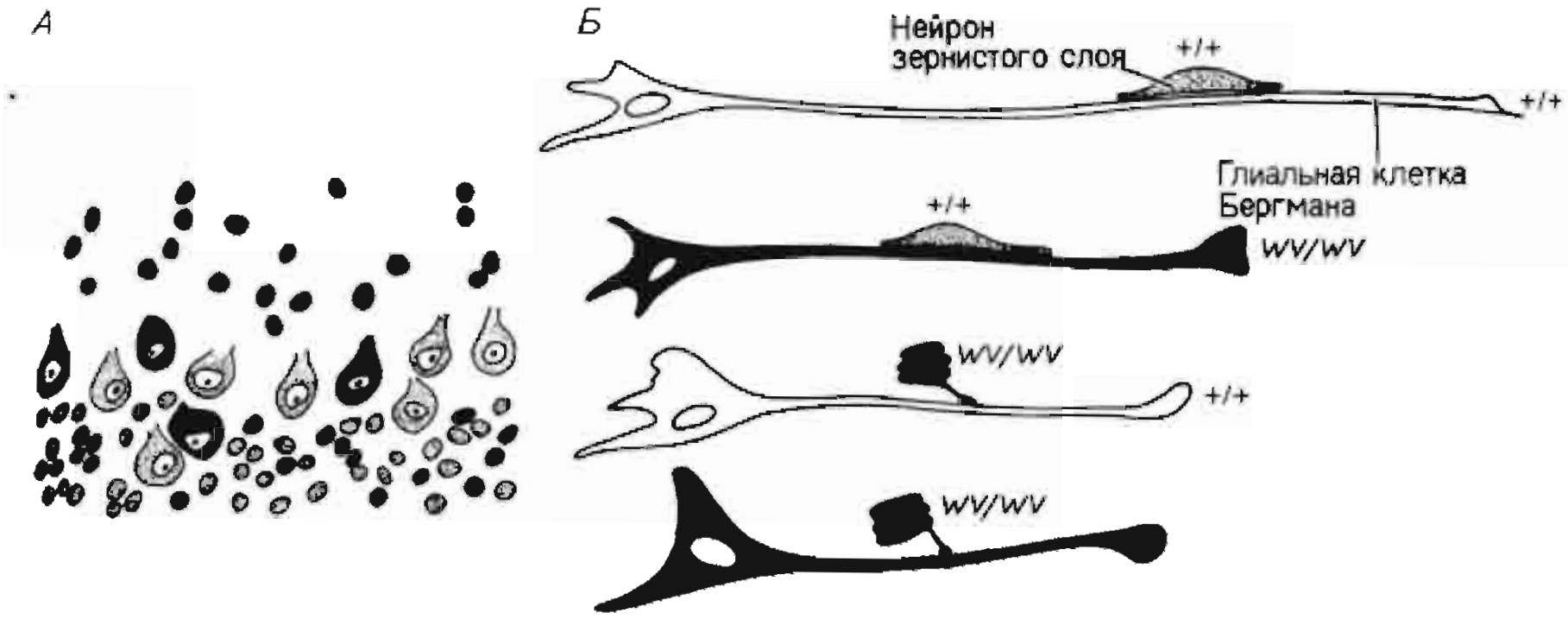


Рис. 5.17. Отсутствие миграции клеток-зерен (нейронов зернистого слоя) в мозжечке у мутанта *weaver* (качающаяся походка). *А*. Схематическое изображение нейронов у химерных мышей, получившихся в результате слияния клеток зародышей мышей дикого типа (+/+) и гетерозиготных по мутации *weaver* (*wv*/*wv*). Клетки, взятые от зародышей дикого типа, не закрашены; клетки от мутантных зародышей — черные. Почти все клетки зернистого слоя в аномальном положении происходят от клеток мутантных зародышей. *Б*. Комбинирование в разных сочетаниях культивируемых вместе клеток зародышей дикого типа и мутантов. Клетки-зерна дикого типа образуют плотные контакты с глиальными клетками любого типа, тогда как клетки-зерна мутантных зародышей не образуют таких контактов ни с одним из этих двух типов глиальных клеток. (*А* — по Goldowitz, Mullen, 1982; *Б* — по Hatten et al., 1986.)

ден с фенотипическим проявлением мутации *staggerer*; строение клеток Пуркинье у них также аномально. Однако у мышей weaver остановка роста клеток Пуркинье представляет собой вторичное явление — она обусловлена, по-видимому, генетическим дефектом клеток зернистого слоя. Это было доказано в опытах «конструирования» химерных мышей из зародышей дикого типа и мутантов weaver (Goldowitz, Mullen, 1982). У химерных мышей клетки дикого типа можно обнаружить в мозжечке по низкому содержанию в них β-глюкуронидазы (выявляемой гистохимическим методом) и по иной форме ядер. У мутантов меньше клеток Пуркинье, чем у мышей дикого типа, и локализация этих клеток в коре мозжечка аномальна. У химерных зародышей некоторые из нейронов Пуркинье также располагались не там, где они должны были находиться. Эти эктопические нейроны представляли собой клетки как того, так и другого генотипа. Однако все клетки зернистого слоя у мышей дикого типа находились там, где им положено, тогда как у мутантных зародышей эти клетки были случайно распределены по коре мозжечка (рис. 5.17, *А*). Таким образом, дефект у мышей weaver заключается, по-видимому, в отсутствии у клеток зернистого слоя способности мигрировать из наружного герминативного слоя в ту область коры мозжечка, где они должны находиться.

В зернистый слой нейробласты обычно мигрируют, двигаясь по длинным отросткам глиальных клеток Бергмана (Rakič, Sidman, 1973). Хаттеном и его коллегами (Hatten et al., 1986) было показано, что у мутантов weaver нейробласты неспособны узнавать клетки Бергмана как субстрат, по которому они должны мигрировать. В опытах этих исследователей в разных сочетаниях соединяли клетки зернистого слоя и клетки глии нормальных и мутантных зародышей (рис. 5.17, *Б*). Клетки от мышей дикого типа прочно слипались с глией зародышей обоих генотипов (как это обычно и бывает, когда клетки мигрируют). Однако у мутантных зародышей они не приближались ни к глиальным клеткам зародышей дикого типа, ни к глиальным клеткам зародышей weaver. Эти данные убедительно подтверждают предположение, что генетический эффект мутации *weaver* заключается в неспособности будущих клеток зернистого слоя узнавать клетки Бергмана и мигрировать по их поверхности.

Трехзонная структура мозга в полушариях также претерпевает существенные изменения. Некоторые нейробласты из плащевого слоя мигрируют через белое вещество и образуют вторую зону нейронов, называемую **новой корой** (неопаллиумом, или неокортексом). Эта новая кора мозга затем подразделяется на шесть слоев, содержащих тела нейронов. Дифференцировка этих слоев продолжается после рождения ребенка в течение первой половины детства.

Дополнительные сведения и гипотезы

Эволюция развития головного мозга

Эволюция коры головного мозга — один из наиболее интересных разделов анатомии позвоночных. Доли мозга возникают как парные выросты переднего мозга. У рыб, например, они первоначально функционируют как органы обоняния. У амфибий и рептилий **древнюю кору** (палеопаллиум) головного мозга покрывают **старая кора** (архипаллиум) и **полосатое тело** (corpus striatum) (рис. 5.18). Архипаллиум, по-видимому, связан с «эмоциональными» типами поведения, тогда как палеопаллиум и полосатое тело имеют отношение к автоматическим «инстинктивным» реакциям. У птиц полосатое тело развито очень хорошо. У более высокоорганизованных рептилий появляются первые нейроны, связанные с **новой корой** (неопаллиумом, или неокортексом). Эволюция мозга млекопитающих, и особенно человека, характеризуется необычайно интенсивным ростом и распространением новой коры, оттесняющей внутрь архипаллиум, который формирует гиппокамп (ответственный за сексуальное и агрессивное поведение). Мозолистое тело функционирует как реле для переключения некоторых непроизвольных реакций. Неокортекс становится центром обучения, памяти и интеллекта. У птиц нет новой коры, и у видов, способных к обучению, его функцию выполняет **гиперстриатум** (Romer, 1976).

Развитие новой коры у человека занимает чрезвычайно большой период времени. Фактически у ребенка после его рождения мозг продолжает развиваться с такой же скоростью, как у плода (Holt et al., 1975). Портманн (Portmann, 1941, 1945) полагает, что по сравнению с другими приматами у человека очень короткий период беременности. Сравнивая развитие плода у человека и других приматов, он определил, что беременность у женщины должна была бы продолжаться 21 мес. Портманн и Гоулд (Gould, 1977) считали, что именно такова и есть продолжительность беременности у человека, поскольку все мы в течение первого года жизни являемся в сущности внематочными плодами.

Это утверждение основывается на том, что и после рождения мозг ребенка продолжает расти чудовищно быстрым темпом, характерным для плода. Ни одна женщина не могла бы родить 21-месячного младенца, потому что его голова не могла бы пройти через родовые пути. Роды должны состояться в то время, когда голова у младенца еще достаточно мала, чтобы пройти через материнский таз. Поэтому человеческие детеныши рождаются в конце девятого, а не двадцать первого месяца беременности. Кроме того, именно в течение этого времени мы впервые подвергаемся влиянию окружающего мира. Наша развивающаяся нервная система получает существенный выигрыш от воздействия на нее столь сильной стимуляции в течение первого года жизни ребенка.



Рис. 5.18. Схематические рисунки головного мозга позвоночных животных, иллюстрирующие прогрессивную дифференцировку коры мозга в процессе эволюции. *А*. У наиболее примитивных форм имеется древняя кора (палеопаллиум), предназначенная только для обоняния (восприятия запахов). У амфибий (*Б*) дорсальная и вентральная части головного мозга дифференцируются соответственно на старую кору — архипаллиум (гиппокамп) — и базальные ядра, или подкорковые ганглии (полосатое тело). У примитивных рептилий (*В*) базальные ядра располагаются глубже в головном мозге, а у вышестоящих рептилий (*Г*) в коре появляется новая группа нейронов — новая кора, или неопаллиум. У млекопитающих (*Д*, *Е*) распространяющиеся нейроны новой коры больших полушарий головного мозга оттесняют старую кору, постепенно в процессе эволюции становясь преобладающими в коре головного мозга. (По Romer, 1976.)

ТИПЫ НЕЙРОНОВ. В головном мозге человека содержится более 100 миллиардов нервных клеток (нейронов), связанных с более чем триллионом вспомогательных глиальных клеток. Клетки, остающиеся неотъемлемыми компонентами выстилки нервной трубки, становятся **эпендимными клетками**. Из них могут образоваться как предшественники нейронов, так и глиальные клетки (рис. 5.19). Полагают, что дифференцировка этих клеток-предшественников в значительной степени детерминируется окружением, в которое они попадают (Rakič, Goldman, 1982), и что по крайней мере в некоторых случаях данная клетка-предшественник может формировать как нейроны, так и глиальные клетки (Turner, Cepko, 1987). Типы нейронов и глиальных клеток чрезвычайно разнообразны (это можно видеть из сравнения относительно мелкой клетки зернистого слоя и огромного нейрона Пуркинье). У некоторых нейронов образуется лишь небольшое число цитоплазматических участков, в которых другие клетки могут передавать им электрические импульсы, тогда как другие нейроны формируют обширные области, доступные для этой цели. Тонкие отростки нервных клеток, служащие для восприятия электрических импульсов, называются **дендритами** (рис. 5.20). Нейроны коры головного мозга новорожденного имеют очень мало дендритов, и одним из самых важных событий первого года его жизни является увеличение числа таких рецепторных участков в этих нейронах. В течение первого года жизни ребенка у каждого нейрона в коре головного мозга образуется поверхность дендритов, достаточная для размещения на ней 100 000 связей с другими нейронами. В среднем один нейрон коры головного мозга соединяется с 10 000 других нервных клеток. Этот характер нервных связей делает возможным функционирование коры головного мозга как центра обучения, мышления и памяти, развития способностей к обобщениям и к произвольным ответам на воспринимаемые и расшифрованные ею стимулы.

Другой важной структурой развивающегося нейрона является **аксон**. Если дендриты часто очень многочисленны и не распространяются далеко от **тела нервной клетки** (или сомы), то аксоны простираются на несколько футов (1 фут = 30,5 см). Так, частоту сердечных сокращений регулируют нервы, клеточные тела которых находятся в продолговатом мозге. Болевые рецепторы большого пальца ноги воспринимают импульсы, которые должны пройти долгий путь до спинного мозга. Одна из фундаментальных концепций нейробиологии заключается в том, что аксон представляет собой непрерывное продолжение тела нервной клетки. Еще в конце прошлого столетия существовали многочисленные конкурирующие теории образования аксона. Шванн, один из основоположников клеточной теории, считал, что многочисленные нервные клетки соединяются между собой в цепочку, формируя аксон. Гензен, открывший зародышевый узелок (названный впоследствии его именем), считал, что аксон формируется вокруг предсуществующих цитоплазматических тяжей между клетками. Вильгельм Гис (His, 1886) и Сантьяго Рамон-и-Кахал (Ramon y Cajal, 1890) утверждали, что аксон, безусловно, представляет собой вырост нервной сомы (хотя и чрезвычайно длинный).

Позже Гаррисон (Harrison, 1907) продемонстрировал справедливость теории выроста в изящном эксперименте, которым одновременно были заложены основы нейробиологии развития и метода культуры тканей. Гаррисон изолировал участок нервной трубки из зародыша лягушки длиной в три миллиметра. На этой стадии (вскоре после слияния нервных валиков) еще нет видимой дифференцировки аксонов. Он поместил нейробласты на покровное стекло в каплю лимфы лягушки и перевернул стекло над углублением в предметном стекле так, чтобы было возможно наблюдать за тем, что происходит в этой «висячей капле». И Гаррисон увидел (рис. 5.21), что аксоны образуются как выросты нейробластов, удлиняющиеся со скоростью примерно 56 мкм/ч.

Движение выроста осуществляется с помощью ведущего кончика аксона, называемого **конусом роста** (рис. 5.22). Конус роста движется не по прямой, он как бы нащупывает свой путь по субстрату. Движение конуса осуществляется посредством удлинения и сокращения заостренных филоподий, называемых **микрошипами**. Эти филоподии содержат микрофиламенты, ориентированные параллельно длинной оси аксона. (Микрофиламенты обусловливают процессы миграции клеток некоторых типов и всегда принимают участие в сократительной активности клеток.) Обработка нейронов цитохалазином В подавляет их дальнейшее продвижение (Yamada et al., 1971). В пределах самого аксона прочность его структуры обеспечивается микротрубочками: если нейробласт поместить в раствор колхицина, то аксон будет втягиваться в тело клетки (рис. 5.23). Таким образом, развивающийся нейрон сохраняет черты, уже обсуждавшиеся нами при изучении формирования нервной трубки, а именно удлинение клетки при участии микротрубочек и изменение формы ее апикального конца с помощью микрофиламентов. В наиболее активно мигрирующих клетках «исследующие» филоподии прикрепляются к субстрату и тянут за собой остальную часть клетки. Учитывая длину аксона, можно понять, что ему такую операцию проделать было бы трудно. Поэтому сократительный аппарат в филоподиях аксона является, по-видимому, только исследующим, а уд-

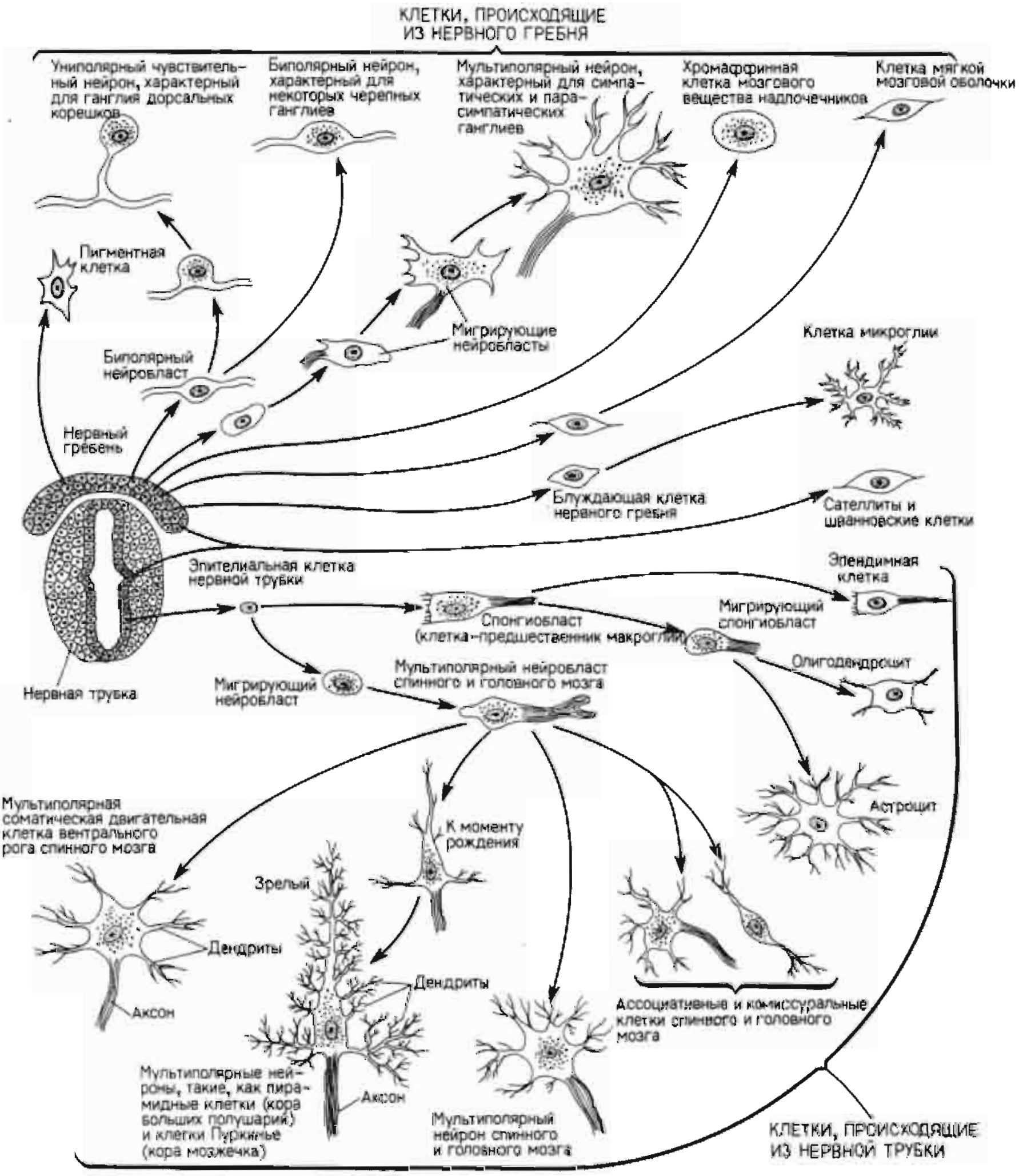


Рис. 5.19. Обобщенная схема, иллюстрирующая происхождение некоторых типов дифференцированных клеток нервной системы. (По Crelin, 1974.)

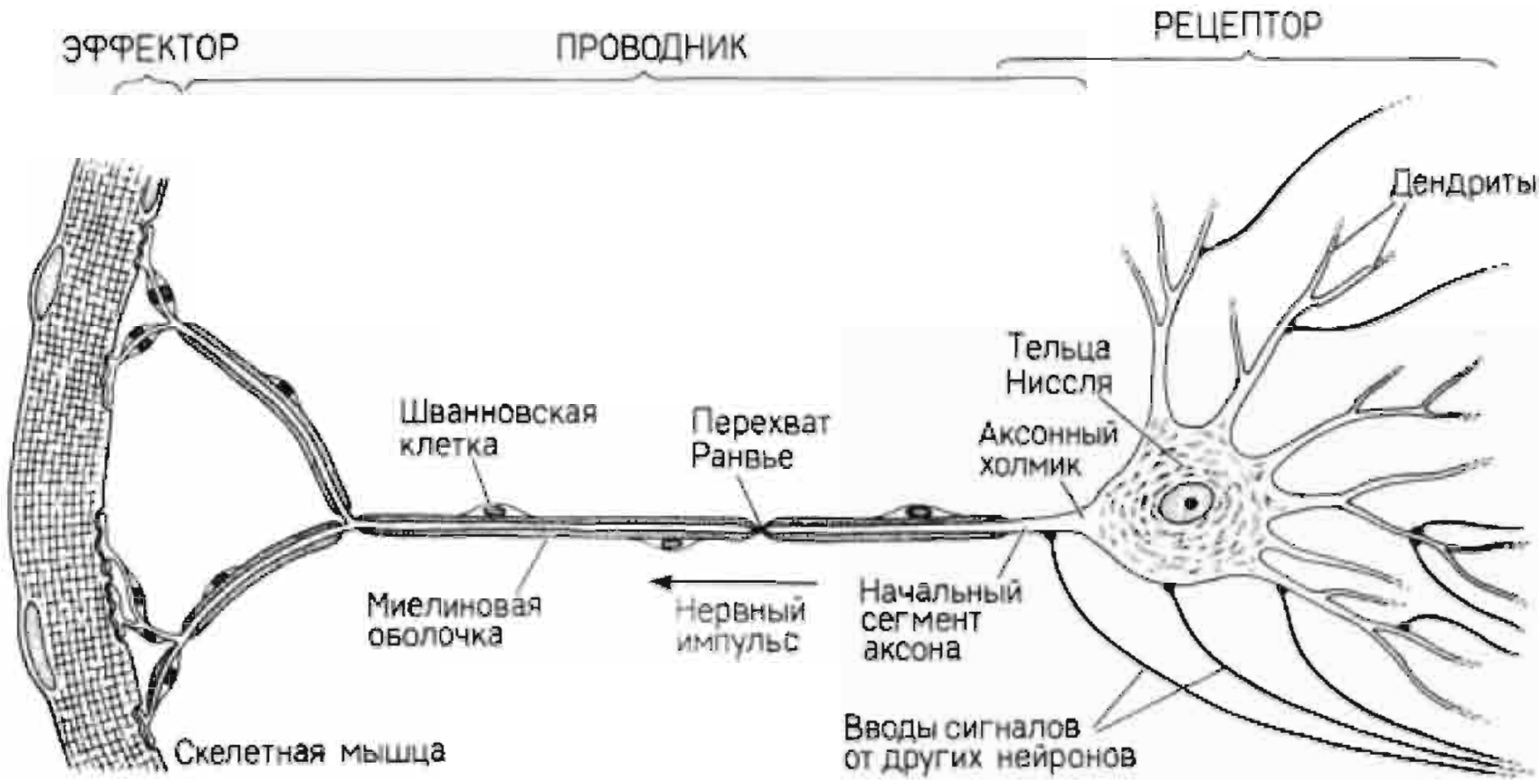


Рис. 5.20. Схематическое изображение двигательного (эфферентного) нейрона. Электрические импульсы, воспринимаемые дендритами и телом нервной клетки, передаются по аксону (который может достигать в длину до 1 м) к его ткани-мишени. Миелиновая оболочка, обеспечивающая изоляцию аксона, формируется прилежащими к нему шванновскими клетками. (По Bloom, Fawcett, 1975.)



Рис. 5.21. Рост нервного волокна в культуре. Растущий нейрон головастика зарисовывали по мере того, как он перемещался по отношению к неподвижной клетке (эритроциту). (Из Harrison, 1910.)

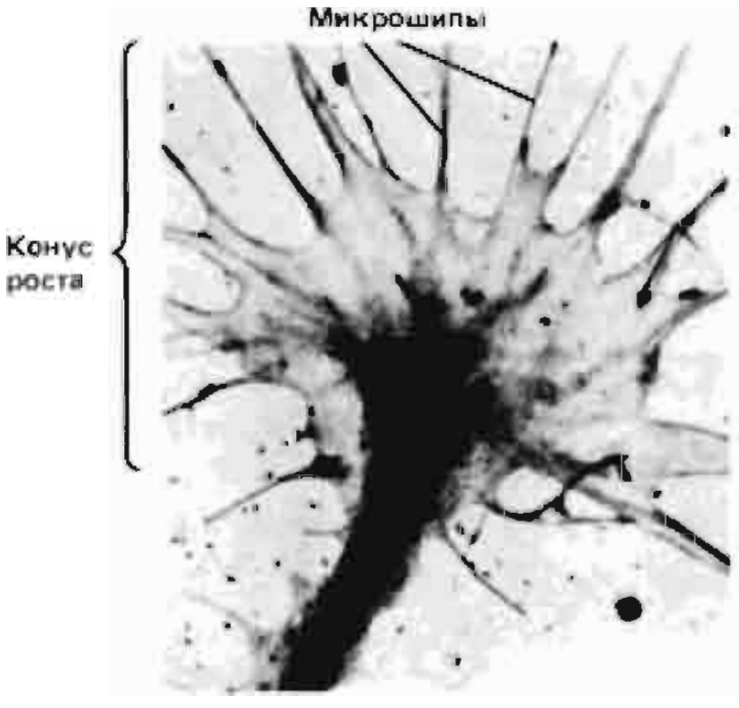


Рис. 5.22. Конус роста аксона. В области конуса роста видны микрошипы. Фотография получена с помощью просвечивающего электронного микроскопа. (Из Letourneau, 1979; фотография с любезного разрешения P. C. Letourneau.)

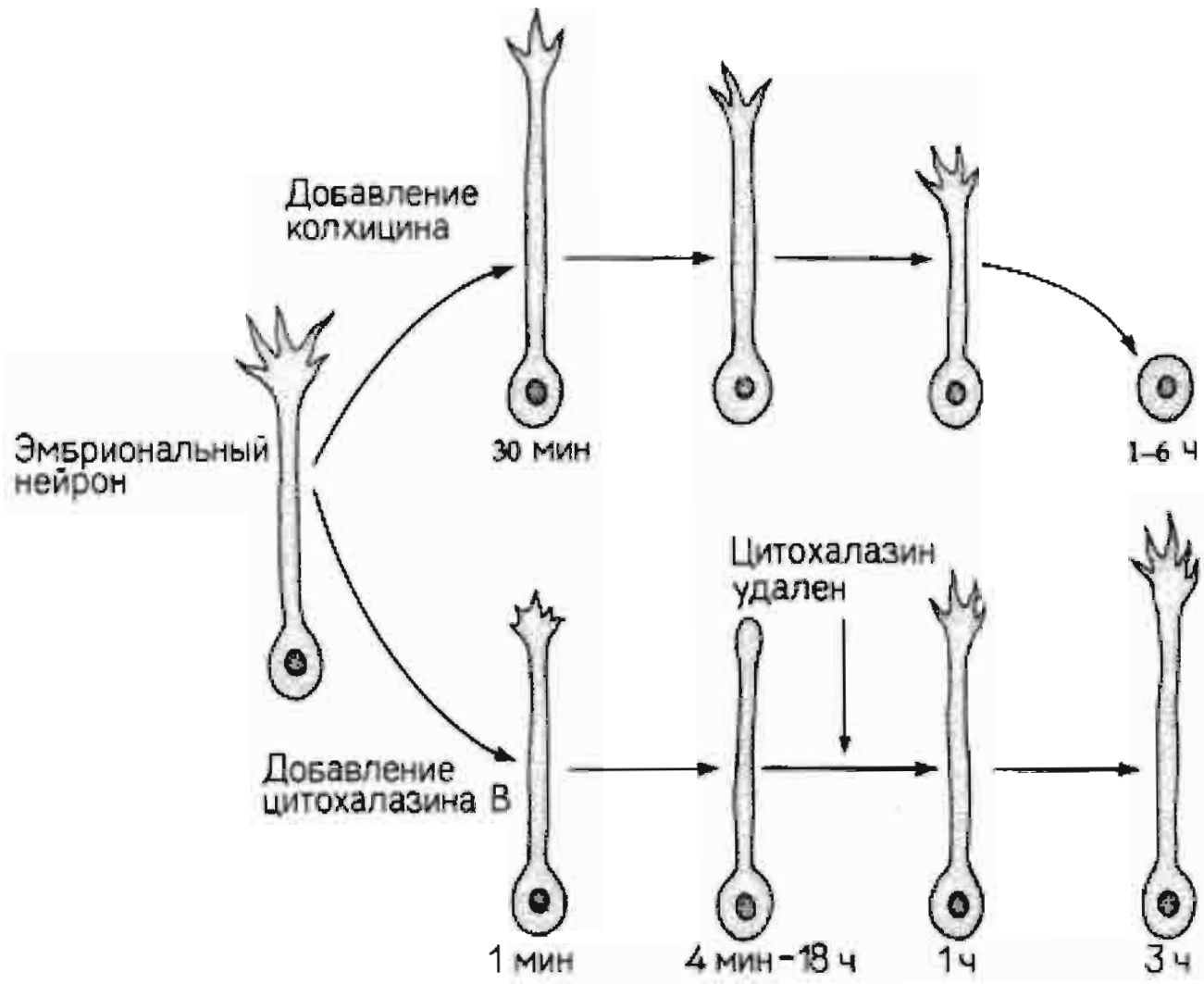


Рис. 5.23. Влияние цитохалазина В и колхицина на удлинение аксона у нейронов зародыша, культивируемых in vitro. Колхицин вызывает сокращение аксона — событие, связанное с разрушением микротрубочек. Цитохалазин В вызывает обратимую деполимеризацию микрофиламентов, что приводит к исчезновению микрошипов. Если цитохалазин удалить из среды, то конус роста появляется вновь.

линение аксона осуществляется при помощи перетекающей по нему цитоплазмы.

Нейроны передают электрические импульсы от одного участка к другому. Эти импульсы обычно проходят через дендриты в тело нейрона, где они фокусируются в аксоне. Чтобы предотвратить рассеяние электрического сигнала и облегчить его проведение, аксон в центральной нервной системе через определенные промежутки на всем его протяжении изолируется от других аксонов в нерве отростками глиальных клеток, называемых **олигодендроцитами**. Олигодендроцит как бы обвертывает собой развивающийся аксон. Затем он продуцирует специализированную клеточную оболочку, богатую основным белком миелином, которая окружает в виде спирали лежащий в ее центре аксон (рис. 5.24). Специализированная мембрана называется **миелиновой оболочкой**. (В периферической нервной системе миелинизацию аксонов осуществляют шванновские глиальные клетки.) Миелиновая оболочка имеет существенное значение для правильного функционирования нейрона; демиелинизация нервных волокон связана с некоторыми серьезными нарушениями умственной деятельности; иногда процесс демиелинизации приводит к летальному исходу.

Аксон должен быть также специализирован для секреции нейромедиаторов, способных проходить через небольшие пространства (синаптические щели), отделяющие аксон нервной клетки от поверхности его клетки-мишени (ее тела, дендритов, аксона, воспринимающего нейрона или рецепторов какого-либо периферического органа). Таким образом, развивающийся нейрон должен продуцировать специфические ферменты для синтеза и разрушения нейромедиаторов. Развитие нейрона означает не только структурную, но и молекулярную дифференцировку.

Развитие глаза

ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ГЛАЗА. Индивидуум приобретает знания об окружающем его мире с помощью органов чувств. В этом разделе мы сосредоточим внимание на развитии глаза, потому что для него, вероятно, более, чем для какого-либо другого органа тела, необходимы точность и совершенство координации развития всех его компонентов.

Развитие органа зрения начинается в стенке будущего промежуточного мозга. У человека это происходит на 22-й день развития, когда в стенке нервной трубки образуются латеральные выпячивания, которые впоследствии станут промежуточным мозгом. Дифференциальный рост выпячиваний приводит к образованию **глазных пузырей**, связанных с промежуточным мозгом **глазными стебельками**. Позже глазные пузыри приходят в контакт с эктодермальным покровным эпителием зародыша и индуцируют образование в нем **хрусталиковых плакод** (рис.

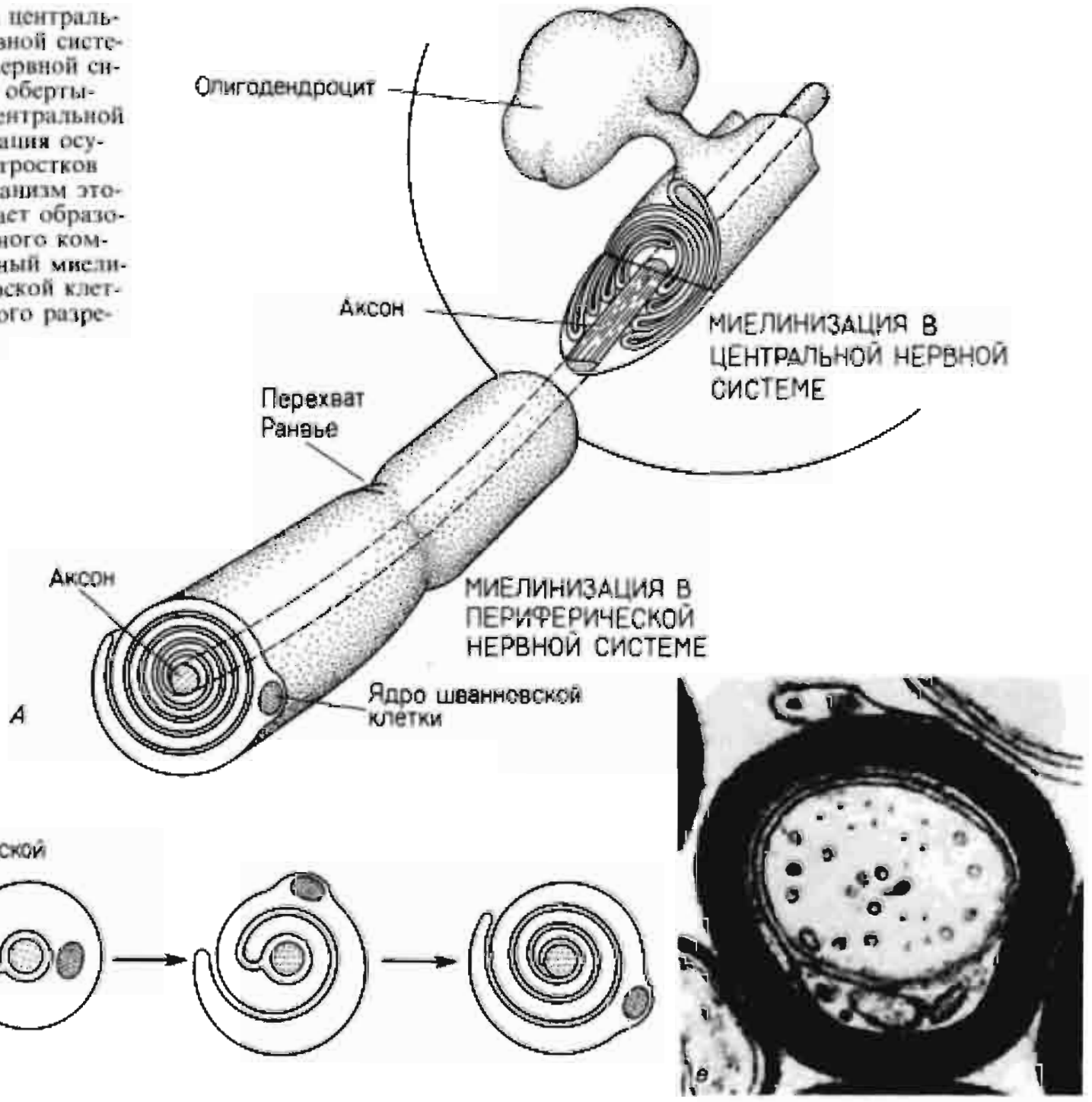


Рис. 5.24. Миелинизация в центральной и периферической нервной системе. *А*. В периферической нервной системе шванновские клетки обертываются вокруг аксона; в центральной нервной системе миелинизация осуществляется с помощью отростков олигодендроцитов. *Б*. Механизм этого обертывания обеспечивает образование огромного мембранного комплекса. *В*. Аксон, окруженный миелиновой мембраной шванновской клетки. (Фотография с любезного разрешения C. S. Raine.)

5.25)[1]. Эта индукция является специфической, поскольку изолированные глазные пузыри, имплантированные под эпителий любой области головы, будут вызывать в нем образование хрусталиковой ткани вместо эпидермальных клеток. В отсутствие контакта с глазным пузырем хрусталик не образуется. Необходимость тесного контакта между глазными пузырями и покровным эпителием подтверждается не только в экспериментах с трансплантацией глазных пузырей, но и нарушениями в развитии глаз у некоторых мутантов. Например, у мутантов мыши eyeless глазные пузыри не соприкасаются с покровным эпителием и формирование глаза прекращается (Webster et al., 1984).

Сформировавшись, хрусталиковая плакода в свою очередь вызывает изменения в глазном пузыре, передняя стенка которого инвагинирует и пузырь превращается в двустенную глазную чашу (рис. 5.26). По мере продолжения инвагинации глазной стебелек, соединяющий глазную чашу и головной мозг, сужается и связь между ними редуцируется до узкой щели. Одновременно с этим два слоя глазной чаши начинают дифференцироваться в разных направлениях. Клетки наружного слоя продуцируют пигмент и в конце концов образуют пигментированный слой, называемый **пигментной сетчаткой**. Число клеток внутреннего слоя быстро увеличивается, и эти клетки дают начало множеству светочувствительных (фоторецепторных) нейронов, глиальных клеток, промежуточных нейронов и ганглиозных клеток. Все эти клетки в совокупности составляют **нейральную ретину, или сетчатку**. Аксоны ганглиозных клеток нейральной сетчатки встречаются у основания глаза и далее проходят по **глазному стебельку**, который после этого начинают называть **зрительным нервом.**

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРАЛЬНОЙ СЕТЧАТКИ.

[1] Процессы индукции, участвующие в формировании глаза, подробно рассматриваются в гл. 8 и 16.

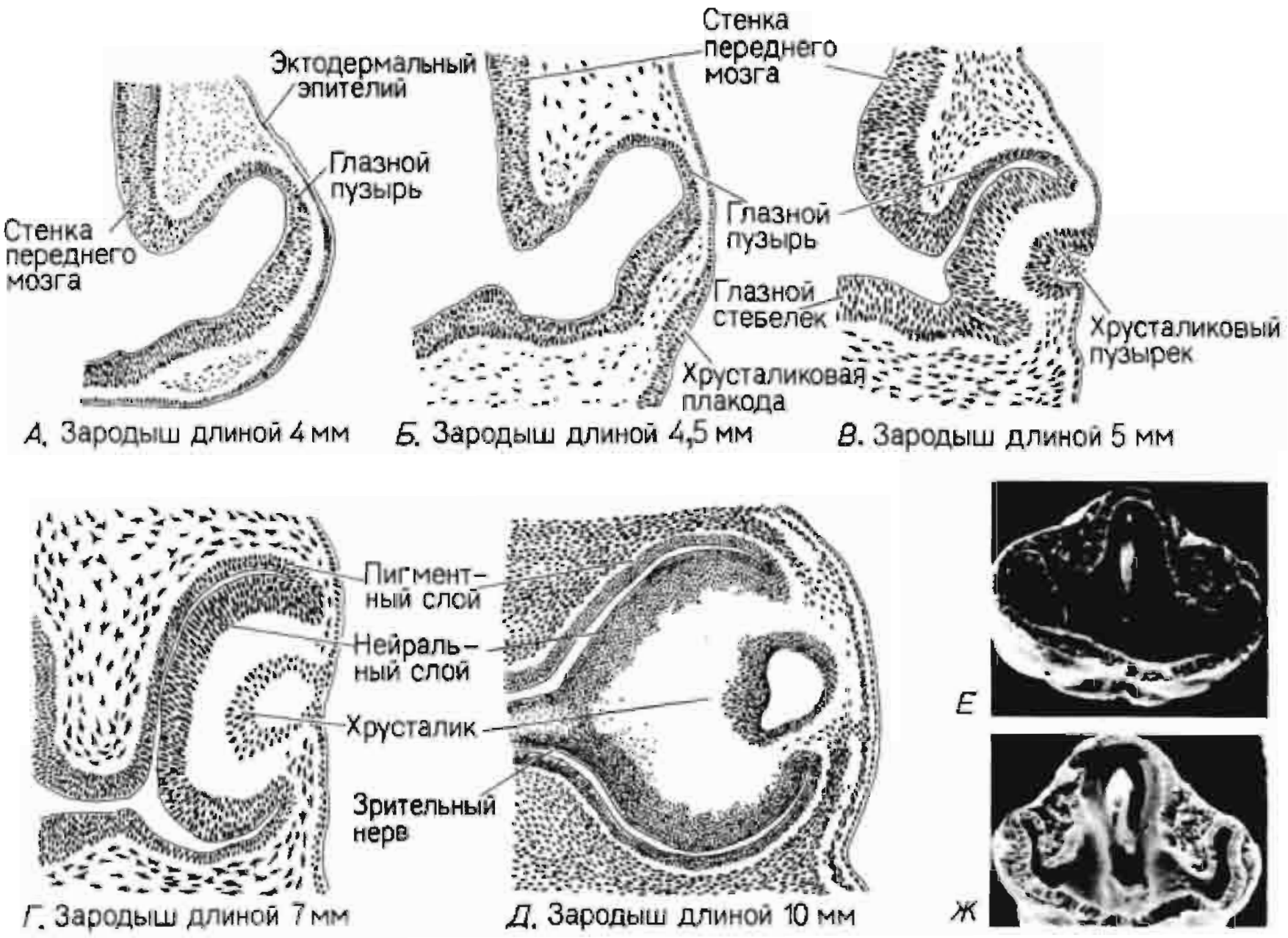


Рис. 5.25. Развитие глаза. *А*. Глазной пузырь выпячивается кнаружи от мозга и приходит в контакт с лежащим над ним эктодермальным эпителием. *Б, В*. Последний дифференцируется в клетки хрусталика; обращенная к нему стенка глазного пузыря впячивается внутрь. *Г*. Глазной пузырь превращается в нейральную сетчатку (ретину) и пигментную сетчатку (ретинальный пигментный эпителий), а хрусталик погружается внутрь глаза. *Д*. Хрусталик индуцирует образование роговицы в лежащем над ней эктодермальном эпителии, тогда как глазной стебелек превращается в зрительный нерв, передающий импульсы от глаза к мозгу. *Е, Ж*. Фотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа, соответствуют стадиям *А* и *Б*. (*А—Д* — из Mann, 1964; *Е, Ж* — из Hilfer, Yang, 1980; фотографии с любезного разрешения S. R. Hilfer.)

Подобно тому как это происходит в коре головного мозга и мозжечка, в сетчатке по мере ее развития разные нейроны группируются в слои светои цветочувствительных фоторецепторных клеток, тел ганглиозных клеток и биполярных промежуточных нейронов, передающих электрические стимулы от палочек и колбочек к ганглиозным клеткам (рис. 5.27). В дополнение к ним имеются многочисленные глиальные клетки, поддерживающие целостность сетчатки, а также амакриновые и горизонтальные нейроны, которые передают электрические импульсы в горизонтальном направлении.

На ранних стадиях развития сетчатки образование ее слоев обусловлено делением клеток герминативного слоя, их миграцией и дифференциальной гибелью. Формирование этой сложно структурированной ткани представляет собой одну из наиболее интенсивно изучаемых проблем нейробиологии развития. Недавно было показано (Turner, Cepko, 1987), что любая единичная клетка-предшественник нейробласта может дать начало по меньшей мере трем типам нейронов или двум типам нейронов и одному типу глиальных клеток. Этот анализ был осуществлен с помощью очень хитроумного способа мечения клеток, происходящих из одной конкретной клетки-предшественника. Новорожденным крысятам (с еще развивающейся сетчаткой) в заднюю стенку глаза инъецировали вирус, который мог включаться в ДНК клеток глаза. Этот вирус содержал ген β-галактозидазы (отсутствующий в сетчатке глаза крысы), который должен был экспрессироваться в инфицированных клетках. Через месяц после введе-



Рис. 5.26. Образование глазной чаши и хрусталиковой плакоды у куриного зародыша. Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Hilfer, Yang, 1980; фотография любезно предоставлена S. R. Hilfer.)

ния вируса сетчатку удаляли и окрашивали красителем, выявляющим присутствие β-галактозидазы. В синий цвет должны были окраситься только потомки инфицированных клеток. На рис. 5.28 показана одна из полос клеток, происшедших от инфицированной клетки-предшественника. Краситель виден в пяти палочках, биполярном нейроне и мюллеровской глиальной клетке.

Из трех основных типов нейронов сетчатки (ганглиозные, биполярные и фоторецепторные) фоторецепторные палочки и колбочки, вероятно, завершают свою дифференцировку последними. По мере развития этих наружных нейронов тело каждого из них образует вырост, содержащий некоторые специализированные органеллы. Эти органеллы удлиняют вырост и определяют размер и форму фотореактивных областей (Detwiler, 1932). Клеточные мембраны наружных нейронов складываются, образуя мешки, в которых размещаются фоторецептивные (зрительные) пигменты. Свет индуцирует химические изменения этих пигментов, приводящие в конечном счете к изменению мембранного потенциала. Изменение мембранного потенциала влияет на высвобождение нейромедиаторов из группы биполярных нейронов, которые переключают электрический сигнал на ганглиозные клетки. Аксоны этих клеток, соединяясь в пучки, образуют зрительный нерв, по которому полученная информация передается в головной мозг (Fesenko et al., 1985; Stryer, 1986).

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ХРУСТАЛИКА И РОГОВИЦЫ. Хрусталиковая плакода по мере своей дифференцировки в дефинитивный хрусталик округляется и приходит в контакт с вновь образованным над ней покровным эпителием (рис. 5.29). Затем хрусталиковая плакода индуцирует в нем образование прозрачной **роговицы**. Важную роль в развитии глаза играют физические факторы. Так, давление внутриглазной жидкости обеспечивает кривизну роговицы, необходимую для того, чтобы свет фокусировался точно на сетчатку. Значение внутриглазного давления можно продемонстрировать в эксперименте: если с помо-

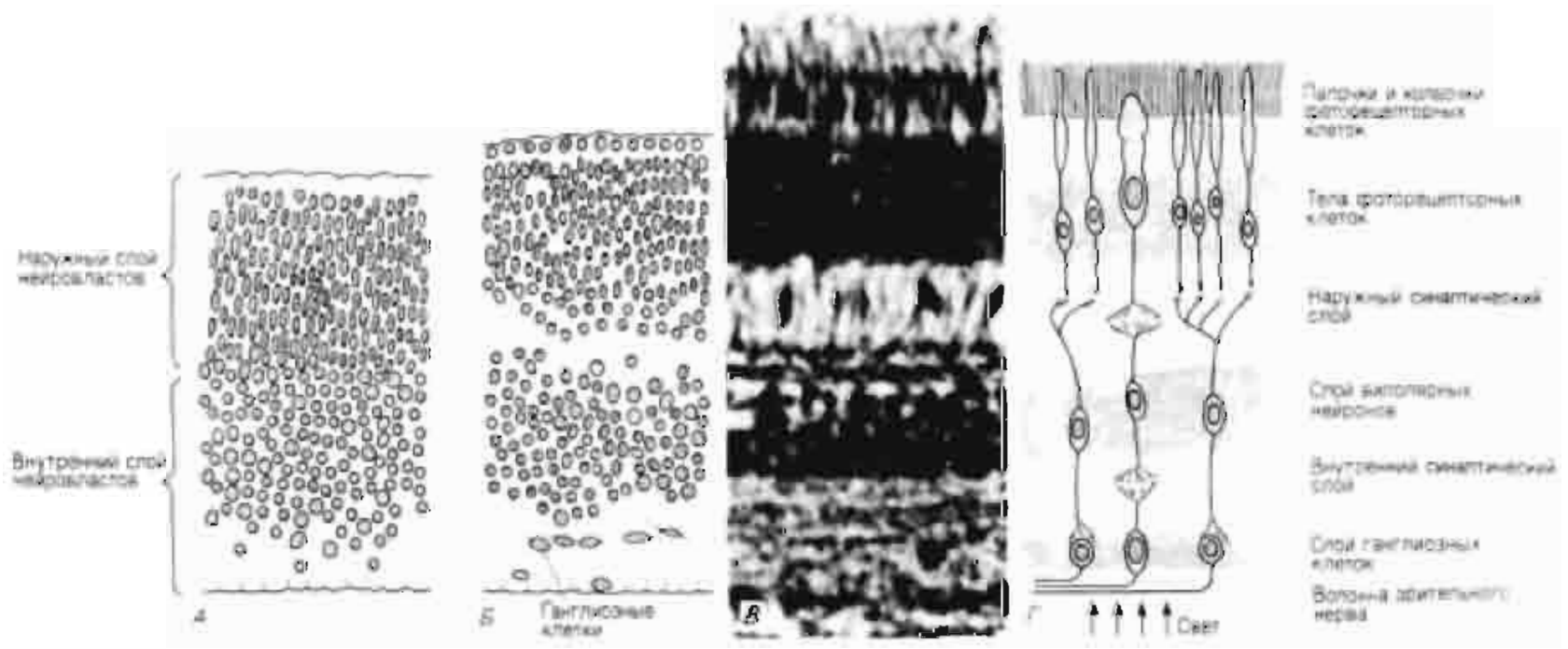


Рис. 5.27. Развитие сетчатки у человека. В процессе развития нейроны сетчатки распределяются по функциональным слоям. *А, Б*. Начальное разделение нейробластов в сетчатке. *В*. Три слоя нейронов в сетчатке глаза взрослого человека и синаптические слои между ними. *Г*. Схема главных функциональных связей между слоями сетчатки. Свет проходит через все слои, пока не улавливается фоторецепторами. Аксоны фоторецепторных клеток образуют синапсы с биполярными нейронами, которые передают деполяризованные сигналы ганглиозным нейронам. Аксоны ганглиозных клеток, объединяясь, образуют зрительный нерв, который входит в головной мозг. (*А, Б* — по Mann, 1964; фотография с любезного разрешения G. Grunwald.)

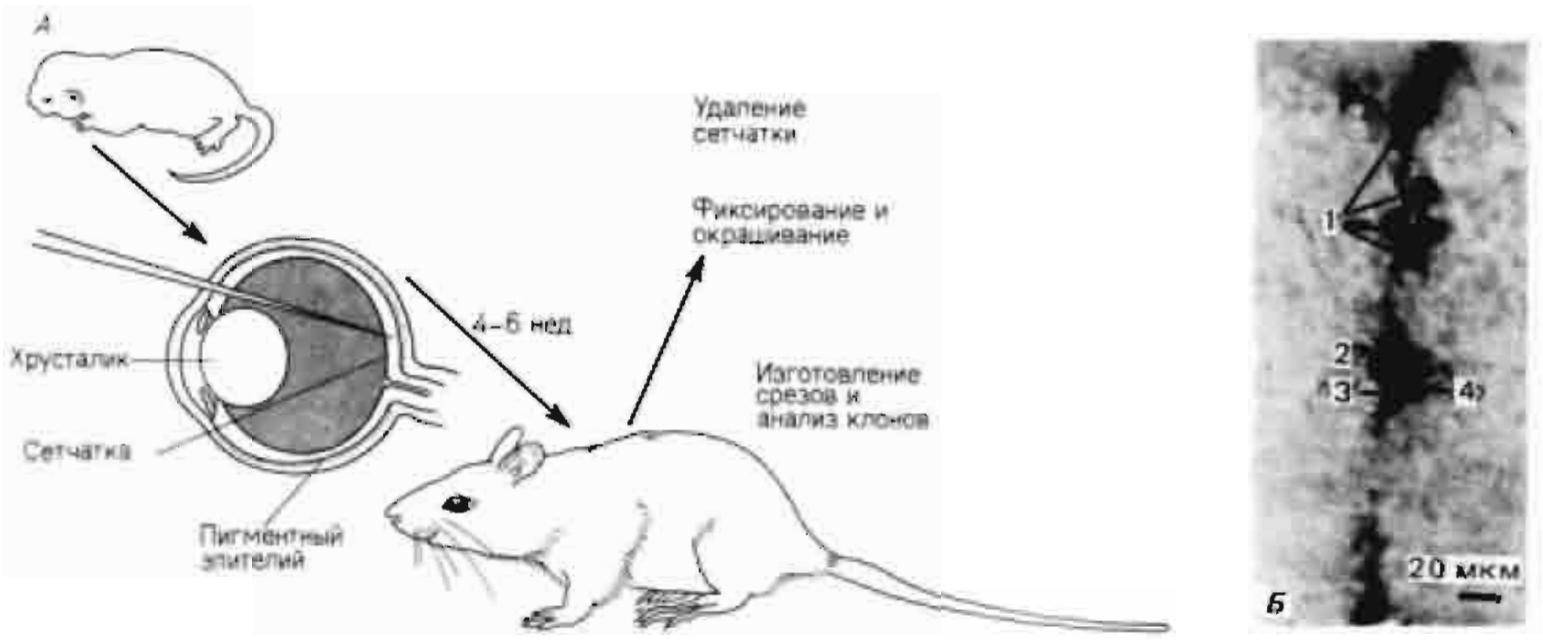


Рис. 5.28. Определение потомства единичной клетки-предшественника в сетчатке крысы. *А*. Методика, с помощью которой вирус, содержащий функциональный ген β-галактозидазы, инъецируют в заднюю стенку глаза с целью заражения некоторых клеток-предшественников сетчатки. Через месяц-полтора глаз удаляют и окрашивают сетчатку на присутствие β-галактозидазы. *Б*. Окрашенные клетки образуют в нейральной сетчатке полоску, состоящую из 5 палочек (*1*), биполярного нейрона (*4*), концевой палочки (*2*) и мюллеровской глиальной клетки (*3*). Идентичность этих клеток была подтверждена с помощью методики Номарски (с использованием фазово-контрастного микроскопа). (Из Turner, Cepko, 1987; фотография с любезного разрешения D. Turner.)

щью стеклянной микротрубочки из развивающегося глаза цыпленка эту жидкость удалить, то роговица не приобретает характерной для нее выпуклости (Coulombre, 1956, 1965). Внутриглазное давление поддерживается кольцом склеральных косточек (происходящих, вероятно, из клеток нервного гребня), которое оказывает неупругое сопротивление. В отсутствие склеральных косточек давление не сохраняется и роговица не приобретает правильной формы.

Хрусталик дифференцируется в прозрачное тело, способное направлять свет на сетчатку посредством изменений формы и структуры его клеток, а также синтеза в них специфичных для хрусталика белков, называемых **кристаллинами**. Эти белки синтезируются в период, когда происходят изменения формы клеток, обусловливающие превращение хрусталикового пузырька в дефинитивный хрусталик. Клетки внутренней части хрусталикового пузырька удлиняются и под влиянием сетчатки образуют хрусталиковые волокна (Piatigorsky, 1981). Растущие хрусталиковые волокна синтезируют кристаллины, которые в итоге заполняют всю клетку и выталкивают из нее ядро. Продолжая расти, волокна, синтезирующие кристаллины, в конце концов заполняют все пространство между двумя слоями хрусталикового пузырька. Клетки переднего слоя хрусталика представляют собой герминативный эпителий, в котором продолжаются митозы. Делящиеся клетки движутся к экватору и, проходя через область экватора, также начинают удлиняться (рис. 5.30). Таким образом, хрусталик состоит из трех отделов: передняя зона делящихся эпителиальных клеток, экваториальная зона удлиняющихся клеток и задняя зона вместе с центром хрусталика, содержащая волокнистые клетки, которые продуцируют кристаллин. Такая структура хрусталика сохраняется в течение всей жизни животного, поскольку в задней области хрусталика непрерывно закладываются новые волокна. У взрослой курицы процесс дифференцировки эпителиальной клетки в хрусталиковое волокно занимает два года (Papaconstantinou, 1967). Подробнее фор-

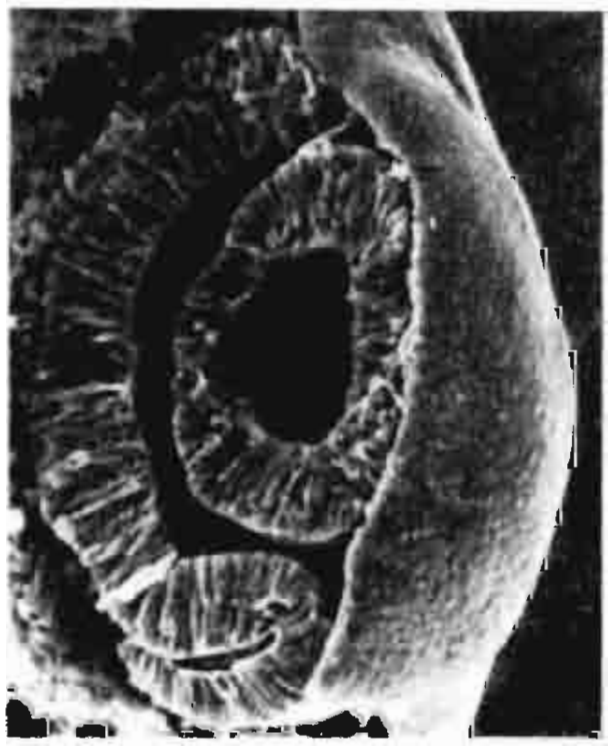


Рис. 5.29. Округлый, погруженный в глазную чашу хрусталиковый пузырек у куриного зародыша. Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Фотография с любезного разрешения K. W. Tosney.)

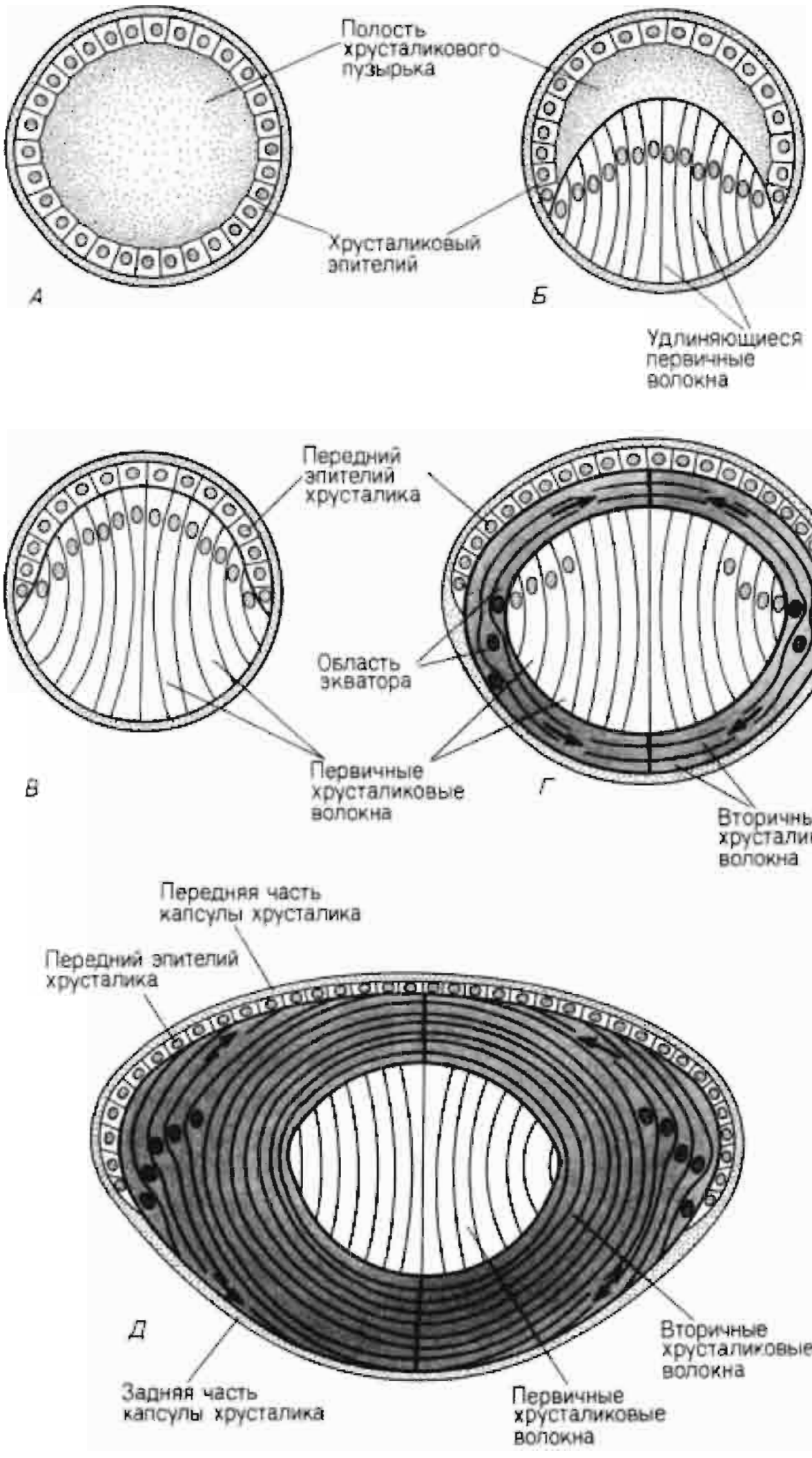


Рис. 5.30. Дифференцировка клеток хрусталика. *А*. Хрусталиковый пузырек на стадии, показанной на рис. 5.29. *Б*. Удлинение клеток, образующих хрусталиковые волокна. *В*. Хрусталик заполнен клетками, синтезирующими кристаллин. *Г*. Новые клетки хрусталика формируются из переднего эпителия. *Д*. По мере роста хрусталика происходит дифференцировка новых волокон. (По Paton, Craig, 1974.)

мирование хрусталика и роговицы рассматриваются в гл. 16.

Непосредственно перед хрусталиком лежит **радужка**, придающая индивидууму характерный для него (или нее) цвет глаз и содержащая мышцы, которые контролируют размер зрачка. В отличие от других мышц (происходящих из мезодермы) мышцы радужки образуются из эктодермального слоя, точнее, из той части глазной чаши, которая является продолжением нейральной сетчатки, но в ней не возникает фоторецепторов.

Нервный гребень и его производные

Нервный гребень происходит из эктодермы, но его значение для развития зародыша столь велико, что иногда нервный гребень называют четвертым зародышевым листком. Клетки нервного гребня активно мигрируют на большие расстояния и являются родоначальниками громадного числа типов клеток, включая 1) нейроны и вспомогательные глиальные клетки сенсорной, симпатической и парасимпатической нервной системы; 2) клетки надпочечника, синтезирующие адреналин; 3) содержащие пигмент клетки эпидермиса и 4) скелетные и соединительнотканные компоненты головы (табл. 5.1). Судьба клеток нервного гребня зависит от того, куда они мигрируют и где поселяются.

Пути миграции клеток нервного гребня

Как видно из рис. 5.2, нервный гребень представляет собой временную структуру, клетки которой распространяются по телу вскоре после смыкания нервной трубки. Пересаживая участки нервной трубки, взятые от зародыша цыпленка вместе с соответствующим участком нервного гребня от зародышей, имеющих радиоактивные или генетические маркеры, другим зародышам (Weston, 1963; Thiery et al., 1982), исследователи смогли проследить пути миграции клеток нервного гребня (рис. 5.31). Позже миграция этих клеток была прослежена с помощью флуоресцирующих антител, которые связываются почти исключительно с мигрирующими клетками нервного гребня. Такая методика позволяет идентифицировать отдельные клетки нервного гребня в пределах обширных областей тела. Используя флуоресцирующие антитела, исследователи из нескольких лабораторий установили три главных пути, по которым эти клетки мигрируют в разные области (Rickmann et al., 1985; Bronner-Fraser, 1986a; Teillet et al., 1987; Loring, Erickson, 1987; рис. 5.32). Первый путь простирается в вентральном направлении через передний отдел сомита. Из рис. 5.33 и цветной таблицы на обложке книги можно видеть, что мигрирующие клетки нервного гребня способны вступать только в передний, а не в задний отдел сомита. Некоторые из этих клеток достигают спинной аорты, где из них формируются **симпатические ганглии**. Ганглии представляют собой скопления нейронов, которые после стимуляции их нейронами спинного мозга передают полученные импульсы клеткам-мишеням[1]. В особых областях тела клетки нервного гребня, мигрирующие тем же путем, образуют скопления и формируют секретирующие адреналин клетки **мозгового вещества надпочечников**.

Что же происходит с теми клетками нервного гребня, которые располагаются вблизи заднего отдела сомита? Используя антитела, мы можем узнать об их положении в пространстве, но не можем выяснить направление, в котором движется специфическая группа клеток. Были проведены опыты (Teillet et al., 1987), в которых иммунологическую методику комбинировали с пересадкой генетически маркированных клеток нервного гребня перепела куриным зародышам. Антитела узнавали и метили клетки нервного гребня обоих видов животных, а генетический маркер позволял исследователю отличить клетки нервного гребня перепела от клеток нервного гребня курицы. Эти опыты дали возможность идентифицировать второй путь миграции — путь клеток, лежащих напротив задних отделов сомитов. Такие клетки нервного гребня перемещаются вдоль нервной трубки вперед или назад и затем вступают в передние отделы своих собственных или прилежащих к ним сомитов. Такие клетки объединяются с некоторыми из клеток нервного гребня, исходно расположенных напротив переднего отдела сомита и вместе с ними формируют **ганглии дорсальных корешков** — скопления нейронов, переключающих сенсорную информацию на спинной мозг. Таким образом, каждый ганглий дорсального корешка сформирован тремя популяциями клеток нервного гребня: одна — из участка нервного гребня, прилежащего к переднему отделу сомита, а две другие — из его участков, которые прилегают к задним отделам двух соседних сомитов.

Третий основной путь миграции клеток нервного гребня проходит в дорсовентральном направлении под покровным эпителием зародыша. Некоторые из клеток, мигрирующих по этому пути, дифференцируются в пигментные клетки (у млекопитающих — **меланоциты**). Они движутся из центральной дорсальной области по вентральной поверхности покровного эпителия в этом направлении и достигают в конце концов кожи живота. У некоторых мутантов, у которых нарушены процессы миграции клеток нервного

[1] Парасимпатический отдел периферической нервной системы также формируется из клеток нервного гребня, мигрирующих тем же путем, но только в краниальные и шейные области зародыша.

Таблица 5.1. Основные производные нервного гребня [1]

Пигментные клетки	Сенсорная нервная система	Вегетативная нервная система	Скелетная и соединительная ткань	Эндокринные железы
ТУЛОВИЩНЫЙ ОТДЕЛ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ (ВКЛЮЧАЯ ШЕЙНЫЙ ОТДЕЛ)				
Меланоциты	Спинальные ганглии	*Симпатическая*	Мезенхима спинного плавника у амфибий	Мозговое вещество надпочечника
Ксантофоры (эритрофоры)	Участие в ганглиях дорсальных корешков блуждающего нерва (X)	Верхний шейный ганглий	Стенки артериальных дуг	Клетки, продуцирующие кальцитонин
Иридофоры (гуанофоры) в кориуме, эпидермисе и производных эпидермиса		Превертебральные ганглии	Соединительная ткань паращитовидной железы	Клетки типа I каротидного синуса
		Паравертебральные ганглии		Парафолликулярные клетки щитовидной железы
		Мозговое вещество надпочечников		
		Парасимпатическая		
		Ремаков узел		
		Крестцовое сплетение		
		Висцеральные и кишечные ганглии		
		Некоторые опорные клетки		
		Глия (олигодендроциты)		
		Швановские клетки		
		Некоторые клетки мозговой оболочки		
ЧЕРЕПНОЙ ОТДЕЛ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ				
Незначительное участие	Тройничный (V)	*Парасимпатические ганглии*	Большая часть висцеральных хрящей	
	Лицевой (VII) корешковый ганглий	Ресничный	Передние черепные трабекулы	
	Языкоглоточный (IX) корешковый (верхний) ганглий	Крылонёбный	Клетки, участвующие в образовании задних трабекул, базальной мембраны парахордальных хрящей	
	Блуждающий (X) корешковый (яремный) ганглий	Субмандибулярный	Одонтобласты	
		Ганглии внутренних органов	Головная мезенхима (покровные кости)	
		Опорные клетки		

[1] Weston, 1970; Bockman, Kuby, 1984.

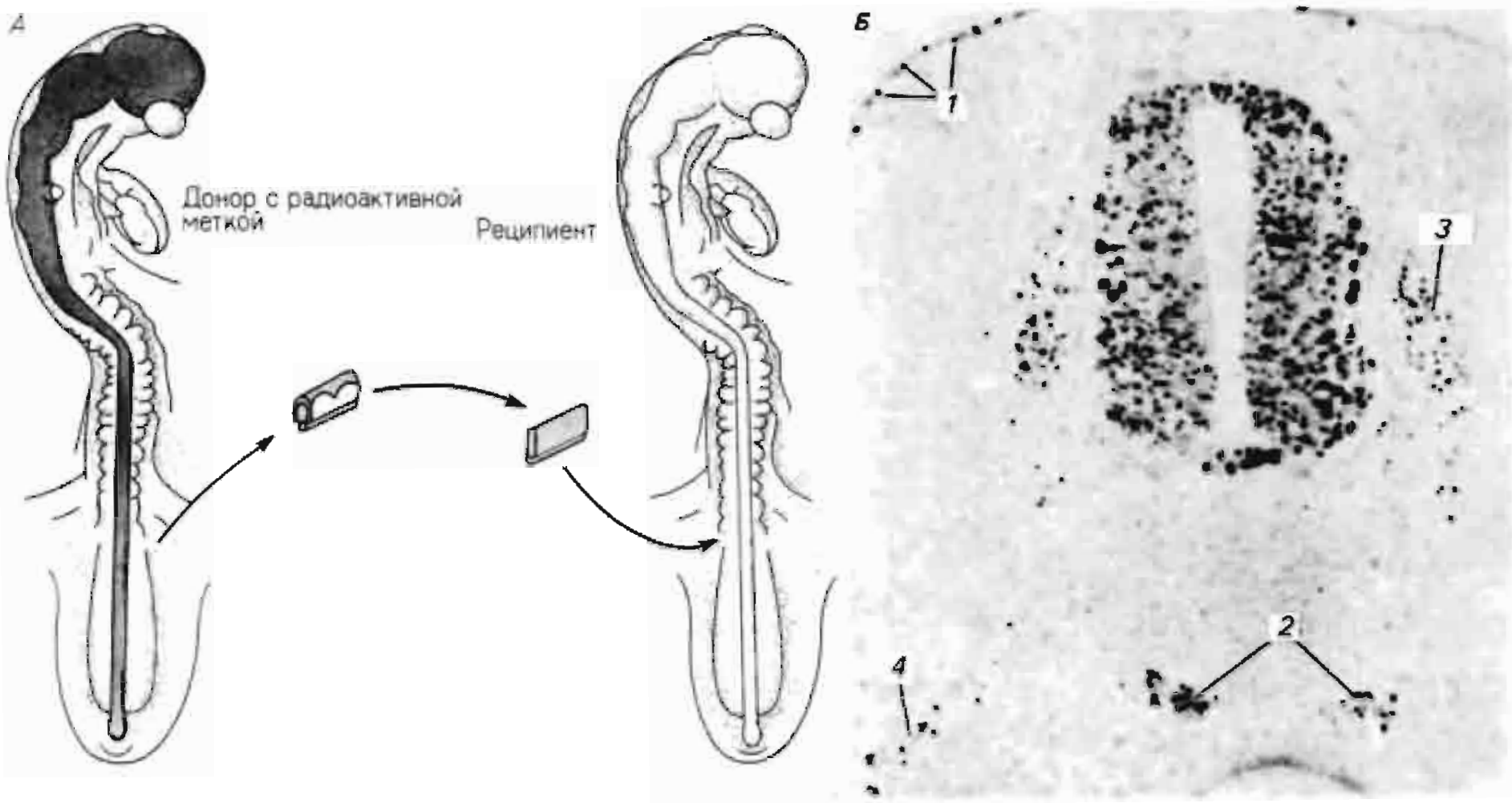


Рис. 5.31. Миграция клеток нервного гребня. *А*. Методика пересадки с целью маркировки клеток нервного гребня. У зародыша-донора вырезают участок дорсальных осевых структур; из этого участка изолируют нервную трубку и нервный гребень и пересаживают эти структуры зародышу-реципиенту на место, из которого такие же структуры были предварительно удалены. Если клетки нервного гребня донора помечены ^{3}H-тимидином или генетически (взяты от зародыша другого вида или линии), то потомки этих клеток могут быть прослежены на последующих стадиях развития. *Б*. Локализация методом радиоавтографии клеток нервного гребня, которые мигрировали из пересаженного донорского нервного гребня, меченного радиоактивным изотопом, и дифференцировались в меланобласты (*1*), клетки симпатических ганглиев (*2*), ганглиев дорсальных корешков (*3*) и глиальные клетки (*4*). *В*. Цыпленок, развивавшийся из зародыша непигментированной линии кур, которому был пересажен участок нервного гребня, взятый от зародыша пигментированной линии. Из клеток пересаженного нервного гребня дифференцировались пигментные клетки, способные мигрировать в кожу крыла. (По Weston, 1963; фотография любезно предоставлены J. Weston.)

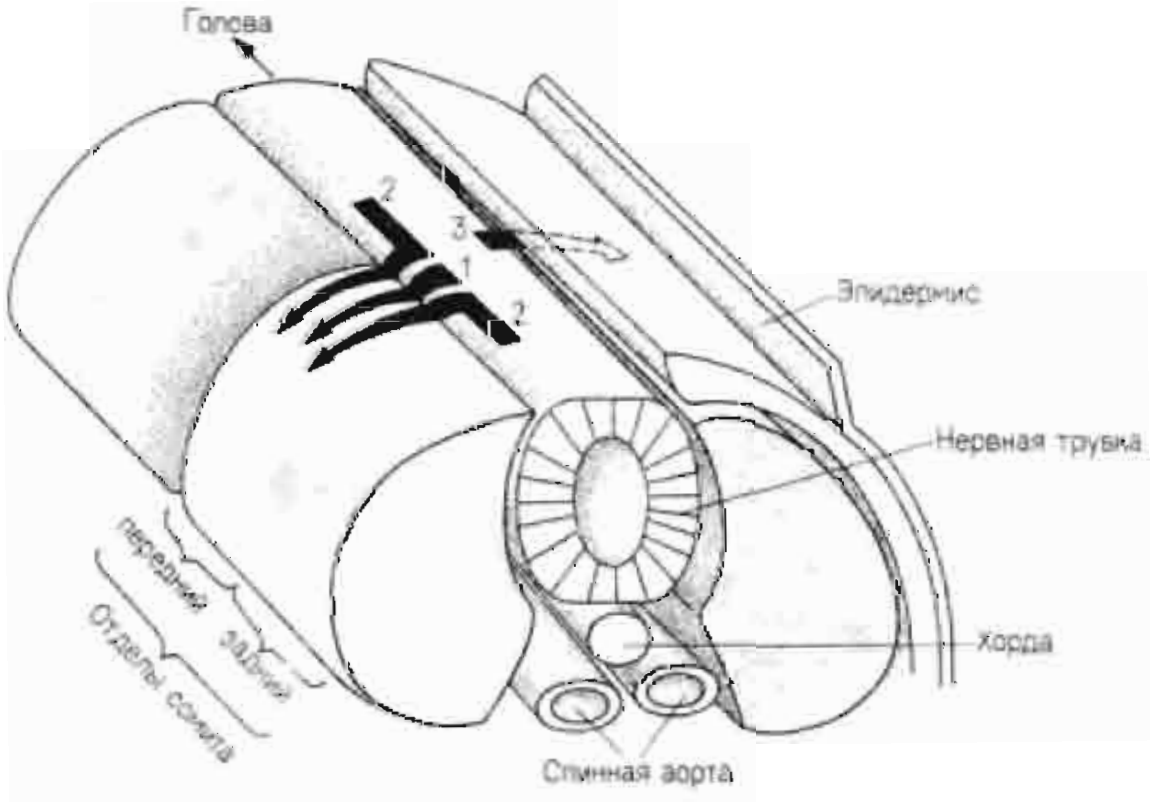


Рис. 5.32. Миграция клеток нервного гребня в туловищной области куриного зародыша. Путь 1: клетки перемещаются в вентральном направлении через передний отдел сомита. Эти клетки, вероятно, участвуют в образовании симпатических и парасимпатических ганглиев, а также становятся клетками мозгового вещества надпочечников и ганглиев дорсальных корешков. Путь 2: клетки, примыкающие к заднему отделу сомита, мигрируют между нервной трубкой и сомитом, а затем вступают в передний отдел лежащего рядом сомита. Эти клетки были обнаружены в ганглиях дорсальных корешков. Путь 3: клетки мигрируют в дорсолатеральном направлении под покровным эпителием. Эти клетки становятся меланоцитами, вырабатывающими пигмент.

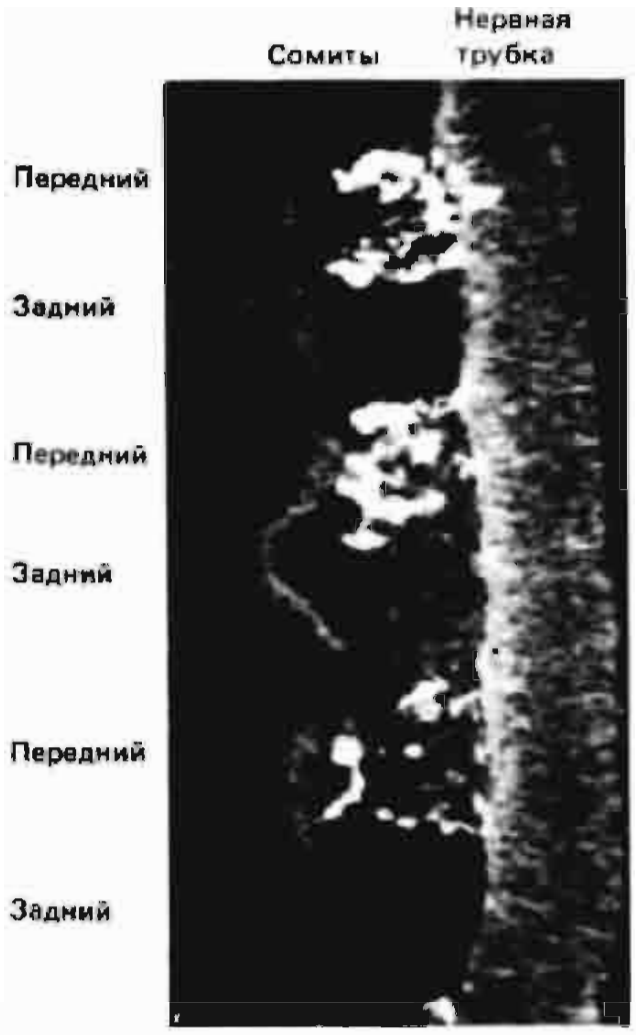


Рис. 5.33. Миграция клеток нервного гребня. Продольные срезы через сомиты, окрашенные связанной с флуоресцеином антисывороткой HNK-1, которая избирательно «узнает» клетки нервного гребня. Интенсивное свечение клеток видно только в переднем, но не в заднем отделе каждого сомита. (Из Bronner-Fraser, 1986a; фотография с любезного разрешения M. Bronner-Fraser.)

гребня, на брюхе образуется белое пятно, свидетельствующее о том, что пигментные клетки этого места не достигли (рис. 5.34).

Таким образом, клетки нервного гребня мигрируют не случайно, а следуя строго определенным путям. Природа этих направляющих их движение путей еще неизвестна, однако полагают, что миграция клеток контролируется субстратом, по которому они продвигаются. В 1941 г. Пауль Вейс высказал предположение, что между специфическими молекулами поверхности клетки и комплементарными молекулами субстрата должны возникать временные связи. Сравнительно недавно были получены данные, свидетельствующие о том, что по крайней мере в отношении клеток нервного гребня дело обстоит именно так. Во-первых, когда нервную трубку и связанный с нею нервный гребень переворачивают так, что нервная трубка оказывается вверху, клетки нервного гребня продолжают мигрировать из него. Однако теперь они движутся в дорсальном, а не в вентральном направлении, тем самым сохраняя прежнюю ориентацию по отношению к нервной трубке. Во-вторых, когда клетки нервного гребня или их производные помещают (посредством пересадки или инъекции) на место, по которому в норме пролегает путь их миграции, они мигрируют по этому пути. Другие же эмбриональные клетки неспособны ориентироваться подобным образом и остаются в том месте, на которое их поместили (Erickson et al., 1980; Bronner-Fraser, Cohen, 1980). Следовательно, клетки нервного гребня могут узнавать некоторые пути в зародыше и мигрировать по ним.

Возможно, клетки нервного гребня узнают правильный путь потому, что он маркирован белком фибронектином. Розавио и др. (Rosavio et al., 1983) было обнаружено, что мигрирующие клетки нервного гребня, прикрепляясь к этому белку, движутся по нему. Если клетки нервного гребня, помещенные в чашку Петри, приходят в контакт с полоской фибронектина, то они предпочитают двигаться по ней в направлении от более высоких концентраций клеток к более низким (рис. 5.35). Это имитирует поведение клеток нервного гребня в головной области, где такие клетки путешествуют по тонким, богатым фибронектином трекам, удаляясь от участков с высокой плотностью клеток (Mayer et al., 1981). Клетки нервного гребня обнаруживают также сродство к ламинину, другому белку, секретируемому клетками и участвующему в образовании внеклеточ-

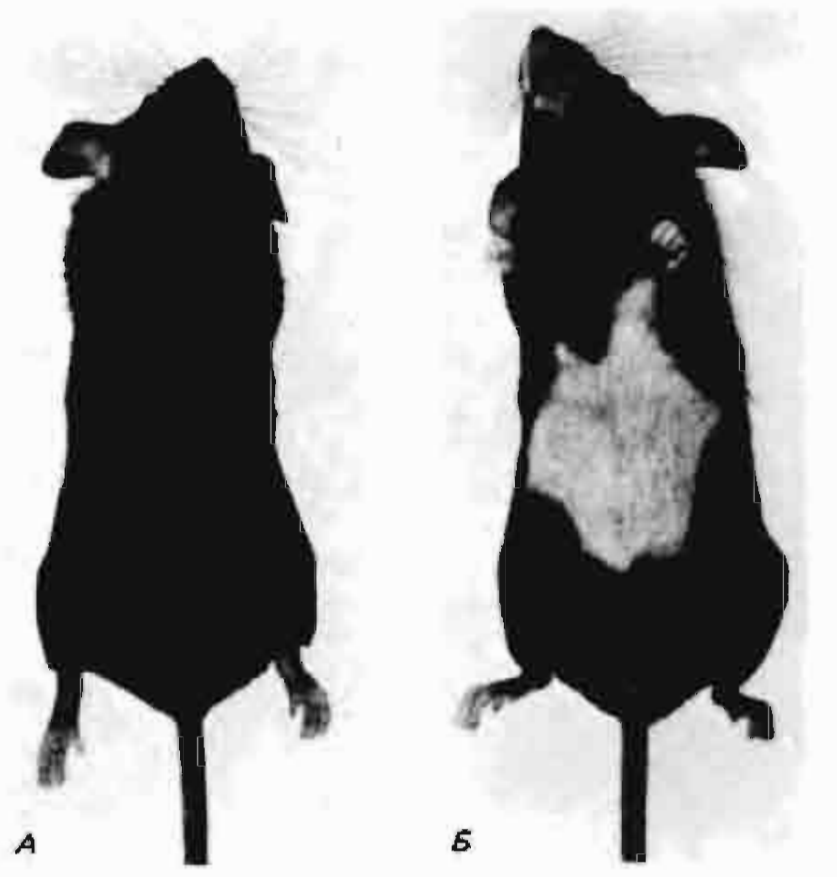


Рис. 5.34. Миграция пигментных клеток. Вид с дорсальной (*А*) и вентральной (*Б*) сторон мыши, гетерозиготной по мутации *White*. Меланобласты не мигрируют по всей поверхности тела мыши; в центре брюха сохраняется белое пятно (отсутствуют пигментные клетки). У мышей, гомозиготных по этой мутации (на рисунке они не показаны), шерсть белая, но в сетчатке можно видеть пигмент меланин. (Фотографии с любезного разрешения Джексоновской лаборатории.)

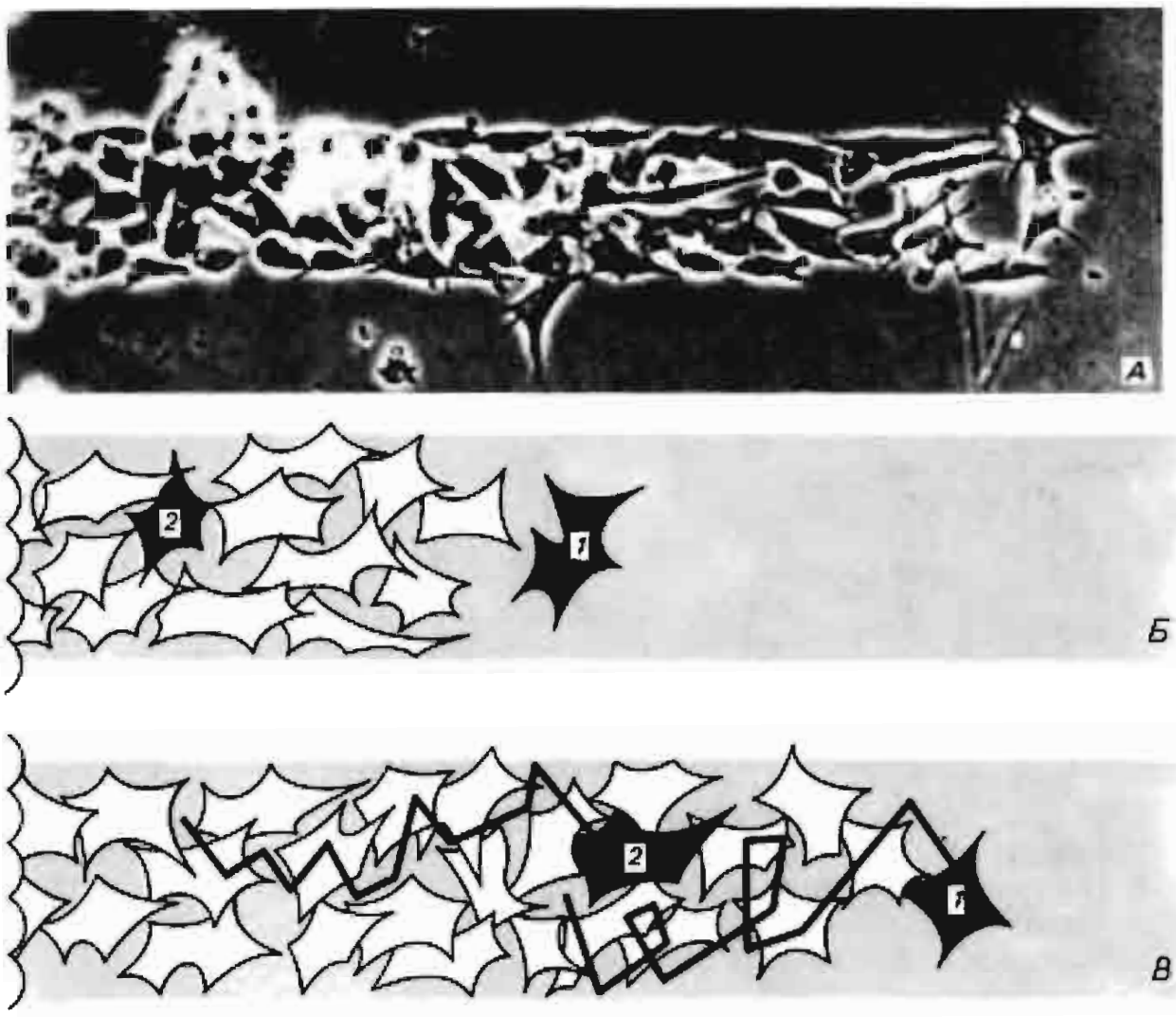


Рис. 5.35. Миграция клеток нервного гребня по фибронектиновому субстрату. Нервную трубку и связанный с ней нервный гребень удаляли у зародышей и помещали в чашки Петри на фибронектиновую подложку. *А*. Клетки нервного гребня мигрируют от фиксированного места (*слева*) по фибронектиновой подложке не случайным образом. *Б*, *В*. Треки движения клеток, выбранных для наблюдения, по полоске фибронектина. Волнообразная линия слева представляет собой нервную трубку и нервный гребень, служившие источником мигрирующих клеток. (По Rosavio et al., 1983; фотография с любезного разрешения J.-P. Thiery.)

ного матрикса (Newgreen et al., 1986). Было показано (Bronner-Fraser, 1986b), что если ранним куриным зародышам в область головы инъецировать антитела против фибронектиновых и ламининовых рецепторов клеток нервного гребня, то миграция этих клеток резко нарушается. Итак, узнавание фибронектина и ламинина играет важную, но пока еще невыясненную роль в миграции клеток нервного гребня.

Если миграция клеток нервного гребня зависит от наличия этих молекул внеклеточного матрикса, то можно ожидать, что концентрация или локализация фибронектина (или ламинина) в местах, по которым мигрируют эти клетки, различны. Было высказано предположение (Loring, Erickson, 1987), что такие различия могут быть обнаружены между передним отделом сомита (по которому мигрируют клетки нервного гребня) и его задним отделом (по которому они не мигрируют). Как мы узнаем из следующей главы, блок ткани сомита расщепляется на внутреннюю часть — склеротом, из которого образуются хрящи позвоночника, и наружную — дермамиотом, который даст начало мышцам и собственно коже, или кориуму. Лоринг и Эриксон обнаружили, что у куриного зародыша клетки нервного гребня проникают в сомит в период формирования дермамиотома. В переднем отделе сомита этот процесс происходит раньше, чем в заднем, и к тому времени, когда образуется задний отдел дермамиотома, клетки нервного гребня уже завершают свою миграцию через его передний отдел. Кроме того, мигрирующие клетки, по-видимому, прилипают к секретируемому клетками сомита внеклеточному матриксу, богатому фибронектином и ламинином (рис. 5.36).

Согласно этой модели, передний отдел сомита оказывает пермиссивное (и, возможно, директивное) влияние на миграцию клеток нервного гребня, образуя подходящий субстрат для их передвижения. Без такого субстрата миграция клеток была бы невозможна. Это предположение подтверждается данными, полученными эмбриологами более 50 лет назад. Леман (Lehmann, 1927) показал, что удаление сомита влечет за собой неспособность к образованию соответствующего чувствительного ганглия, а Детвайлер (Detwiler, 1937) обнаружил, что пересадка дополнительных сомитов зародышу какой-либо амфибии приводит к увеличению у него числа этих ганглиев. Таким образом, можно думать, что миграция клеток нервного гребня опосредована изменениями в составе белков внеклеточного матрикса, которые представляют собой их среду в зародыше.

Кроме фибронектина и ламинина, в детерминации миграционных путей клеток нервного гребня могут играть важную роль и другие вещества. Одним из таких веществ является гиалуроновая кислота. Для миграции клеток нервного гребня необходимо пространство, в котором они могут двигаться. Полагают, что гиалуроновая кислота вызывает

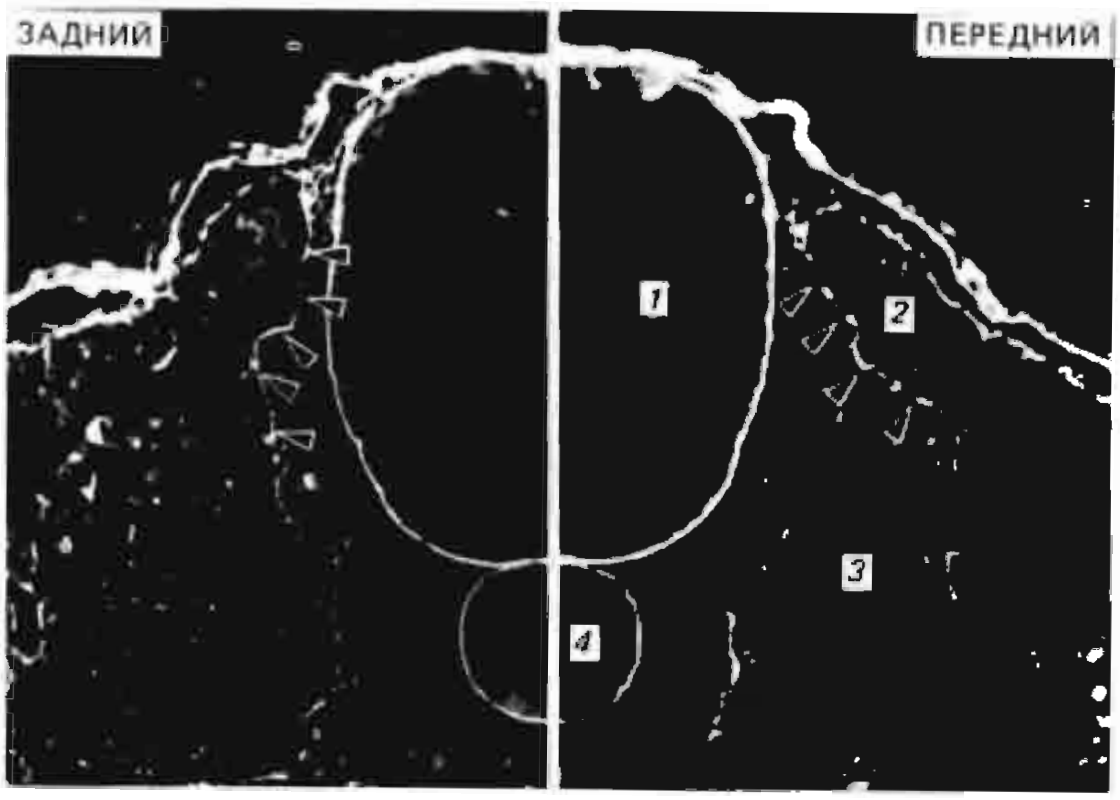


Рис. 5.36. Различия между передним и задним отделами сомита. Фотография составлена из снимков срезов через задний и передний отделы одного и того же сомита у куриного зародыша. Срезы были сделаны после того, как сомит разделился на склеротом и дермамиотом. Микроскопические препараты окрашены флуоресцирующими антителами против ламинина. Ламинин, окружающий клетки нервного гребня, указывает им путь проникновения в передний отдел сомита. В заднем отделе сомита отделение склеротома от дермамиотома еще не завершилось и ламинин не может обеспечить миграцию клеток нервного гребня в сомит. *1* — нервная трубка; *2* — дермамиотом; *3* — склеротом; *4* — хорда. (Фотография с любезного разрешения J. F. Loring.)

образование свободного от клеток пространства, в которое затем внедряются клетки нервного гребня (Pratt et al., 1975; Solursh et al., 1979). Эта модель сходна с моделью, предложенной для объяснения инвазии бластоцеля у птиц клетками-предшественниками мезодермы. И действительно, Мейер (Meier, 1981) обнаружил, что гиалуроновая кислота накапливается в некоторых областях, где происходит миграция клеток нервного гребня.

Кроме того, клетки нервного гребня сами могут изменять пути, по которым они мигрируют, делая затруднительным использование этих путей другими клетками нервного гребня. Было показано (Weston, Butler, 1966), что клетки нервного гребня, взятые от позднего зародыша и помещенные в окружение, состоящее из клеток более раннего зародыша, способны мигрировать во все области, в которые в норме должны попасть эти клетки. Однако если клетки нервного гребня от раннего зародыша помещают в окружение из клеток нервного гребня более позднего зародыша, то большинство «молодых» клеток образуют только ганглии дорсальных корешков. Это наблюдение подтверждает тот факт, что в среде, по которой должны были перемещаться эти клетки, уже произошли какие-то изменения. Эти изменения могут быть вызваны самим перемещением клеток раннего гребня; указанный путь может подвергнуться облитерации в результате дальнейшего развития сомитов.

Полипотентность клеток нервного гребня

Одним из наиболее удивительных свойств клеток нервного гребня является их **полипотентность**. Единичная клетка нервного гребня может дать начало разным клеточным типам в зависимости от места ее локализации в зародыше. Например, парасимпатические нейроны, формируемые клетками шейного отдела нервного гребня, синтезируют в качестве нейромедиатора ацетилхолин. Поэтому их называют **холинергическими нейронами**. Симпатические нейроны, образованные клетками грудного отдела нервного гребня, синтезируют норадреналин. Поэтому их называют **адренергическими нейронами**. Однако когда производят реципрокную пересадку шейного и грудного отделов нервного гребня, то клетки бывшего грудного отдела дают начало холинергическим нейронам парасимпатических ганглиев, а клетки бывшего шейного отдела — адренергическим нейронам симпатических ганглиев (LeDouarin et al., 1975). Таким образом, клетки грудного отдела нервного гребня способны развиваться в холинергические нейроны парасимпатических ганглиев, когда они помещены в область шеи, а клетки шейного отдела — в адренергические нейроны, когда их помещают в область туловища. Было обнаружено (Kahn et al., 1980), что клетки шейного и грудного отделов нервного гребня до начала их миграции содержат ферменты, необходимые для синтеза как ацетилхолина, так и норадреналина. Полипотентность некоторых участков нервного гребня такова, что клетки из участков нервного гребня, которые в нормальном зародыше никогда не образуют нервов, при определенных условиях могут быть вынуждены делать это. Клетки нервного гребня из области среднего мозга в норме мигрируют в глаз и, взаимодействуя с клетками пигментного эпителия, превращаются в склеральные хрящевые клетки (Noden, 1978). Однако если этот участок нервного гребня пересадить в область туловища, то он сформирует нейроны чув-

ствительных ганглиев, клетки мозгового вещества надпочечника (хромаффинную ткань), глию и шванновские клетки (Schweizer et al., 1983).

Выбор нейромедиаторов осуществляется, вероятно, в два этапа, которые соответствуют функциональному разделению периферической нервной системы. Первая ступень заключается в отделении клеток-предшественников вегетативной нервной системы (образующих симпатические и парасимпатические нейроны) от клеток-предшественников чувствительной (сенсорной) нервной системы, образующих спинномозговые (спинальные) и черепные (краниальные) ганглии. ЛеДуарен (LeDouarin, 1986) предположила, что каждая мигрирующая клетка нервного гребня уже стала коммитированной к развитию в клоны либо вегетативных, либо сенсорных нейронов. Среда, в которой находятся мигрирующие клетки, отбирает соответствующую популяцию, стимулируя клетки одного из этих типов к размножению. Чувствительные ганглии, например, развиваются в контакте с центральной нервной системой, которая, возможно, продуцирует факторы с малым радиусом действия, обеспечивающие селективное выживание клеток-предшественников только чувствительных нейронов. И действительно были веделены белки, обладающие такими свойствами (Le Douarin, 1986; Barde et al., 1982).

Окончательная дифференцировка клеток, синтезирующих определенные нейромедиаторы, также в значительной степени детерминируется окружением, в котором развиваются эти клетки; гибель клеток в данном случае роли не играет (Coulombe, Bronner-Fraser, 1987). Клетки сердца, например, могут секретировать фактор (или факторы), который превращает норадренергические симпатические нейроны и холинергические парасимпатические нейроны, не изменяя показателей их выживания или роста (Chun, Patterson, 1977; Fukada, 1980). Идентификация этих факторов затруднена тем, что они содержатся в очень малых количествах и их определение занимает две-три недели. Однако Фукада (Fukada, 1985) выделил из культивируемых клеток сердца гликопротеин с молекулярной массой 45 000 дальтон, который индуцировал синтез ацетилхолина в норадренергических нейронах симпатических ганглиев крысы и образование холинергических синапсов.

Было также обнаружено (Anderson, Axel, 1987), что гормональная среда может определять судьбу клеток нервного гребня. Клетки, мигрирующие в область, предназначенную стать хромаффинной тканью, могут дифференцироваться в двух направлениях. В присутствии фактора роста нервов такие клетки дифференцируются в симпатические нейроны. Однако если их подвергнуть действию гликокортикоидов, подобных тем, которые продуцируются клетками коры надпочечников, они дифференцируются в клетки мозгового вещества надпочечника (хромаффинные клетки).

Кроме периферических нейральных структур, нервный гребень продуцирует также все меланинсодержащие клетки в организме (за исключением некоторых нейральных производных, таких, как пигментный эпителий глаза). В серии классических экспериментов Роулс (Rawles) с коллегами трансплантировали нервную трубку и нервный гребень, взятые от пигментированных куриных зародышей, в нервную трубку зародышей альбиносов. В результате (см. рис. 5.31, *B*) из таких зародышей получались белые цыплята с участком окрашенных перьев. Следует отметить, что при образовании норадреналина и адреналина (симпатическими нейронами и мозговым веществом надпочечников) и меланина (меланоцитами) происходит гидроксилирование тирозина и последующее окисление этого продукта.

Из всего изложенного выше может показаться, что все клетки нервного гребня вначале идентичны по своим потенциям. Однако это наблюдается не во всех случаях. Так, например, только клетки краниального отдела нервного гребня, по-видимому, способны продуцировать хрящи головы. Клетки его грудного отдела не могут заменить их в этом отношении. Кроме того, краниальный отдел нервного гребня, будучи пересажен в область туловища, участвует в формировании хрящей тела, которые в норме из клеток нервного гребня не возникают. Итак, нервный гребень предоставляет в распоряжение специалистов по биологии развития некий набор довольно легко идентифицируемых клеток, которые могут служить модельной системой для изучения проблемы клеточной миграции и дифференцировки.

Эпидермис и его производные

Клетки, покрывающие зародыш после завершения нейруляции, представляют собой презумптивный эпидермис. Первоначально эта ткань образует слой толщиной в одну клетку, однако у большинства позвоночных она вскоре становится двухслойной структурой. Наружный слой дает начало перидерме — временному покрову, который затем будет замещен, как только лежащий под ним слой дифференцируется в истинный эпидермис. Этот внутренний слой, называемый **базальным** или **герминативным слоем** (stratum germinativum), дает начало всем клеткам эпидермиса (рис. 5.37). Сначала клетки герминативного слоя делятся, образуя другую, наружную популяцию клеток — **шиповатый слой**. Вместе эти два слоя обозначают термином **мальпигиев (ростковый) слой**. Клетки мальпигиева слоя делятся, образуя **зернистый**, или **гранулярный, слой**, названный так потому, что его клетки содержат гранулы белка ке-

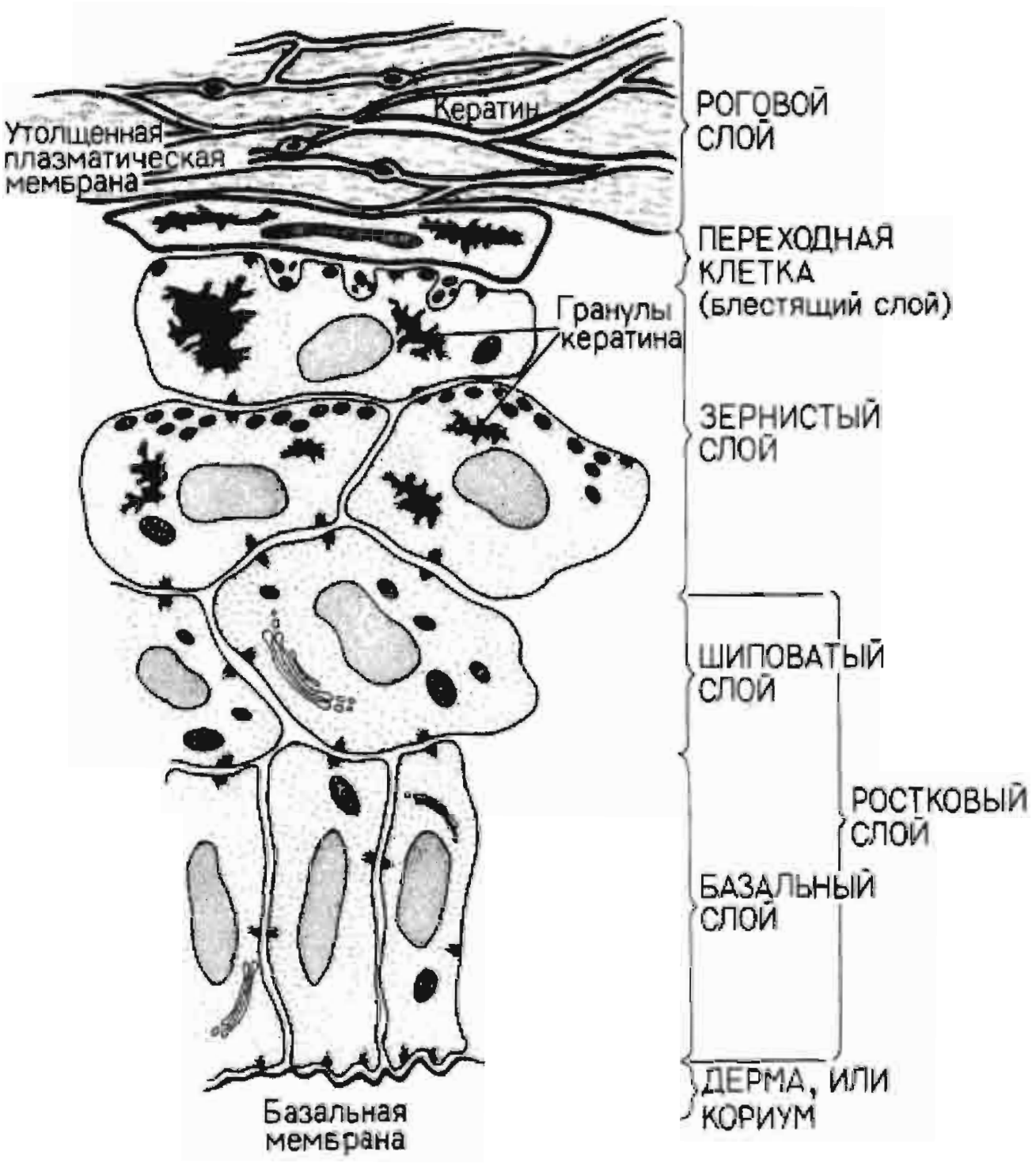


Рис. 5.37. Схематическое изображение слоев эпидермиса. Базальные клетки активно делятся, тогда как полностью кератинизированные клетки поверхностного слоя кожи мертвы и слущиваются. (По Montagna, Parakkal, 1974.)

ратина. В отличие от клеток, остающихся в мальпигиевом слое, клетки зернистого слоя не делятся. Они превращаются в **кератиноциты**. Клетки этого слоя заполняются кератином по мере того, как они стареют и мигрируют кнаружи. Здесь они формируют **роговой слой** (stratum corneum), превращаясь в плоские мешки с кератином. Ядра оттесняются к одной стороне клетки. Вскоре после рождения ребенка клетки рогового слоя слущиваются и замещаются новыми клетками, поступающими из зернистого слоя. В течение всей жизни мертвые кератинизированные клетки рогового слоя слущиваются (человек теряет примерно 1,5 грамма мертвых клеток ежедневно [1]) и замещаются новыми клетками, источником которых служат делящиеся клетки росткового слоя. Пигментные клетки нервного гребня также поселяются в мальпигиевом слое, где они передают свои пигментные мешочки (меланосомы) развивающимся кератиноцитам. Клетке, образовавшейся в мальпигиевом слое взрослого человека, требуется примерно две недели, чтобы достичь рогового слоя. У больных псориазом, характеризующимся слущиванием огромных количеств эпидермальных клеток, для этого требуется всего два дня (Weinstein, van Scott, 1965; Halprin, 1972).

Один эпидермис не образует кожи. В следующей главе будет показано, что подстилающая его мезодерма дает начало **собственно коже**, называемой также **дермой** или **корнумом**. Этот слой состоит из рыхлой соединительной ткани, заключенной в эластичный гликопротеиновый матрикс. Взаимодействуя в определенных местах, дерма и эпидермис образуют производные кожи: волосы, чешуи или перья (в

[1] Бóльшая часть этих клеток становится «домашней пылью», покрывающей мебель и полы. Если вы сомневаетесь в этом, сожгите немного такой пыли. Она будет пахнуть точно так же, как паленая кожа.



Рис. 5.38. Развитие волосяного фолликула в коже плода человека. *А*. Базальные эпидермальные клетки становятся цилиндрическими и слегка погружаются в дерму. *Б*. Эпидермальные клетки продолжают активно размножаться, а мезенхимные клетки дермы накапливаются у основания первичного зачатка волоса. *В*. Удлиняющийся зачаток волоса. Самое верхнее выпячивание развивается в апокриновую потовую железу, а центральное выпячивание — в сальную железу. Нижнее выпячивание дифференцируется в волосяную луковицу. (Фотография с любезного разрешения W. Montagna.)

зависимости от вида животного), потовые и сальные железы.

Первым указанием на то, что в данном месте будет формироваться волосяной фолликул, служит скопление клеток в базальном слое эпидермиса. Такие скопления возникают в разное время и в разных местах зародыша. Базальные клетки удлиняются и делятся, погружаясь в дерму, где образуют волосяной фолликул (рис. 5.38). На этой стадии происходит набухание эпидермиса в двух участках. Клетки верхнего участка впоследствии образуют **сальные железы**, единственным секретом которых является жировое вещество, называемое **кожным салом**. У многих млекопитающих, в том числе и у человека, жировой секрет смешивается со слущивающимися клетками перидермы, образуя беловатую массу, **vernix caseosa**, окружающую плод к моменту рождения. Набухший нижний участок превращается в **волосяную луковицу**, которую затем окружает поднимающаяся мезенхима. Герминативный эпидермис, лежащий непосредственно над этой мезенхимой, пролиферирует и образует кератинизированный волос.

Первые волосы у зародыша человека, очень тонкие и густые, называются **лануго**. Волосы этого типа обычно утрачиваются перед рождением и замещаются (по меньшей мере отчасти новыми фолликулами) короткими и шелковистыми волосами — **веллюсом** (vellus). Веллюс сохраняется на многих частях человеческого тела, обычно считающихся безволосыми, таких, как лоб и веки. В других областях тела веллюс уступает место «терминальным» (дефинитивным) волосам. В течение жизни человека некоторые из фолликулов, дающих начало веллюсу, могут вновь вернуться к его образованию. Кончики пальцев детей, например, имеют фолликулы, продуцирующие веллюс вплоть до наступления юношеского возраста. К этому времени образуются уже дефинитивные кератинизированные волосы. И напротив, при нормальном мужском облысении фолликулы в области лысины возвращаются вновь к образованию непигментированных и очень тонких волос типа веллюса (Montagna, Parakkal, 1974). Взаимодействия между дермой и эпидермисом, определяющие размещение и характерные особенности волос, перьев, чешуи, подробнее обсуждаются в гл. 16 и 17.

Из герминативных клеток эпидермиса возникают также потовые железы и являющиеся в эмбриологическом смысле слова их модификацией молочные железы. Подобно волосяным луковицам, эти железы образуются путем врастания герминативных базальных клеток эпидермиса в дерму. Взаимодействия между эпителием и мезенхимой, необходимые для развития молочных желез, рассматриваются в гл. 19.

Дополнительные сведения и гипотезы

Тератология

Развитие организма представляет собой сложное, хорошо скоординированное сочетание таких процессов, как деление клеток, их миграция, взаимодействие, генная регуляция и дифференцировка. Любое воздействие, нарушающее эти процессы, может вызвать пороки развития зародыша. Фактически примерно половина всего числа зародышей не доживает до рождения. У большинства из них аномалии обнаруживаются на очень ранних стадиях, и такие зародыши не могут имплантироваться в стенку матки. Другие зародыши имплантируются, но не могут укрепиться в стенке матки настолько, чтобы беременность стала успешной. Таким образом, наиболее аномальные зародыши спонтанно абортируются даже до того, как женщина узнает о своей беременности (Boué et al., 1985). В одной из работ (Hertig, Rock, 1949) было показано, что у 13 из 34 зародышей в возрасте от 1 до 17 сут имелись те или иные хорошо различимые аномалии. Почти 90% плодов, абортированных до месячного возраста, были аномальными (Mikamo, 1970; Miller, Poland, 1970). С помощью чувствительного иммунологического теста, который способен выявить наличие хорионического гонадотропина через 8 или 9 сут после оплодотворения, была установлена беременность у 112 нормальных женщин. У 67 из них в дальнейшем не обнаружилось никаких признаков беременности (Edmonds et al., 1982).

Из этого следует, что развитие многих зародышей человека нарушается рано и они недолго живут в матке. Дефекты легких, конечностей или рта не столь опасны для плода (который, находясь в организме матери, не зависит от этих органов), но они могут серьезно угрожать жизни ребенка после его рождения. Примерно 5% всех родившихся детей имеют явные уродства. Одни из них не опасны для жизни, а другие представляют собой тяжелые отклонения от нормы (McKeown, 1976).

Наука о врожденных аномалиях называется **тератологией**, а агенты, ответственные за их возникновение, называются **тератогенами** (создателями чудовищ, монстров). Тератогены действуют в течение определенных **критических периодов**. Для любого органа наиболее критическим периодом является время его роста и образования специфических для этого органа структур. Различные органы имеют различные критические периоды, хотя период между 15 и 60 сут беременности — критический для многих органов. Сердце формируется между 3-й и 4-й неделями, тогда как наружные половые органы наиболее чувствительны к воздействиям между 8-й и 9-й неделями. Мозг и скелет чувствительны к вредным влияниям постоянно, начиная с 3-й недели после зачатия до конца беременности и позже.

Существует много разных тератогенов. К одному из классов относятся агенты, вызывающие генные мутации. Ионизирующая радиация и некоторые лекарственные препараты вызывают разрыв хромосом и изменяют структуру ДНК. По этой причине беременным женщинам следует избегать лишних воздействий рентгеновских лучей, хотя данных о врожденных аномалиях, вызванных облучением в целях диагностики, у нас нет (Holmes, 1979). Врожденные уродства, такие, как ахондропластическая карликовость (детерминируется аутосомным доминантным геном, вызывающим развитие укороченных конечностей при нормальном туловище) или синдром Роберта (аутосомная рецессивная болезнь, при которой у ребенка наблюдаются выраженная редукция конечностей, расщепленное нёбо и сильное отставание в умственном развитии), являются примерами мутации по одному-единственному гену (наследуемой по законам Менделя). Другие врожденные заболевания обусловлены наличием лишних хромосом. К числу таких заболеваний относятся, например, синдром Дауна (наличие лишней хромосомы в 21-й паре, что вызывает умственную отсталость, пороки сердца, сохранение определенных черт, характерных для мышц плода) и синдром Клайнфельтера (наличие лишней Х-хромосомы у самца, что влечет за собой недоразвитие семенников, стерильность и небольшую задержку умственного развития).

Еще один класс тератогенов представлен вирусами. Грегг (Gregg, 1941) документально подтвердил, что у женщин, перенесших краснуху (немецкую корь) в первой трети беременности, в каждом одном из шести случаев рождались дети с катарактой, болезнями сердца и глухотой. Это были первые данные о том, что мать не полностью защищает плод от влияния внешней среды. Чем раньше вирус краснухи поражает беременную женщину, тем больше риск, что пострадает зародыш. По-видимому, первые пять недель являются критическими, потому что в это время формируются сердце, органы зрения и слуха. Эпидемия краснухи в 1963—1965 гг. вызвала гибель 20 000 плодов и рождение 30 000 детей с врожденными пороками развития. Два других вируса — цитомегаловирус и вирус простого герпеса — также являются тератогенными. Инфицирование раннего зародыша цитомегаловирусом почти всегда фатально, но заражение более поздних зародышей может

привести к слепоте, глухоте, церебральному параличу и задержке умственного развития.

Микроорганизмы редко бывают тератогенными, но два из них могут оказать вредное воздействие на человеческий зародыш. *Toxoplasma gondii* — простейшее, переносимое кроликами и кошками (и содержащееся также в их фекалиях),— может проникнуть в зародыш через плаценту и вызвать поражение мозга и глаз у плода. *Treponema pallidum* — возбудитель сифилиса — может убить ранние плоды и вызвать врожденную глухоту при воздействии на плоды старшего возраста.

Четвертый класс тератогенов представлен также некоторыми лекарственными препаратами и, кроме того, химическими соединениями, встречающимися в природе. Тератогены были обнаружены даже в нетронутых цивилизацией альпийских лугах Скалистых гор. Там растет скусовая капуста (*Veratrum californicum*), которую едят овцы. У ягнят, родившихся от овец, которые питались этим растением во время беременности, нередко обнаруживаются тяжелые неврологические нарушения развития, включая циклопию, т.е. слияние обоих глаз в один, расположенный в центральной части головы (рис. 5.39). Такое уродство встречается также у людей, свиней и многих других млекопитающих; в результате тяжелых нарушений развития мозга, например отсутствия гипофиза, организм погибает вскоре после рождения.

Хинин и алкоголь — два вещества, получаемые из растений, также вызывают врожденные уродства: хинин — глухоту, а алкоголь (при употреблении в количестве, большем 50—85 г в 1 сутки) — отставание в умственном и физическом развитии ребенка. Мы не располагаем данными о том, что никотин и кофеин вызывают врожденные аномалии, но у женщин — злостных курильщиц (20 и более сигарет в день) — часто рождаются более мелкие дети, чем у некурящих. Курение также значительно понижает количество и подвижность спермиев в семенниках мужчин, которые выкуривают по меньшей мере 4 сигареты в день (Kulikauskas et al., 1985).

Кроме того, наше индустриальное общество поставляет сотни новых искусственных веществ, которые ежегодно включаются во всеобщее потребление. Пестициды и органические вещества, содержащие ртуть, вызывают нарушения неврологического характера и аномалии в поведении у детей, матери которых во время беременности ели пищу, содержащую эти вещества. (Это доказала трагедия, случившаяся в 1965 г., когда одна из японских фирм сбросила ртуть в озеро, где она попала в рыбу, которой питались жители деревни Минамата, в том числе и беременные женщины. Врожденные уродства — поражения головного мозга и слепота у рожденных ими детей — стали известны как болезнь Минаматы.)



Рис. 5.39. Голова циклопического ягненка, родившегося у овцы, которая в начале беременности ела один из видов чемерицы — *Veratrum californicum*. Полушария головного мозга слились, и образовался только один глаз. Гипофиз отсутствует. (Из Binns et al., 1964; фотография с любезного разрешения J. F. James и USDA-ARS Poisonous Plant Laboratories.)

За последние 5 лет медики обнаружили новый тератоген — **13-цис-ретиноевую кислоту** (РК). Ретиноевые кислоты являются аналогами витамина А и могут имитировать влияние витамина на дифференцировку зачителя, но они менее токсичны, чем высокие дозы самого витамина А. Эти аналоги, в том числе и 13-*цис*-ретиноевая кислота, оказались полезными при лечении угрей и стали доступными для пациентов под названием аккутан в 1982 г. Поскольку вредное действие больших доз витамина А и его аналогов на беременных самок разных видов животных было известно с 1950-х гг. (Cohlan, 1953; Giroud, Martinet, 1959; Kochhar et al., 1984), этикетка на лекарстве предупреждала, что им не должны пользоваться беременные женщины. Однако около 160 000 женщин в детородном возрасте (от 15 до 45 лет) все же пользовались им со времени его введения в медицинскую практику, а некоторые пользовались им и во время беременности. Ламмер и его коллеги (Lammer et al., 1985) изучили группу женщин, которые по небрежности пользовались РК и тем не менее решили сохранить беременность. Из 59 плодов 26 родились без заметных дефектов, 12 были спонтанно абортированы и 21 родились с явными уродствами. Эти дети имели характерный набор аномалий — отсутствие ушей или их дефекты, отсутствие или уменьшение челюстей, расщепленное нёбо, аномальную артериальную дугу, неполноценный тимус и аномалии ЦНС.

Такой характер множественных врожденных аномалий сходен с наблюдавшимися у зародышей крыс и мышей, матери которых во время беременности

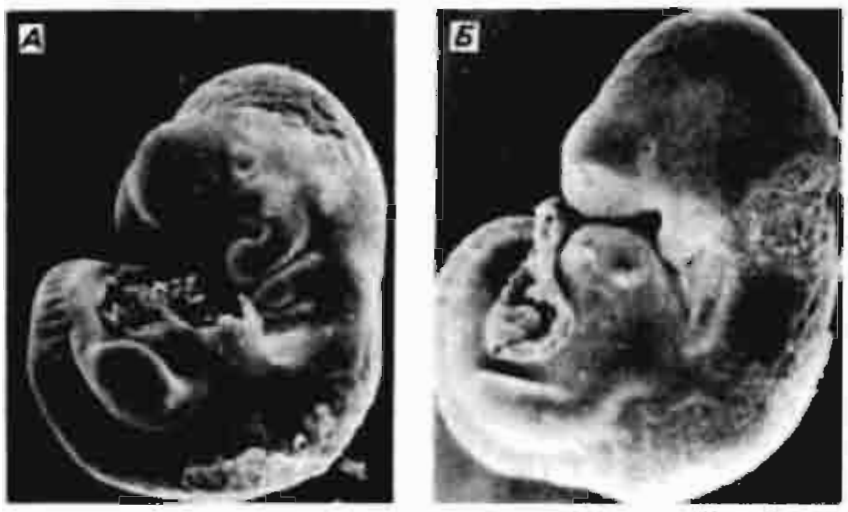


Рис. 5.40. Результаты культивирования 8-дневного зародыша мыши в течение 48 ч в контрольной среде (*А*) и в среде, содержащей $2 \cdot 10^{-6}$ М 13-*цис*-ретиноевой кислоты (*Б*). Первая жаберная дуга у зародыша, подвергавшегося воздействию этого вещества, короче и более плоская, чем у контрольного зародыша, и слилась со второй жаберной дугой. Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Goulding, Pratt, 1986; фотографии с любезного разрешения авторов.)

получали с пищей этот препарат. Следовательно, существуют модели с использованием животных, на которых мы можем изучать болезни человека. На животных можно проводить эксперименты, чтобы помочь исследователям выяснить механизмы действия тератогенов. Были поставлены опыты (Goulding, Pratt, 1986), в которых 8-дневных мышиных зародышей помещали в раствор, содержащий РК в очень низкой концентрации ($2 \cdot 10^{-6}$ М). Даже при этой концентрации примерно у $^1/_3$ зародышей развивались специфические аномалии, включая резкую редукцию размеров первой и второй жаберных дуг (рис. 5.40). Первая дуга обычно участвует в образовании верхне- и нижнечелюстной костей и двух косточек среднего уха, тогда как вторая дуга формирует третью косточку среднего уха, а также другие лицевые кости.

В основе этого явления, по-видимому, лежит тот факт, что препарат подавляет миграцию клеток из краниального отдела нервного гребня. У зародышей млекопитающих эти клетки мигрируют раньше, чем замкнется нервная трубка (Tan, Morriss-Kay, 1985); они дают начало мезенхимным клеткам скелета лица (Johnston, 1975), многие их потомки станут хрящевыми клетками. Клетки нервного гребня, мигрирующие на уровне переднего и среднего мозга, участвуют в образовании носовых отростков, нёба и мезенхимы первой жаберной дуги (рис. 5.41). Клетки нервного гребня, расположенные над передним отделом заднего мозга, образуют мезенхиму второй жаберной дуги, а клетки шейного отдела нервного гребня дают начало мезенхиме третьей, четвертой и шестой жаберных дуг. Ретиноевая кислота, меченная радиоактивными предшественниками, связывается с клетками краниальной области нервного гребня и останавливает их пролиферацию и миграцию (Johnston et al., 1985; Goulding, Pratt, 1986). Связывание с РК является, по-видимому, специфическим свойством этих клеток, а тератогенный эффект препарата приурочен к специфическому периоду развития (8—10 сут беременности у мыши, 20—35 сут — у человека). Модели тератогенеза с использованием животных оказались чрезвычайно полезными для выяснения механизмов тератогенеза на клеточном уровне. В настоящее время усилия исследователей сосредоточены на изучении молекулярных механизмов влияния этого препарата на клетки краниального отдела нервного гребня.

До 1961 г. было очень мало данных об уродствах у человека, вызванных лекарственными препаратами. Однако затем два исследователя независимо друг от друга (McBride, 1961; Lenz, 1962) собрали данные, свидетельствующие о том, что очень слабый транквилизатор **талидомид** индуцирует появление в большом числе случаев ранее очень редко встречавшегося синдрома врожденных уродств. Наиболее заметной аномалией является **фокомелия** — состояние, при котором длинные кости конечностей либо отсутствуют (амелия), либо очень резко редуцированы (меромелия), и в результате образуются конечности, напоминающие плавники тюленя (рис. 5.42). Свыше 7000 уродливых детей родилось у жен-



Рис. 5.41. Миграция клеток нервного гребня в голове зародыша крысы, у которого частично удалена латеральная эктодерма. Можно видеть мигрирующие клетки нервного гребня над средним мозгом, а также столбик клеток нервного гребня, мигрирующих в будущую первую жаберную дугу. Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Tan, Morriss-Kay, 1985; фотография с любезного разрешения S.-S. Tan.)

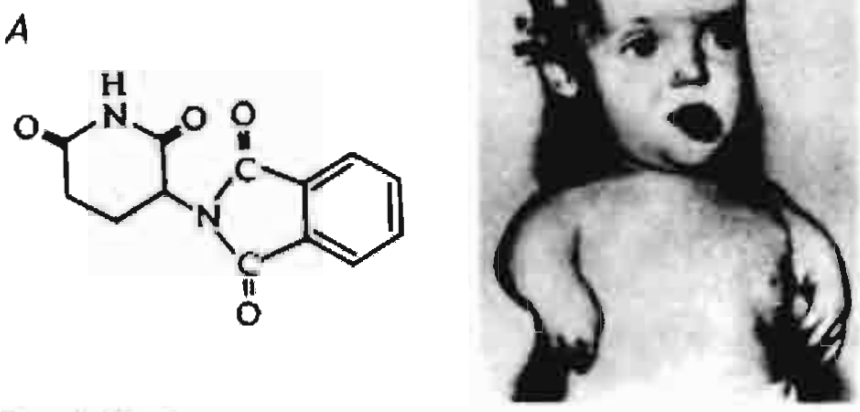


Рис. 5.42. Структура талидомида и его тератогенный эффект. *А*. Химическая структура талидомида. *Б*. Фокомелия у новорожденного младенца, мать которого принимала талидомид в течение двух первых месяцев беременности. (Фотография любезно предоставлена W. Scott.)

щин, принимавших талидомид. Достаточно было одной таблетки, чтобы родился ребенок со всеми четырьмя деформированными конечностями (Toms, 1962; Lenz, 1966). К другим аномалиям, вызванным применением талидомида, относятся различные пороки развития сердца, отсутствие ушных раковин, деформированный кишечник.

Новак (Nowack, 1965) определил **период чувствительности**, в течение которого талидомид вызывает эти аномалии. Он обнаружил, что лекарство является тератогенным только в период от 34 до 50 сут после последней менструации (примерно от 20 до 36 сут после зачатия). Специфичность действия талидомида показана на рис. 5.43. При применении между 34 и 38 сут он не индуцирует развития дефектных конечностей, но может приводить к редукции или отсутствию компонентов уха. Аномалии верхних конечностей наблюдались при более раннем приеме талидомида, чем аномалии нижних, поскольку в процессе развития руки формируются несколько раньше ног.

Трагедия с талидомидом показала, что возможности моделей с использованием животных не безграничны при определении потенциальных тератогенных воздействий тех или иных лекарственных препаратов. У различных видов животных (и разных линий одного вида) талидомид по-разному включается в обмен. Беременные мыши и крысы, обычно используемые для тестирования таких препаратов, не дали уродливого потомства при скармливании им талидомида. У кроликов родилось несколько уродливых крольчат, но дефекты развития отличались от наблюдавшихся у пораженных талидомидом человеческих детенышей. У приматов, таких, как мартышки, чувствительность к талидомиду была сходна с чувствительностью к нему человека, поэтому пораженные плоды мартышек использовали для выяснения вопроса о том, каким путем талидомид вызывает нарушения развития. Было показано (McBride, Vardy, 1983), что наиболее заметные различия до момента образования уродливых конечностей касаются размеров ганглиев дорсальных корешков и их нейронов. Число нейронов в этих ганглиях заметно редуцировано (рис. 5.44). Авторы предположили, что нейроны ганглиев спинных корешков необходимы для поддержания развития конечностей и что действие талидомида заключается в повреждении или разрушении этих ацетилхолинергических нейронов. Молекулярный механизм такого избирательного действия талидомида все еще неизвестен, но имеющаяся модель для его изучения на животных должна привести к более глубокому знанию.

В настоящее время известно свыше 50 000 искусственных химических веществ, которые находят практическое применение, и примерно от 200 до 500 новых материалов появляются каждый год (Johnson, 1980). Проблема оценки тератогенного эффекта этих веществ чрезвычайно важна, а стандартные средства для такой проверки очень дороги, процедура проверки весьма длительная, и ее результаты зависят от межвидовых различий в метаболизме животных. Пока еще нет единого мнения по вопросу о том, как следует испытывать тератогенность веществ для зародышей человека. Тератогены всегда сопровождали нас. Известно, что некоторые металлы и растительные продукты вызывают тяжелые аномалии развития. Однако, поскольку мы производим и потребляем все больше и больше разнообразных веществ, мы тем самым подвергаем наших будущих детей все большему риску.

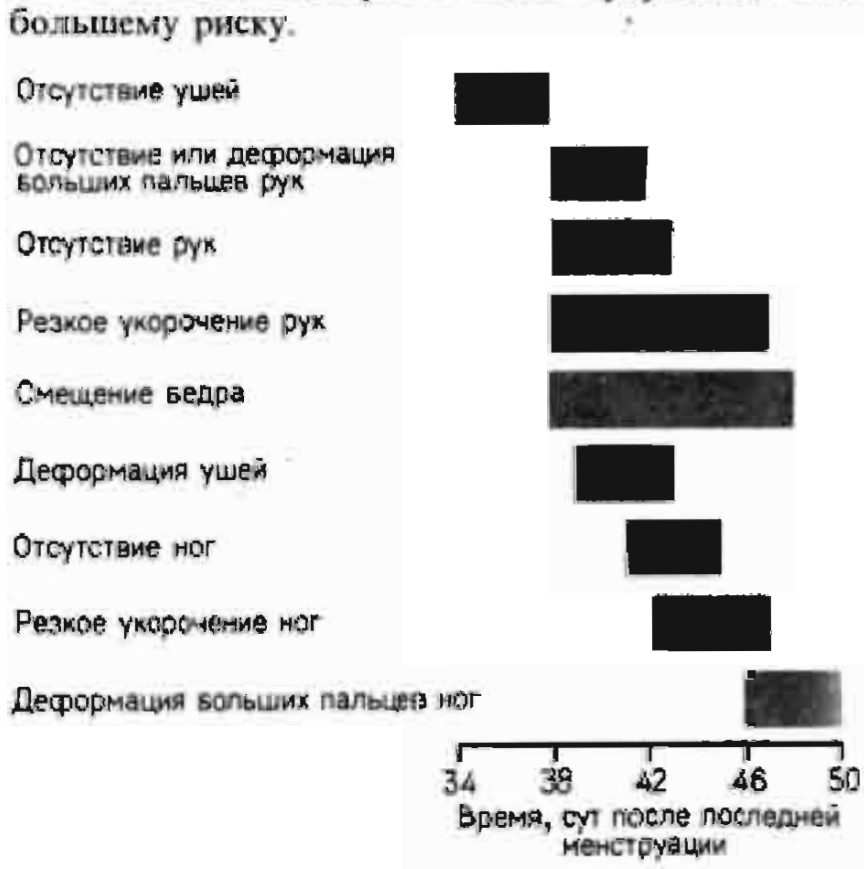
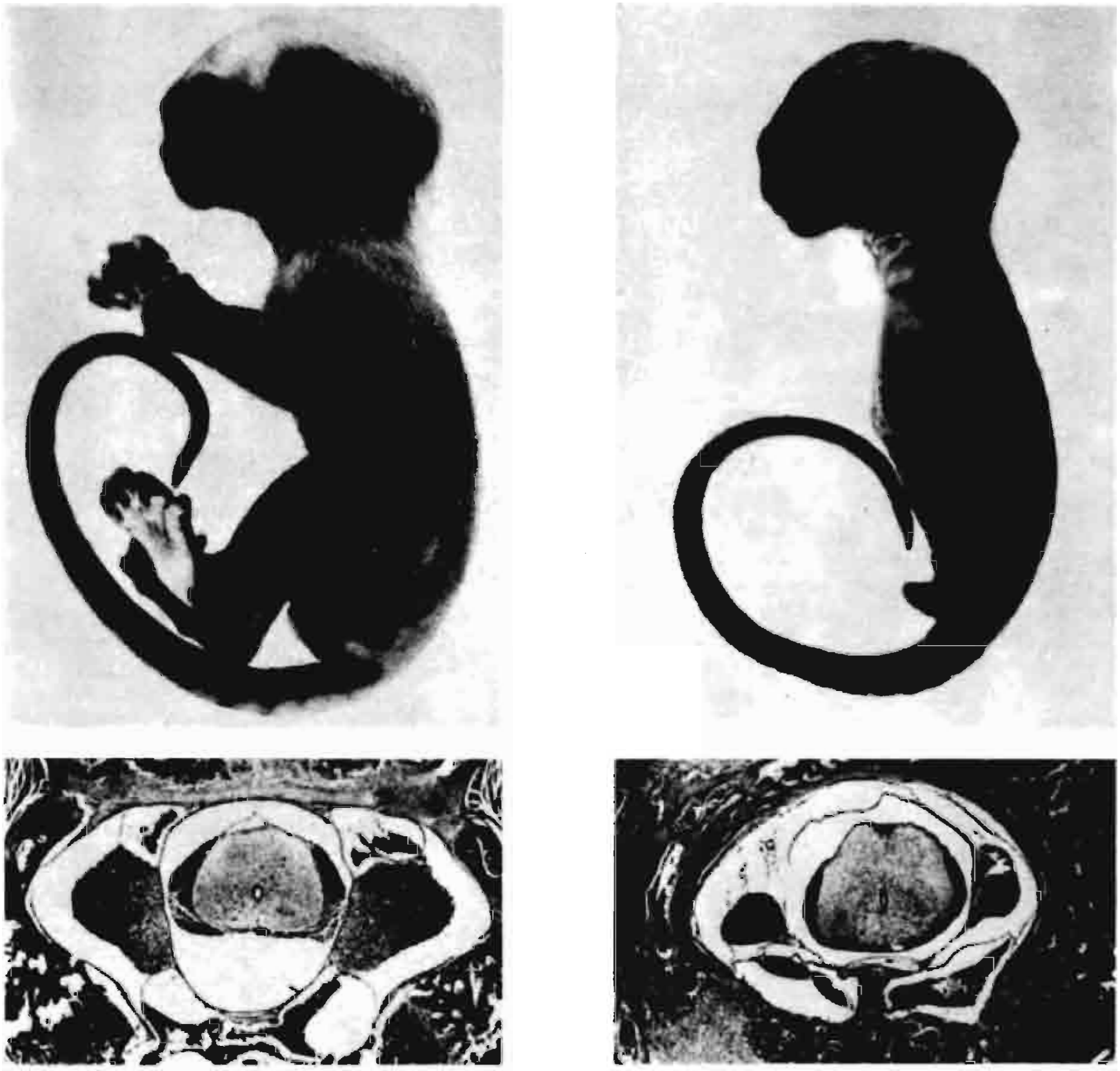


Рис. 5.43. Изменение чувствительности к тератогенному действию талидомида у раннего зародыша человека. (По Nowack, 1965.)



А *Б*

Рис. 5.44. Действие талидомида на плод мартышки. Фотографии в верхнем ряду показывают фенотип плода мартышки на поздних сроках беременности. В нижнем ряду — поперечные срезы через спинной мозг на уровне передних конечностей. *А*. Плод контрольной мартышки. *Б*. Плод мартышки, подвергшейся воздействию талидомида в дозе 25 мг/кг массы в период между 38 и 46 сут беременности. (Из McBride, Vardy, 1983; фотографии с любезного разрешения W. G. McBride.)

РЕЗЮМЕ

В этой главе мы рассмотрели дифференцировку эктодермы зародыша в процессе ее преобразования в различные ткани. Мы узнали, что в период нейруляции она дает начало трем наборам клеток: 1) клеткам нервной трубки, которые в процессе развития превращаются в нейроны, глию и эпендимные клетки центральной нервной системы; 2) клеткам нервного гребня, образующим в дальнейшем периферическую нервную систему, пигментные клетки, мозговое вещество надпочечников, некоторые хрящи головы, и 3) клеткам эпидермиса кожи, участвующим позднее в формировании кожных структур, таких,

как волосы, перья, чешуя, потовые и сальные железы. Мы также рассмотрели взаимодействия между клетками — производными эктодермы, приводящие к образованию различных тканей глаза.

В последующих главах мы более подробно обсудим индукцию нервной трубки, координированное развитие глаза и способ, которым нейроны получают указания, как достигнуть предназначенных им мест и обеспечить этим развитие рефлексов и разных типов поведения. Однако прежде следует познакомиться с развитием производных двух других зародышевых листков — энтодермы и мезодермы.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Anderson D. J., Axel R. (1987). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. Cell **47**, 1079—1090.

Balinsky B. I. (1975). Introduction to Embryology, 4th Ed. Saunders, Philadelphia.

Barde Y. A., Edgar D., Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotophic factor from mammalian brain. EMBO J. **1**, 549—553.

Berry M., McConnell P., Sievers J. (1980). Dendritic growth and the control of neuronal form. Curr. Top. Dev. Biol. **15**, 67—101.

Binns W., James L. F., Shupe J. L. (1964). Toxicosis of *Veratrum californicum* in ewes and its relationship to a congenital deformity in lambs. Ann. N. Y. Acad. Sci. **111**, 571—576.

Bloom W., Fawcett D. W. (1975). Textbook of Histology, 10th Ed. Saunders, Philadelphia.

Bockman D. E., Kirby M. L. (1984). Dependence of thymus development on derivatives of the neural crest. Science **223**, 498—500.

Boué A., Boué J., Gropp A. (1985). Cytogenetics of pregnancy wastage. Adv. Hum. Genet. **14**, 1—57.

Bronner-Fraser M. (1986a). Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1. Dev. Biol. **115**, 44—55.

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

Bronner-Fraser M., Cohen A. M. (1980). Analysis of the neural crest ventral pathway using injected tracer cells. Dev. Biol. **77**, 130—141.

Burnside B. (1971). Microtubules and microfilaments in newt neurulation. Dev. Biol. **26**, 416—441.

Burnside B. (1973). Microtubules and microfilaments in amphibian neurulation. Am. Zool. **13**, 989—1006.

Chun L. L. Y., Patterson P. H. (1977). Role of nerve growth factor in development of rat sympathetic neurons *in vitro*. Survival, growth, and differentiation of catecholamine production. J. Cell Biol. **75**, 694—704.

Cohlan S. Q. (1953). Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. Science **117**, 535—537.

Coulombe J. N., Bronner-Fraser M. (1987). Cholinergic neurones acquire adrenergic neurotransmitters when transplanted into an embryo. Nature **324**, 569—572.

Coulombre A. J. (1956). The role of intraocular pressure in the development of the chick eye. I. Control of eye size. J. Exp. Zool. **133**, 211—225.

Coulombre A. J. (1965). The eye. In: R. DeHaan and H. Ursprung (eds.), Organogenesis. Holt, Rinehart & Winston, New York, pp. 217—251.

Crelin E. S. (1974). Development of the central nervous system: A logical approach to neuroanatomy. Ciba Clin. Symp. **26(2)**, 2—32.

Desmond M. E. (1982). A description of the occlusion of the lumen of the spinal cord in early human embryos. Anat. Rec. **204**, 89—93.

Desmond M. E., Schoenwolf G. C. (1986). Evaluation of the roles of intrinsic and extrinsic factors in occlusion of the spinal neurocoel during rapid brain enlargement in the chick embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. **97**, 25—46.

Detwiler S. R. (1932). Experimental observations upon the developing retina. J. Comp. Neurol. **55**, 473—492.

Detwiler S. R. (1937). Observation upon the migration of neural crest cells and upon the development of the spinal ganglia and vertebral arches in *Ambystoma*. Am. J. Anat. **61**, 63—94.

Edmonds D. K., Lindsay K. S., Miller J. F., Williamson E., Wood P. J. (1982). Early embryonic mortality in women. Fertil. Steril. **38**, 447—453.

Erickson C. A., Tosney K. W., Weston J. A. (1980). Analysis of migrating behaviour of neural crest and fibroblastic cells in embryonic tissues. Dev. Biol. **77**, 142—156.

Fesenko E. E., Kolenikou S. S., Lyubarsky A. L. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conduction in plasma membranes of retinal rod outer segment. Nature **313**, 310—313.

Fujita S. (1964). Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. J. Comp. Neurol. **122**, 311—328.

Fujita S. (1966). Application of light and electron microscopy to the study of the cytogenesis of the forebrain. In: R. Hassler and H. Stephen (eds.), Evolution of the Forebrain. Plenum, New York, pp. 180—196.

Fukada K. (1980). Hormonal control of neurotransmitter choice in sympathetic neuron cultures. Nature **287**, 553—555.

Fukada K. (1985). Purification and partial characterization of a cholinergic neuronal differentiation factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 8795—8799.

Gallera J. (1971). Primary induction in birds. Adv. Morphog. **9**, 149—180.

Giroud A., Martinet M. (1959). Teratogenese pur hypervitaminose A chez le rat, la souris, le cobaye, et le lapin. Arch. Fr. Pediat. **16**, 971—980.

Goldowitz D., Mullen R. J. (1982). Granule cell as a site of gene action in the *weaver* mouse cerebellum: Evidence from heterozygous mutant chimera. J. Neurosci. **2**, 1474—1485.

Gould S. J. (1977). Ontogeny and Phylogeny. Havard University Press, Cambridge, Mass.

Goulding E. H., Pratt R. M. (1986). Isotretinoin teratogenecity in mouse whole embryo culture. J. Craniofac. Genet. Dev. Biol. **6**, 99—112.

Gregg N. M. (1941). Congenital cataract following German measles in the mother. Trans. Opthalmol. Soc. Aust. **3**, 35.

Halprin K. M. (1972). Epidermal "turnover time" — a reexamination. J. Invest. Dermatol. **86**, 14—19.

Harrison R. G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. Anat. Rec. **1**, 116—118.

Harrison R. G. (1910). The outgrowth of a nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. J. Exp. Zool. **9**, 787—846.

Hatten M. E., Liem R. K. H., Mason C. A. (1986). *Weaver* mouse cerebellar granule neurons fail to migrate on wild-type processes *in vitro*. J. Neurosci. **6**, 2676—2683.

Hertig A. T., Rock J. (1949). A series of potentially abortive ova recovered from fertile women prior to the first missed menstrual period. Am. J. Obstet. Gynecol. **58**, 968—993.

Hilfer S. R., Yang J.-J. W. (1980). Accumulation of CPC-precipitable material at apical cell surfaces during formation of the optic cup. Anat. Rec. **197**, 423—433.

His W. (1886). Zur Geschichte des menschlichen Rückenmarks und der Nervenwurzeln. Ges. d. Wissensch. BD 13, S. 477.

Holmes L. B. (1979). Radiation. In: V. C. Vaughan, R. J. McKay and R. D. Behrman (eds.), Nelson Textbook of Pediatrics, 11th Ed. Saunders, Philadelphia.

Holt A. B., Cheek D. B., Mellitz E. D., Hill D. E. (1975). Brain

size and the relation of the primate to the non-primate. In: D. B. Cheek (ed.), Fetal and Postnatal Cellular Growth: Hormones and Nutrition. Wiley, New York, pp. 23—44.
Huettner A. F. (1949). Fundamental of Comparative Embryology of the Vertebrates. 2nd Ed. Macmillan, New York.
Jacobson M. (1968). Cessation of DNA synthesis in retinal ganglion cells correlated with the time of specification of their central connections. Dev. Biol. **17**, 219—232.
Jacobson M. (1978). Developmental Neurobiology. Plenum, New York.
Johnson E. M. (1980). Screening for teratogenic potential: Are we asking the proper questions? Teratology **21**, 259.
Johnston M. C. (1975). The neural crest in abnormalities of the face and brain. In: D. Bergsma (ed.), Morphogenesis and Malformation of the Face and Brain. Alan R. Liss, New York, pp. 1—18.
Johnston M. C., Sulik K. K., Webster W. S., Jarvis B. L. (1985). Isotretinoin embryopathy in a mouse model: Cranial neural crest involvement. Teratology **31**, 26A.
Kahn C. R., Coyle J. T., Cohen A. M. (1980). Head and trunk neural cresfif5Aono differentiation. Dev. Biol. **77**, 340—348.
Karfunkel P. (1972). The activity of microtubules and microfilaments in neurulation in the chick. J. Exp. Zool. **181**, 289—302.
Kochhar D. M., Penner J. D., Tellone C. I. (1984). Comparative teratogenic activities of two retinoids: Effects on palate and limb development. Terat. Carcin. Mutagen **4**, 377—387.
Kulikauskas V., Blaustein A. B., Ablin R. J. (1985). Cigarette smoking and its possible effects on sperm. Fertil. Steril. **44**, 526—528.
Lammer E. J. and eleven others. (1985). Retinoic acid embryopathy. N. Engl. J. Med. **313**, 837—841.
Langman J. (1969). Medical Embryology, 3rd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
LeDouarin N. (1986). Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. Nature **231**, 1515—1522.
LeDouarin N. M., Cochard P., Vincent M., Duband J. L., Tucker G. C., Teillet M.-A., Thiery J.-P. (1984). Nuclear, cytoplasmic, and membrane markers to follow neural crest cell migration. A comparative study. In: R. L. Trelstad (ed.), The Role of the Extracellular Matrix in Development. Alan R. Liss, New York, pp. 373—398.
LeDouarin N. M., Renaud D., Teillet M.-A., LeDouarin G. H. (1975). Cholinergic differentiation of presumptive adrenergic neuroblast in interspecific chimeras after heterotopic transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 728—732.
Lehmann F. (1927). Further studies on the morphogenetic role of the somites in the development of the nervous system of amphibians. The differentiation and arrangement of the spinal ganglia in *Pleurodeles waltli*. J. Exp. Zool. **49**, 93—131.
Lenz W. (1962). Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet I: 45. (First reported at a 1961 symposium).
Lenz W. (1966). Malformation caused by drugs in pregnancy. Am. J. Dis. Child. **112**, 99—106.
Letourneau P. C. (1977). Regulation of neuronal morphogenesis by cell—substratum adhesion. Soc. Neurosci. Symp. **2**, 67—81.
Letourneau P. C. (1979). Cell substratum adhesion of neurite growth cones, and its role in neurite elongation. Exp. Cell Res. **124**, 127—138.
Loring J. F., Erickson C. A. (1987). Neural crest cell migratory pathways in the trunk of the chick embryo. Dev. Biol. **121**, 220—236.
Mann I. (1964). The Development of the Human Eye. Grune and Stratton, New York.
Mayer B. W., Jr., Hay E. D., Hynes R. O. (1981). Immunocytochemical localization of fibronectin in embryonic chick trunk and area vasculosa. Dev. Biol. **82**, 267—286.
McBride W. G. (1961). Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet ii: 1358.
McBride W. G., Vardy P. H. (1983). Pathogenesis of thalidomide teratogenesis in the marmot (*Callithrix jacchus*): Evidence suggesting a possible trophic influence of cholinergic nerves in limb morphogenesis. Dev., Growth Differ. **25**, 361—373.
McKeown T. (1976). Human malformations: An introduction. Br. Med. Bull. **32**, 1—3.
Meier S. (1981). Development of the chick embryo mesoblast: Morphogenesis of the prechordal plate and cranial segments. Dev. Biol. **83**, 49—61.
Mikamo K. (1970). Anatomical and chromosomal anomalies in spontaneous abortions. Am. J. Obstet. Gynecol. **103**, 143—154.
Miller J. R., Poland B. J. (1970). The value of human abortuses in the surveillance of developmental anomalies. Can. Med. Assoc. J. **103**, 501—502.
Montagna W., Parakkal P. F. (1974). The piliary apparatus. In: W. Montagna (ed.), The Structure and Formation of Skin. Academic, New York, pp. 172—258.
Nagele R. G., Lee H. Y. (1980). Studies on the mechanism or neurulation in the chick: Microfilament-mediated changes in cell shape during uplifting of neural folds. J. Exp. Zool. **213**, 391—398.
Newgreen D. F., Scheel M., Kaster V. (1986). Morphogenesis of sclerotome and neural crest cells in avian embryos. *In vivo* and *in vitro* studies on the role of notochordal extracellular material. Cell Tissue Res. **244**, 299—313.
Noden D. M. (1978). The control of avian cephalic neural crest cytodifferentiation. I. Skeletal and connective tissue. Dev. Biol. **69**, 296—312.
Nowack E. (1965). Die sensible Phase bei der Thalidomide-Embryopathie. Humangenetik **1**, 516—536.
Odell G. M., Oster G., Alberch P., Burnside B. (1981). The mechanical basis of morphogenesis. I. Epithelial folding and invagination. Dev. Biol. **85**, 446—462.
Papaconstantinou J. (1967). Molecular aspects of lens cell differentiation. Science **156**, 338—346.
Paton D., Craig J. A. (1974). Cataracts: Development, diagnosis, and management. Ciba Clin. Symp. **26(3)**, 2—32.
Patten B. M. (1971). Early Embryology of the Chick, 5th Ed. McGraw-Hill, New York.
Piatigorsky J. (1981). Lens differentiation in vertebrates: A review of cellular and molecular features. Differentiation **19**, 134—153.
Portmann A. (1941). Die Tragzeiten der Primaten und die Dauer der Schwangerschaft beim Menschen: Ein Problem der vergleichen Biologie. Rev. Suisse Zool. **48**, 511—518.
Portmann A. (1945). Die Ontogenese des Menschen als Problem der Evolutionsforschung. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. **125**, 44—53.
Pratt R. M., Larsen M. A., Johnston M. C. (1975). Migration of cranial neural crest cells in a cell-free, hyaluronate-rich matrix. Dev. Biol. **44**, 298—305.
Rakič P., Goldman P. S. (1982). Development and modifiability of the cerebral cortex. Neurosci. Rev. **20**, 429—611.
Rakič P., Sidman R. L. (1973). Weaver mutant mouse cerebellum: Defective neuronal migration secondary to abnormality of Bergmann glia. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 240—244.
Ramón y Cajal S. (1908). Sur l'origene et les ramifications des fibres neuveuses de la moelle embryonnaire. Anat. Anz. **5**, 111—119.
Rickman M., Fawcett J. W., Keynes R. J. (1985). The migration of neural crest cells and the growth of motor neurons through the rostral half of the chick somite. J. Embryol. Exp. Morphol. **90**, 437—455.
Romanes G. J. (1901). Darwin and After Darwin. Open Court Publishing, London.

Romer A. S. (1976). The Vertebrate Body, 5th Ed. Saunders, Philadelphia.

Rosavio R. A., Delouvee A., Yamada K. M., Timpl R., Thiery J.-P. (1983). Neural crest cell migration: Requirements for exogenous fibronectin and high cell density. J. Cell Biol. **96**, 462—473.

Sadler T. W., Burridge K., Yonker J. (1986). A potential for spectrin during neurulation. J. Embryol. Exp. Morphol. **94**, 73—82.

Sauer F. C. (1935). Mitosis in the neural tube. J. Comp. Neurol. **62**, 377—405.

Schoenwolf G. C., Desmond N. E. (1984). Descriptive studies of the occlusion and reopening of the spinal canal of the early chick embryo. Anat. Rec. **209**, 251—263.

Schweizer G., Ayer-Le Lievre C., LeDouarin N. M. (1983). Restrictions in developmental capacities in the dorsal root ganglia during the course of development. Cell Differ. **13**, 191—200.

Sidman R. L. (1974). Cell—cell recognition in the central nervous system. In: F. O. Schmitt and F. G. Worden (eds.), The Neurosciences: Third Study Program. M. I. T. Press, Cambridge, Mass., pp. 743—758.

Soleto C., Changeaux J. P. (1974). Transsynaptic degeneration "en cascade" in the cerebellar cortex of *staggerer* mutant mice. Brain Res. **67**, 519—526.

Solursh M., Fisher J., Singley C. T. (1979). The synthesis of hyaluronic acid by ectoderm during early organogenesis in the chick embryo. Differentiation **14**, 77—85.

Stryer L. (1986). Cyclic GMP cascade of vision. Annu. Rev. Neurosci. **9**, 87—119.

Tan S.-S., Morriss-Kay G. (1985). The development and distribution of the cranial neural crest in the rat embryo. Cell Tissue Res. **240**, 403—416.

Teillet M.-A., Kalcheim C., LeDouarin N. M. (1987). Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: Segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. Dev. Biol. **120**, 329—347.

Thiery J.-P., Duband J. L., Delouvee A. (1982). Pathways and mechanisms of avian trunk neural crest cell migration and localization. Dev. Biol. **93**, 324—343.

Toms D. A. (1962). Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet II, 400.

Turner D. L., Cepko C. L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. Nature **328**, 131—136.

von Baer K. E. (1828). Entwicklungsgeschichte der Thiere: Beobachtung und Reflexion. Bornträger, Konigsberg.

Warkany J. (1971). Congenital Malformations. Year Book Medical Publishers, Chicago.

Webster E. H., Silver A. F., Gonsalves N. I. (1984). The extracellular matrix between the optic vesicle and the presumptive lens during lens morphogenesis in an anopthalmic strain of mice. Dev. Biol. **103**, 142—150.

Weinstein G. D., van Scott E. J. (1965). Turnover times of normal and psoriatic epidermis. J. Invest. Dermatol. **45**, 257—262.

Weiss P. (1941). The mechanics of nerve growth. Third Growth Symposium. Growth 5 [Suppl.], 163—203.

Weston J. (1963). A radiographic analysis of the migration and localization of trunk neural crest cells in the chick. Dev. Biol. **6**, 274—310.

Weston J. (1970). The migration and differentiation of neural crest cells. Adv. Morphog. **8**, 41—114.

Weston J. A., Butler S. L. (1966). Temporal factors affecting localization of neural crest cells in the chicken embryo. Dev. Biol. **14**, 246—266.

Yamada K. M., Spooner B. S., Wessells N. K. (1971). Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. J. Cell Biol. **49**, 614—635.

Глава 6

Раннее развитие позвоночных. Производные мезодермы и энтодермы, их органо- и гистогенез

Физиологию с головы и до пят я пою.
Не только лицо человеческое и не только рассудок достойны
Музы, но все Тело еще более достойно ее,
Женское наравне с Мужским я пою[1].

УОЛТ УИТМЕН (1867)

Теории приходят и уходят. Лягушка остается.

ЖАН РОСТАН (1960)

Введение

В предыдущей главе речь шла о разных производных эктодермы. В этой главе мы рассмотрим раннее развитие производных мезодермального и энтодермального зародышевых листков. Мы увидим, что энтодерма образует выстилку органов пищеварения и дыхания, а мезодерма — ткани и органы, расположенные между эктодермальной стенкой тела и энтодермальными органами.

МЕЗОДЕРМА

В мезодерме зародыша на стадии нейрулы можно различить пять областей (рис. 6.1). Первая из них дает начало **хорде**, провизорному органу, основные функции которого состоят в индукции нервной трубки и в установлении оси тела. Вторая область — **дорсальная (паракснальная) мезодерма**. Из этой мезодермы, локализованной по обе стороны нервной трубки и хорды, будут образовываться многие ткани тела — кости, хрящ, дерма и поперечнополосатая мускулатура. Третья область — **промежуточная мезодерма** (материал сегментных ножек). Из нее формируются органы выделения и протоки половых желез. (Мы будем более подробно говорить об этой области позднее, в других главах.) На большем расстоянии от материала хорды находится четвертая область — несегментированная **мезодерма боковых пластинок**, из которой развиваются сердце, кровеносные сосуды, клетки крови, гладкая мускулатура, выстилка полости тела (целома) и все мезодермальные компоненты конечностей, кроме поперечнополосатой мускулатуры. Боковые пластинки принимают также участие в формировании внезародышевых оболочек. Наконец, пятая область мезодермы — **мезенхима головы.**

Дорсальная мезодерма: дифференцировка сомитов

Одной из главных задач гаструляции является перемещение энтодермы глубоко внутрь зародыша и мезодермальных клеток между слоями эктодермы и энтодермы. Мезодермальные и энтодермальные органы формируются не после образования нервной трубки, а одновременно с ней (рис. 6.2). У куриного зародыша мезодермальные клетки, не участвующие в формировании хорды, мигрируют латерально, образуя толстые полосы, идущие продольно вдоль каждой стороны хорды и нервной трубки. Эти полосы **дорсальной (паракснальной) мезодермы** называют у птиц **сегментной пластинкой**, а у млекопитающих — **несегментированной мезодермой.** Когда первичная полоска претерпевает регрессию, а нервные валики в центральной части зародыша начинают сближать-

[1] Перевод с англ. К. Чуковского — В кн.: Уолт Уитмен. Листья травы. — с. 37, М.: Художественная литература, 1982, с. 495.

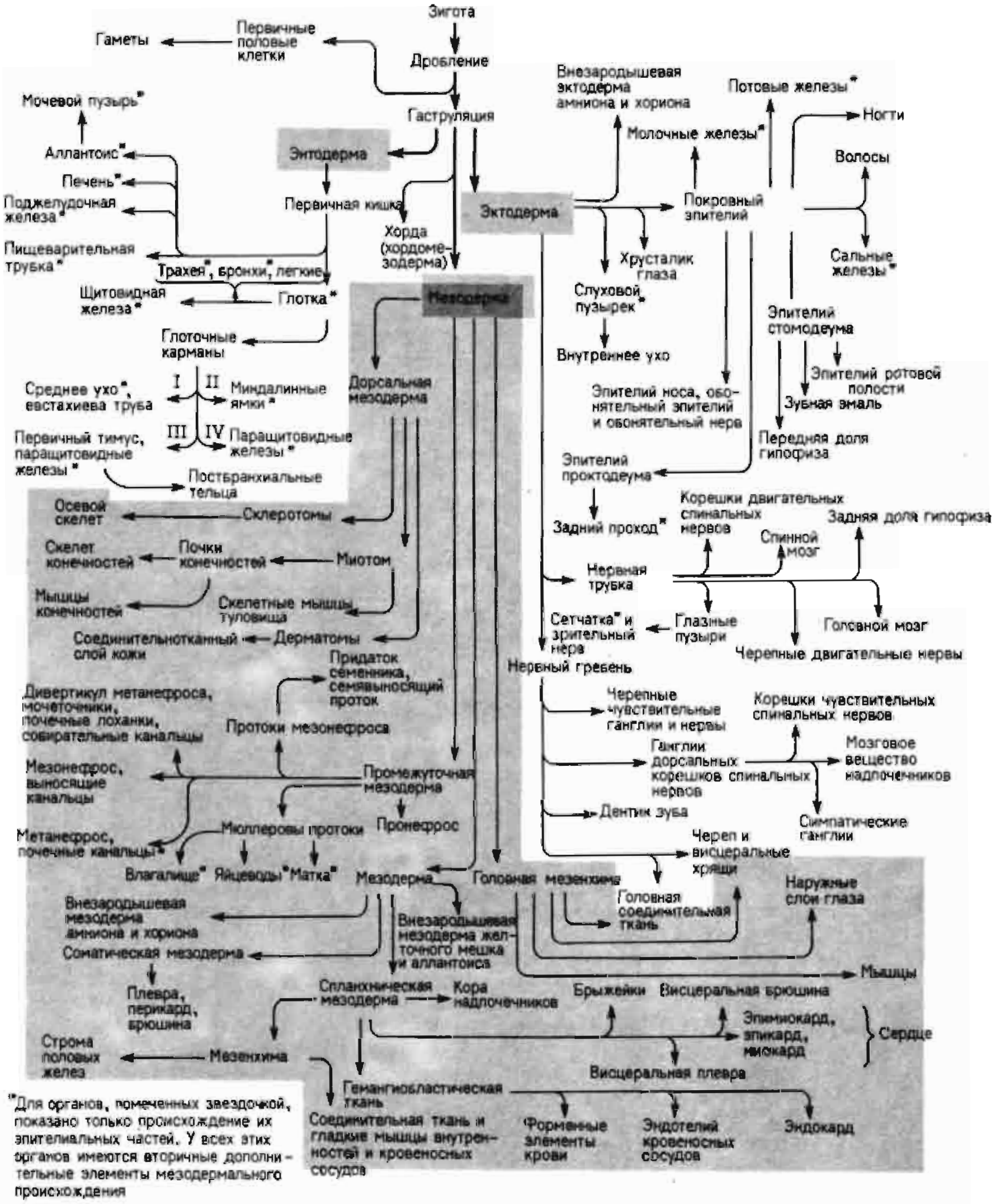


Рис. 6.1. Схема, показывающая происхождение специализированных частей тела из трех первичных зародышевых листков. Половые клетки представлены в виде линии клеток, обособленной от остальных клеток, происходящих из трех зародышевых листков; объясняется это тем, что, хотя предшественники половых клеток и локализованы в энтодерме или мезодерме, их, по-видимому, следует отнести к уникальному клеточному типу. (По Carlson, 1981).

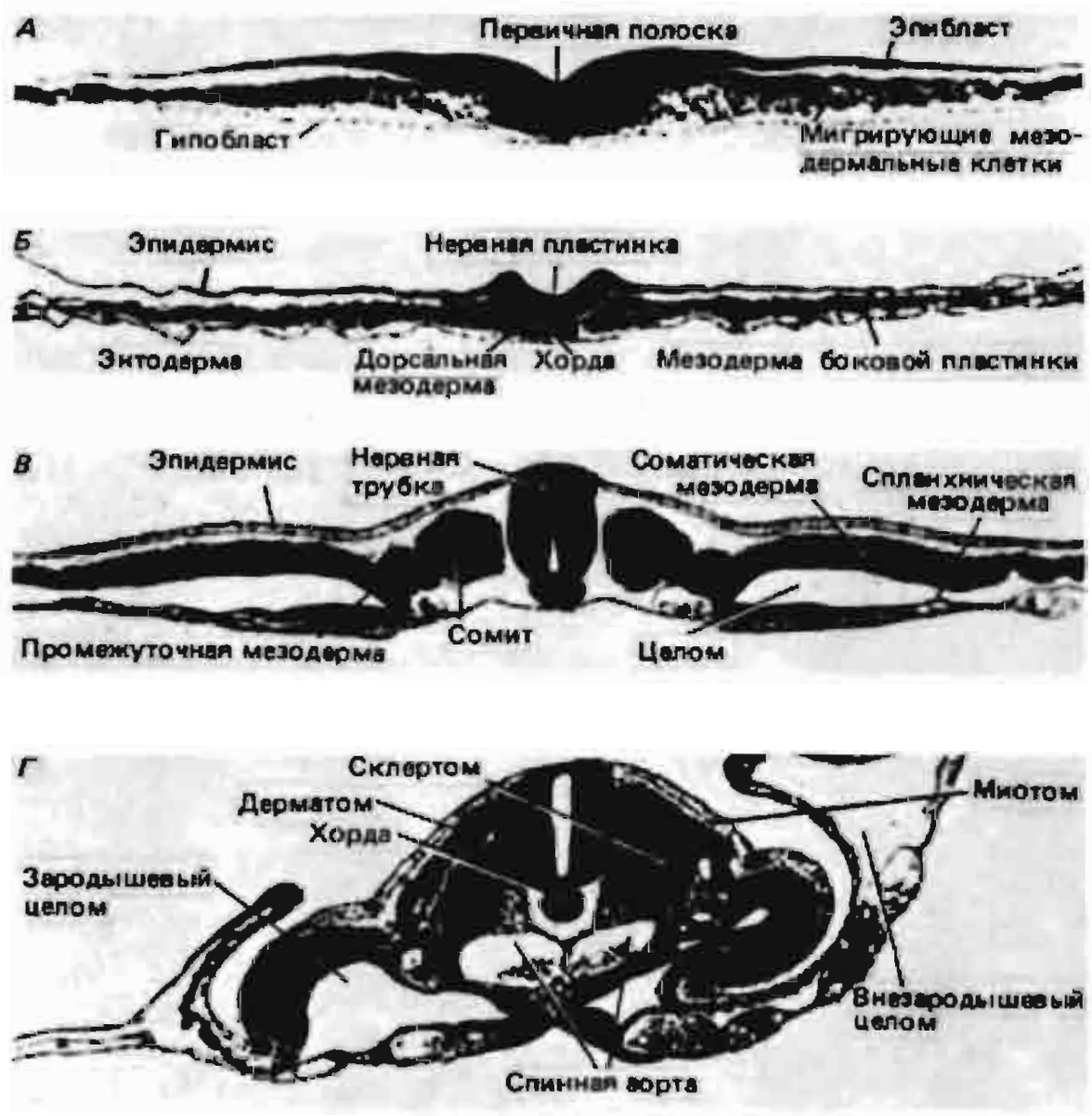


Рис. 6.2. Последовательные стадии развития куриного зародыша (основное внимание уделено мезодерме). *А*. Область первичной полоски; видна миграция клеток-предшественников мезодермы и энтодермы. *Б*. Образование хорды и дорсальной мезодермы. *В*, *Г*. Дифференцировка сомитов, целома и двух аорт (которые впоследствии сольются в одну). *А*, *Б*, *В* — 24 ч инкубации; *Г* — 48 ч инкубации.

ся, параксиальная мезодерма постепенно разделяется на треугольные блоки клеток, называемые **сомитами.** Первые сомиты появляются в переднем отделе зародыша, новые сомиты формируются позади них через равные интервалы времени (рис. 6.2, *Г* и 6.3). Поскольку при слегка различных температурах инкубации зародыши развиваются с разными скоростями, число имеющихся сомитов служит обычно наилучшим показателем того, насколько далеко продвинулось развитие. Конечное число сомитов является видоспецифичным признаком.

Механизм образования сомитов не вполне выяснен, но недавние исследования на куриных зародышах показали, что образующие их клетки сегментной пластинки организуются в виде розеток, называемых **сомитомерами** (Meier, 1979). В сегментной пластинке куриного зародыша постоянно видны от 10 до 11 пар сомитомеров, которые затем становятся сомитами (Packard, Meier, 1983). Превращение сомитомера в сомит можно наблюдать тогда, когда клетки самого переднего сомитомера становятся плотно упакованными. Было высказано предположение (Lash, Yamada, 1986), что в процессе упаковки клеток сомитомера участвует фибронектин. В основе этой гипотезы лежат два ряда данных. Во-первых (Ostrovsky et al., 1984), количество фибронектина в передней области презумптивного сомита увеличивается одновременно с началом уплотнения клеток переднего края этой ткани. Во-вторых (Lash et al., 1984; Cheney, Lash, 1984), in vitro было обнаружено, что диссоциированные клетки передних участков сегментной пластинки (которые уже имели оформленные сомиты) легко реагрегируют в скопления, по размерам равные сомитам. Диссоциированные клетки из задних участков сегментной пластинки (в которых еще не образовались сомиты) не реагрегируют с такой же легкостью. Это показывает, что мезодермальные клетки становятся более адгезивными по мере того, как они приобретают способность формировать сомиты. Клетки задних отделов можно индуцировать к образованию сомитоподобных скоплений, добавляя фибронектин к культуральной жидкости, в которой происходила их реагрегация.

По мере того как сомит становится когерентным образованием, т. е. совокупностью сцепленных друг с другом клеток, его клетки приобретают характер эпителиальных, а клетки наружного слоя соседних сомитов соединяются между собой плотными контактами. Вокруг сомита, так же как вокруг хорды и нервной трубки, образуется **базальная мембрана** (рис. 6.4; см. также рис. 5.36), состоящая из коллагена, фибронектина, ламинина и гликозаминоглика-



Рис. 6.3. Нервная трубка и сомиты (фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). Видны хорошо сформированные сомиты и дорсальная мезодерма (*внизу справа*), которая еще не разделилась на отчетливо выраженные сомиты. Можно также видеть клетки нервного гребня, мигрирующие в вентральном направлении из крыши нервной трубки. (Фотография с любезного разрешения K. W. Tosney.)

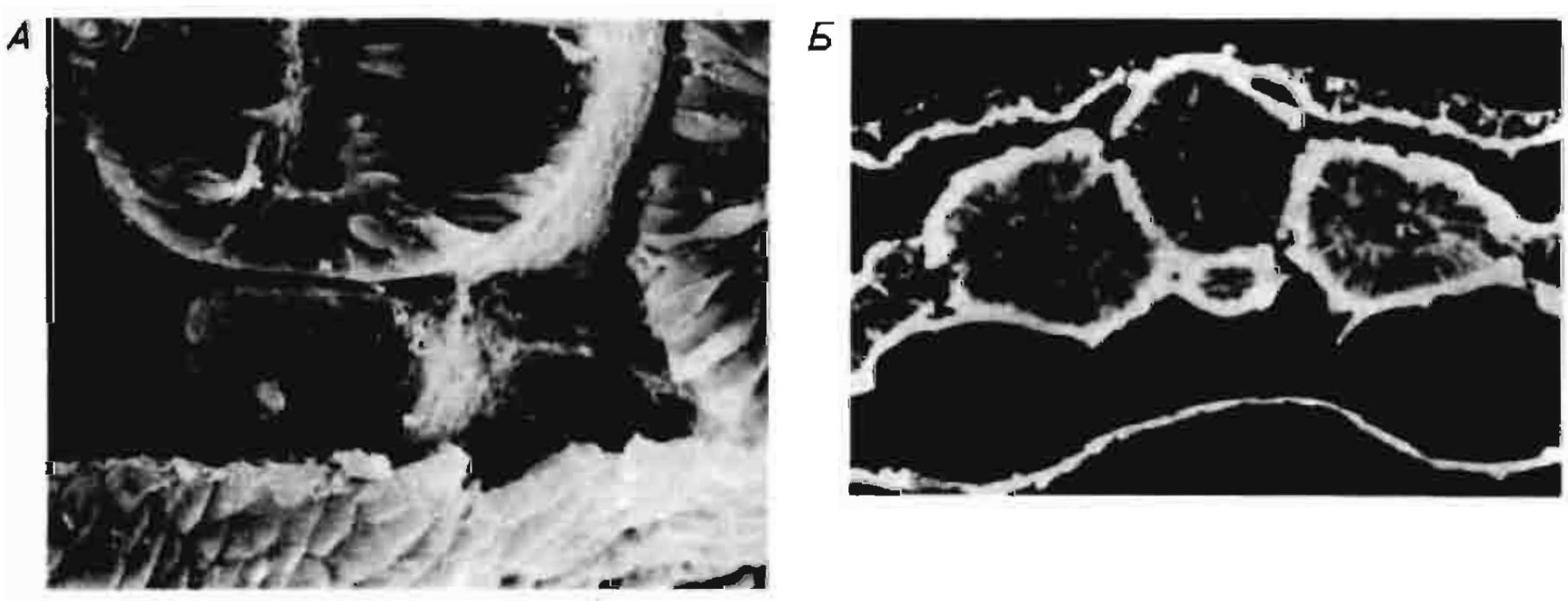


Рис. 6.4. Матрикс на поверхности сомитов и соседних тканей (фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа). *А*. Края нервной трубки, хорды и сомитов соединены внеклеточным матриксом, образованным комплексом коллагена и гликозаминогликана и имеющим важное значение для миграции клеток и для межклеточных взаимодействий между этими структурами. *Б*. Локализация фибронектина на внеклеточной (базальной) мембране сомита и прилегающих тканях у 2-дневного куриного зародыша (окрашивание флуоресцирующими антителами против фибронектина). Такие мембраны, содержащие фибронектин, обнаруживаются только после того, как клетки сомитомеров конденсируются и становятся эпителиальными клетками сомитов. (Фотографии с любезного разрешения: *А* — K. W. Tosney; *Б* — J. Lash.)

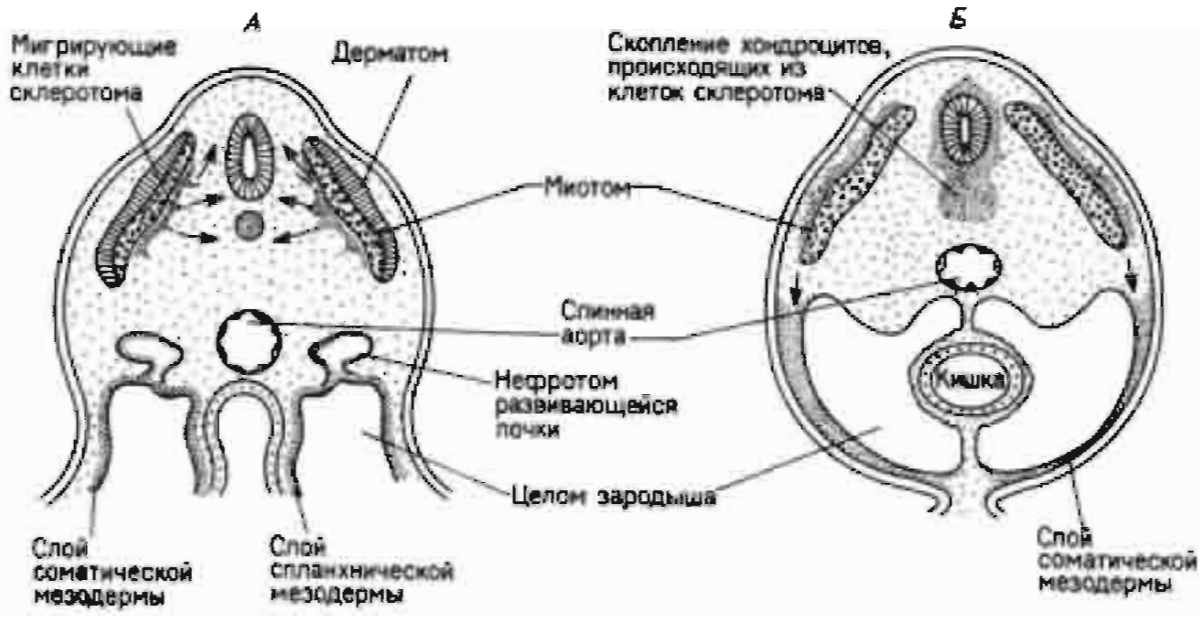


Рис. 6.5. Схематическое изображение поперечного среза через туловище зародыша человека в начале (*А*) и в конце (*Б*) четвертой недели развития. *А*. Клетки склеротома начинают мигрировать, удаляясь от миотома и дерматома. *Б*. К концу четвертой недели клетки склеротома конденсируются и образуют хрящевые позвонки, дерматом начинает формировать дерму, а клетки миотома распространяются вниз в вентральном направлении вдоль стенок тела зародыша. (По Langman, 1969.)

нов (ГАГ). По-видимому, ГАГ хорды и нервной трубки индуцируют в сомитах секрецию их собственных ГАГ. Если с помощью фермента удалить с поверхности хорды ГАГ, синтез ГАГ в сомитах прекращается до тех пор, пока на хорде заново не появится ГАГ. Под воздействием ГАГ или какого-то другого фактора, секретируемого либо хордой, либо нервной трубкой, *вентральные* клетки сомита (т. е. те, которые находятся дальше других от спинной стороны зародыша) начинают делиться митотически, теряют признаки, характерные для округлых эпителиальных клеток, и снова становятся мезенхимными клетками. Часть сомита, в которой образуются эти клетки, называют **склеротомом**; мезенхимные клетки в конечном счете становятся **хондроцитами** (рис. 6.2 и 6.5). Хондроциты ответственны за секрецию специфических типов коллагенов и гликозаминогликанов (таких, как хондроитинсульфат), характерных для хряща. Эти хондроциты участвуют в образовании осевого скелета (позвонков, ребер и т. д.).

После того как прекращается миграция клеток склеротома из сомита, оставшиеся эпителиальные клетки (совокупность которых называется **дермамиотомом**) формируют двуслойную плотную трубку (рис. 6.2 и 6.5). Наружный слой ее называется **дермотомом**; он дает начало мезенхимной соединительной ткани кожи — дерме, или кориуму. Внутренний слой называется **миотомом**; эти клетки образуют поперечнополосатые мышцы стенки тела и конечностей (Chevallier et al., 1977).

Миогенез: дифференцировка скелетной мышцы

Скелетная мышца образована пучками поперечнополосатых мышечных волокон — симпластов, развивающихся из многоядерных **мышечных трубочек.** В середине шестидесятых годов специалисты в области биологии развития дискутировали по поводу происхождения мышечных трубочек: возникают ли они в результате слияния нескольких одноядерных клеток-предшественников мышцы (**миобластов**) или образуются путем многократных делений ядра единичного миобласта, не сопровождающихся цитокинезом. Данные, полученные из двух независимых источников, показали, что мышечные трубочки формируются путем слияния миобластов.

Наиболее значительных успехов в изучении развития мышц удалось достичь после того, как было показано (Konigsberg, 1963), что миобласты могут дифференцироваться в мышечные трубочки в условиях культивирования in vitro. Культивирование in vitro позволило исследователям изучить механизм этого процесса и связать его с дифференцировкой мышечного волокна. Клетки из эмбриональных областей, содержащих миобласты, отделяли одну от другой с помощью переваривания внеклеточного матрикса трипсином. Затем их помещали в покрытые коллагеном чашки Петри, содержащие питательные вещества и сыворотку (рис. 6.6). Через 48 ч подавляющее большинство клеток представляло собой быстро делящиеся миобласты. Вскоре после этого в миобластах прекращался синтез ДНК и они сливались с соседними клетками, образуя широкие мышечные трубочки (Konigsberg, 1963), которые начинали синтезировать специфические для мышц белки. В многоядерных мышечных трубочках деления ядер и синтеза ДНК не наблюдается.

Слияние миобластов, приводящее к образованию мышечных трубочек, четко разделяется на два отдельных процесса. На первой стадии наблюдаются миграция клеток, узнавание и выстраивание их в ряд. В культуре изолированных клеток грудной мышцы 11-дневного куриного зародыша (которая еще содержала большое число одноядерных миобластов) можно было наблюдать, что эти клетки делились и мигрировали. Многие из мигрировавших клеток затем сливались и образовывали мышечные трубочки. Оказалось возможным (Nameroff, Munar, 1976) от-

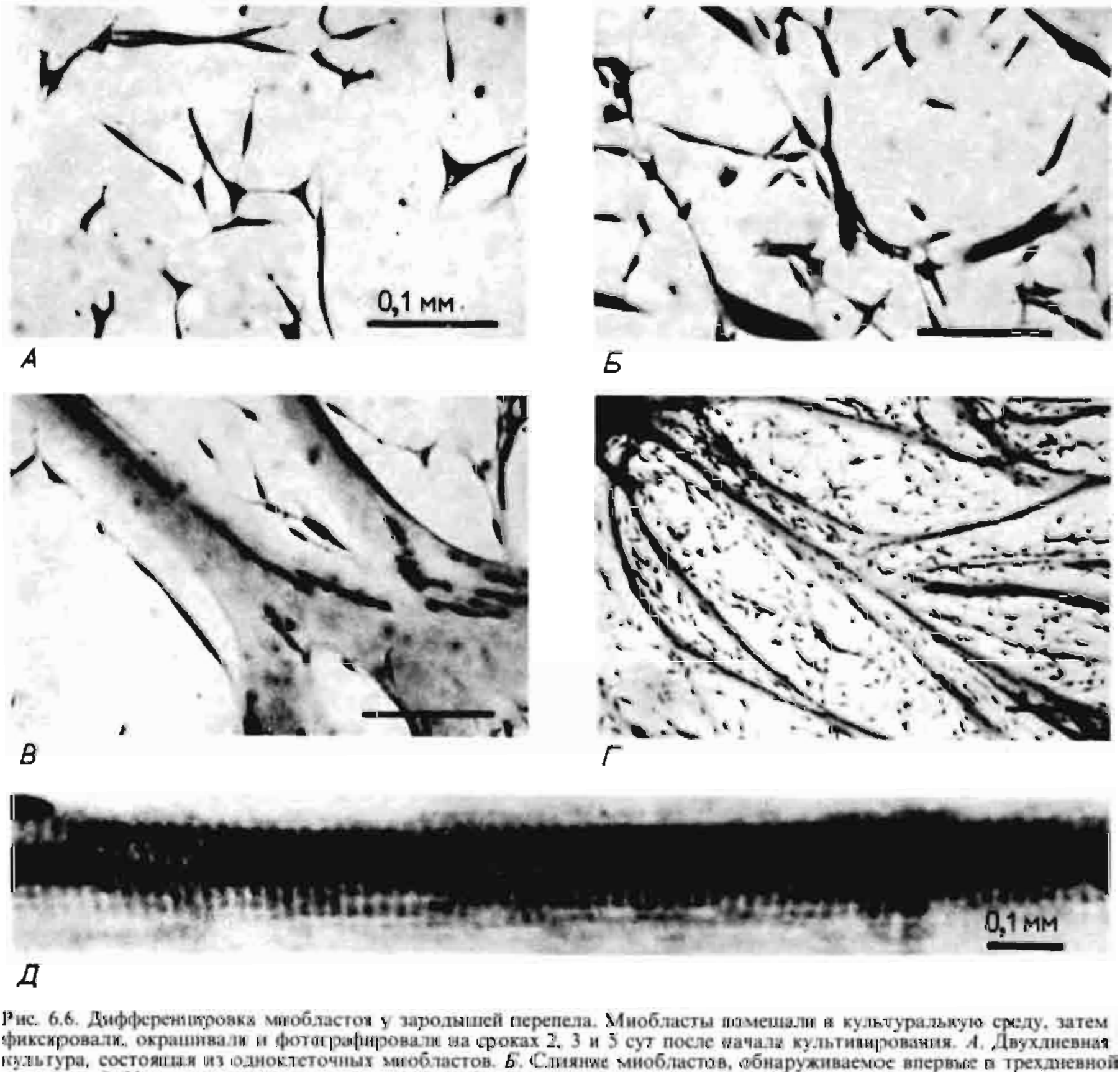


Рис. 6.6. Дифференцировка миобластов у зародышей перепела. Миобласты помещали в культуральную среду, затем фиксировали, окрашивали и фотографировали на сроках 2, 3 и 5 сут после начала культивирования. *А*. Двухдневная культура, состоящая из одноклеточных миобластов. *Б*. Слияние миобластов, обнаруживаемое впервые в трехдневной культуре. *В*. Увеличение числа ядер в многоядерных мышечных трубочках в пятидневной культуре. *Г*. Та же 5-дневная культура при малом увеличении; наблюдается интенсивное слияние клеток. *Д*. Многоядерная мышечная трубочка при большем увеличении; видна характерная поперечная исчерченность. Масштабная полоска соответствует 0,01 мм (на рис. ошибка). (Из Buckley, Konigsberg, 1974; фотографии с любезного разрешения J. M. Konigsberg.)

делить процесс узнавания (выстраивание миобластов в цепочку) от процесса слияния, обработав культивируемые клетки фосфолипазой С. Этот фермент препятствует слиянию мембран, но не действует на процесс узнавания. Поэтому в присутствии фермента клетки образовывали цепочки, но их мембраны не сливались. Эти опыты также показали, что процесс узнавания ответствен за остановку синтеза ДНК в миобласте. ^{3}H-тимидин включался в ДНК мигрирующих миобластов, но не включался в миобласты, расположенные в цепочку (рис. 6.7). Следовательно, процесс узнавания клетками приостанавливает их дальнейшее деление.

Вторая стадия миогенеза — это процесс слияния миобластов. Оба события — и узнавание, и слияние — зависят от наличия ионов кальция, но во время слияния ионы кальция должны поступать в миобласты. В соответствии с этим слияние можно активировать

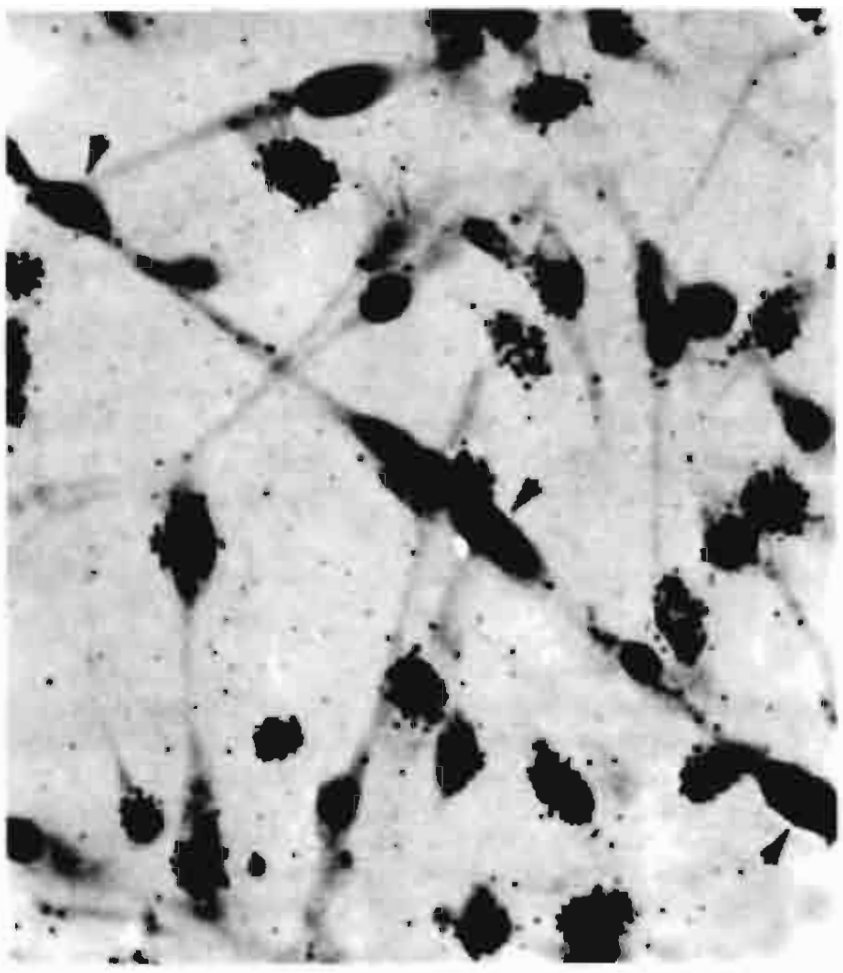


Рис. 6.7. Синтез ДНК в культуре миобластов куриного зародыша. Миобласты были обработаны фосфолипазой С, а затем подвергнуты воздействию ^{3}H-тимидина. Неприкрепившиеся миобласты продолжают делиться и поэтому включают ^{3}H-тимидин в ДНК. Включенные в ДНК меченые нуклеотиды вызывают потемнение зерен серебра в эмульсии, что можно обнаружить после проявления пленки. Выстроившиеся в одну линию (но еще не слившиеся) клетки (показаны стрелками) метку не включают. (Из Nameroff, Munar, 1976; фотографии с любезного разрешения M. Nameroff.)

ионофорами кальция, такими, как A23187, который переносит ионы кальция через клеточные мембраны (Schainberg et al., 1969; David et al., 1981). Если выстраивание миобластов в цепочку опосредовано гликопротеидами клеточной мембраны (Knudsen, 1985), то их слияние, по-видимому, регулируется интенсивной реорганизацией мембранных компонентов, приводящей к образованию участков, свободных от белков и содержащих фосфолипиды (Kaufman, Foster, 1985; Wakelam, 1985). Было показано (Kalderon, Gilula, 1979), что опосредованное кальцием слияние миобластов происходит в тех участках их мембран, которые обогащены фосфолипидами. Эта гипотеза объясняет, почему фосфолипаза С является таким мощным ингибитором слияния клеток.

Хотя узнавание клетками друг друга и их слияние — существенные черты миогенеза, видовая специфичность в этих явлениях отсутствует. Миобласты сливаются только с миобластами, и они не обязательно должны принадлежать одному и тому же виду животных. Показано (Yaffe, Feldman, 1965), что миобласты зародышей крысы и курицы легко сливаются, образуя гибридные мышечные трубочки.

Результаты исследований, проведенных на аллофенных мышах, также свидетельствуют в пользу гипотезы о слиянии миобластов. Таких мышей получают путем слияния двух ранних зародышей; у развивающихся мышей имеются две четко различимые популяции клеток (см. рис. 3.29). В одном из опытов (Mintz, Baker, 1967) объединяли зародышей двух линий мышей, у которых синтезируются разные формы фермента изоцитратдегидрогеназы. Этот фермент, обнаруженный во всех клетках, состоит из двух идентичных субъединиц. Если мышечные трубочки образуются из одной клетки, ядра которой делятся без цитокинеза, то следует ожидать появления у аллофенной мыши двух разных («родительских») форм фермента (рис. 6.8). Вместе с тем, если мышечные трубочки формируются путем слияния миобластов, то следует ожидать появления мышечных клеток, в которых экспрессируются гены не только одной из двух «родительских» изоформ фермента (AA или BB), но также и третьей изоформы, образованной субъединицами каждого из родительских типов фермента (AB). Различные формы изоцитратдегидрогеназы могут быть разделены и идентифицированы по их подвижности в электрическом поле. Результаты опыта ясно показали наличие гибридного фермента в экстрактах из скелетных мышц, хотя в экстрактах из всех других тканей был обнаружен фермент только двух родительских типов. Следовательно, мышечные трубочки действительно формируются путем слияния многочисленных миобластов.

Все исследователи считают слияние миобластов и синтез специфических мышечных белков независимыми друг от друга явлениями, хотя и происходящими обычно одновременно. Как только миобласты выстраиваются в цепочку и прекращают делиться, они начинают синтезировать тропомиозин, тяжелую цепь миозина и специфичные для мышц изоформы актина и креатинкиназы. Креатинкиназа представляет собой димерный белок. До слияния миобластов в них синтезируется креатинкиназа, состоящая только из субъединиц B (димер BB). К моменту слияния в культуре они начинают синтезировать другую специфичную для мышц форму фермента (M), создавая димеры MM (рис. 6.9, *А*). Слияние миобластов можно стимулировать, заменив среду, поддерживающую пролиферацию, средой, в которой отсутствуют определенные факторы роста. В лимитированной среде миобласты прекращают делиться и в течение короткого периода времени сливаются. Эта методика была использована (Devlin, Emerson, 1978) для синхронизации слияния клеток и изучения синтеза миозина, актина и тропомиозина (рис. 6.9, *Б*). В начале культивирования ни одного из белков обнаружить не удается. Однако ко времени слияния миобластов эти структурные белки очень быстро выяв-

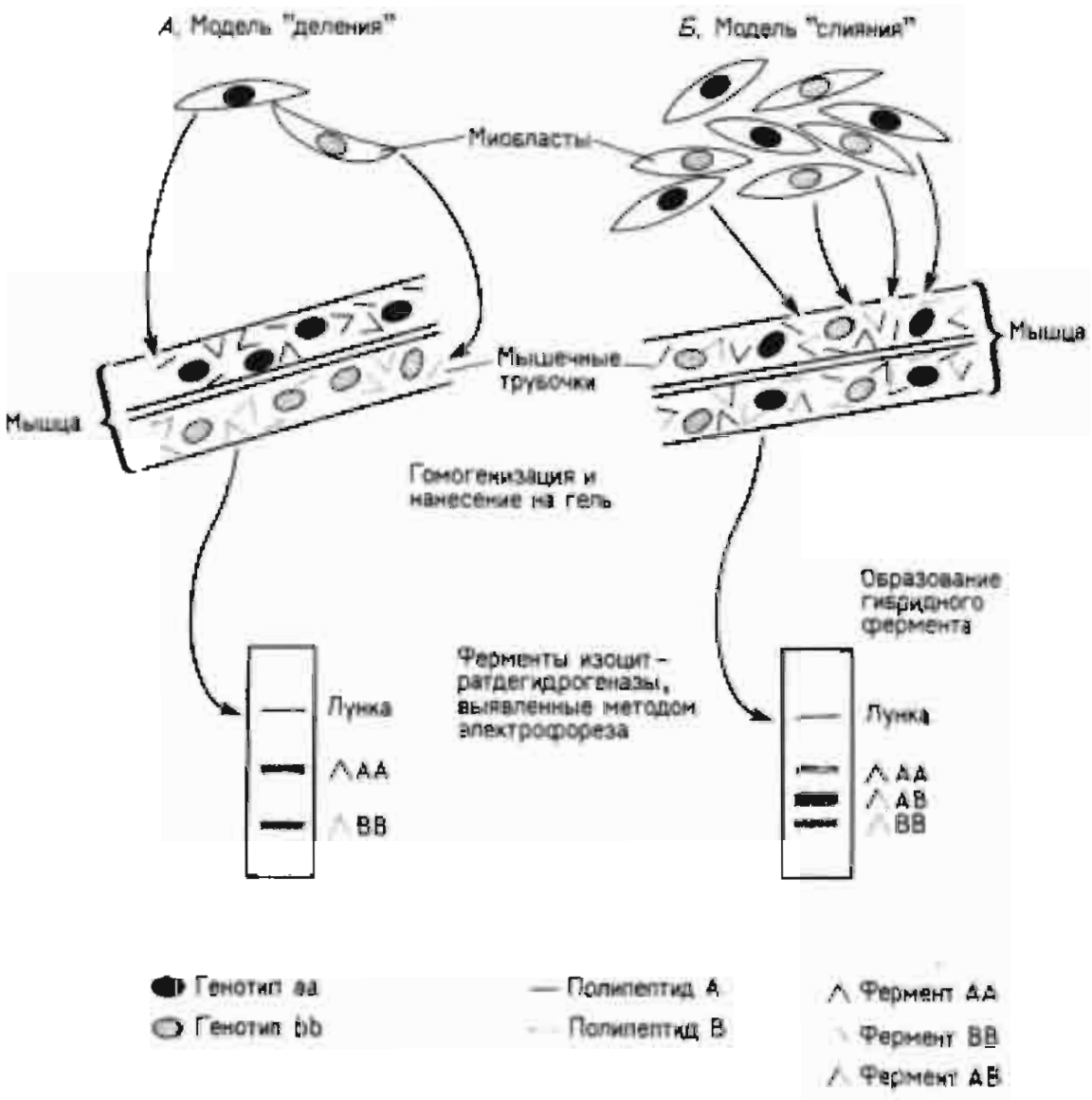


Рис. 6.8. Схема, иллюстрирующая два возможных механизма формирования скелетных мышц и способ выбора между ними. Аллофенных мышей получают путем слияния мышиных зародышей разных линий; клетки каждой из двух линий можно различить по наличию разных форм фермента изоцитратдегидрогеназы. Этот фермент состоит из двух субъединиц; одна линия мышей продуцирует А-субъединицы изоцитратдегидрогеназы, другая — В-субъединицы. *А*. Если ферменты синтезируются одной клеткой или в многоядерных клетках, образовавшихся путем деления ядер в одной клетке, то изоформы фермента будут либо АА, либо ВВ. *Б*. Если в одной и той же клетке имеются два разных ядра, то одно из них может кодировать субъединицу В, тогда как другое — субъединицу А, и в результате некоторые молекулы фермента будут гибридными (АВ). Эти три типа молекул разделяют методом электрофореза. Присутствие молекулы АВ только в клетках скелетных мышц (но не в других типах клеток) подтверждает правильность модели слияния. (По Mintz, Baker, 1967.)

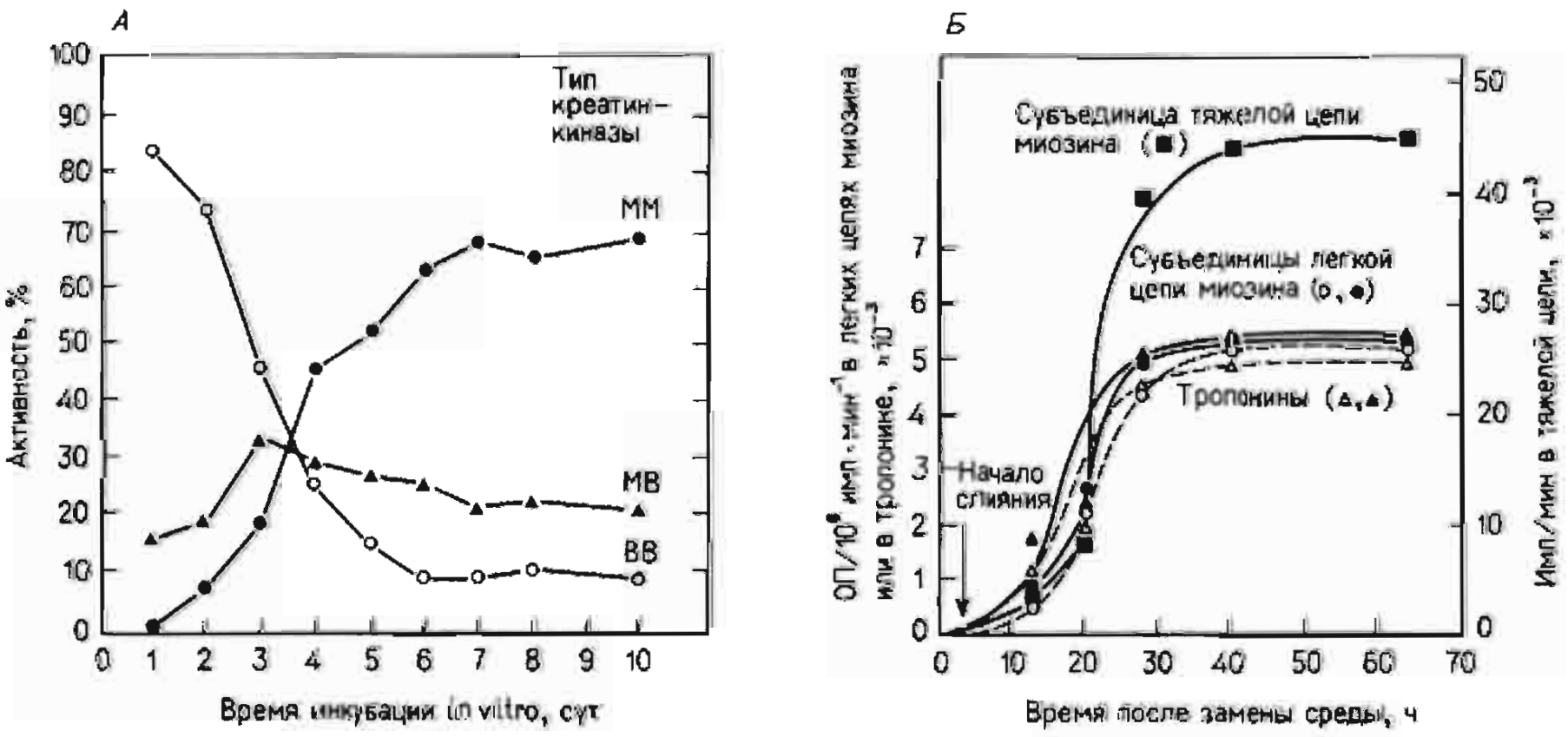


Рис. 6.9. Синтез новых ферментов, сопутствующий слиянию миобластов. *А*. Уменьшение активности субъединиц немышечной креатинкиназы (В-типа), сопровождающееся замещением их субъединицами специфичной для мышц креатинкиназы (М-типа) по мере слияния миобластов куриного зародыша, культивируемых in vitro. Слияние начинается после первых суток культивирования, и на вторые сутки культивирования в мышечных трубочках обнаруживается 38% ядер. *Б*. Синтез специфичных для мышц сократительных белков после перенесения делящихся миобластов в среду, способствующую их слиянию. Культуры метили ^{35}S-метионином, который включается в белки, а затем через определенные сроки выявляли синтез разных белков (*А* — по Lough, Bischoff, 1977; *Б* — по Devlin, Emerson, 1978.)

ляются. Показано (Sutherland, Konigsberg, 1983), что, когда прекращается синтез ДНК, синтез специфичных для мышц белков увеличивается как обычно, даже в том случае, если слияние миобластов подавлено понижением концентрации кальция в среде. Отсюда можно заключить, что, как только клетки прекращают делиться, они приобретают способность и к слиянию, и к синтезу специфичных мышечных белков.

Общепризнано, что огромное увеличение синтеза таких белков происходит к моменту слияния миобластов, однако остается неясным, на каком уровне осуществляется контроль этих процессов — на транскрипционном, трансляционном или на том и другом вместе. Некоторые исследователи (см. гл. 14) сообщили, что в миобластах до их слияния обнаруживаются мРНК, специфичные для мышечных белков. Если это так, то акт слияния должен действовать как сигнал для начала *трансляции* этих уже имеющихся мРНК. Другие исследователи (Devlin, Emerson, 1979; Daubas et al., 1981) не смогли обнаружить в делящихся миобластах мРНК для сократительных белков. Эти исследователи полагают, что синтез таких белков происходит на новообразованных мРНК. В любом случае слияние миобластов и накопление специфичных мышечных белков, по-видимому, координируется прекращением синтеза ДНК в пролиферирующих миобластах.

Остеогенез: развитие кости

Кости — наиболее четко выраженные производные соматической мезодермы. В этой главе будут рассмотрены только самые общие механизмы формирования костей. Студенты, желающие получить более подробные сведения, могут обратиться к учебникам по гистологии, где этой теме посвящены целые главы. Существуют два способа формирования костей (**остеогенеза**), и оба включают в себя трансформацию предсуществующей соединительной ткани в костную ткань. Превращение малодифференцированной соединительной ткани в костную называется **интрамембранным окостенением**, а замещение хряща костью — **эндохондральным окостенением**. Образование плоских костей, например костей черепа, осуществляется посредством интрамембранного окостенения. Рыхло расположенные мезенхимные клетки пролиферируют и образуют плотные скопления. Некоторые из этих клеток дают начало капиллярам, а другие изменяют свою форму и становятся **остеобластами** — клетками, способными секретировать костный матрикс. Синтезируемый ими коллаген-гликозаминогликановый матрикс обладает способностью связывать соли кальция, приносимые капиллярами в область окостенения. Таким образом, матрикс становится кальцифицированным (обызвествленным). В большинстве случаев остеобласты отделяются от области обызвествления слоем предкостного (остеоидного) матрикса, который они секретируют. Однако время от времени остеобласты захватываются костным матриксом, и тогда они становятся **остеоцитами** — костными клетками. По мере обызвествления костные спикулы распространяются радиально от центра, где началось окостенение (рис. 6.10). Кроме того, целая область обызвествленных спикул окружается плотно лежащими над ней мезенхимными клетками, формирующими **периост**, или **надкостницу**. Клетки на внутренней поверхности надкостницы также становятся остеобластами и секретируют костный матрикс параллельно с матриксом уже образовавшихся спикул. Таким образом формируется много слоев кости.

Эндохондральное окостенение заключается в замещении хрящевой ткани костной. В данном случае хрящ служит моделью для последующего формирования кости. Сначала образуется хрящевой зачаток

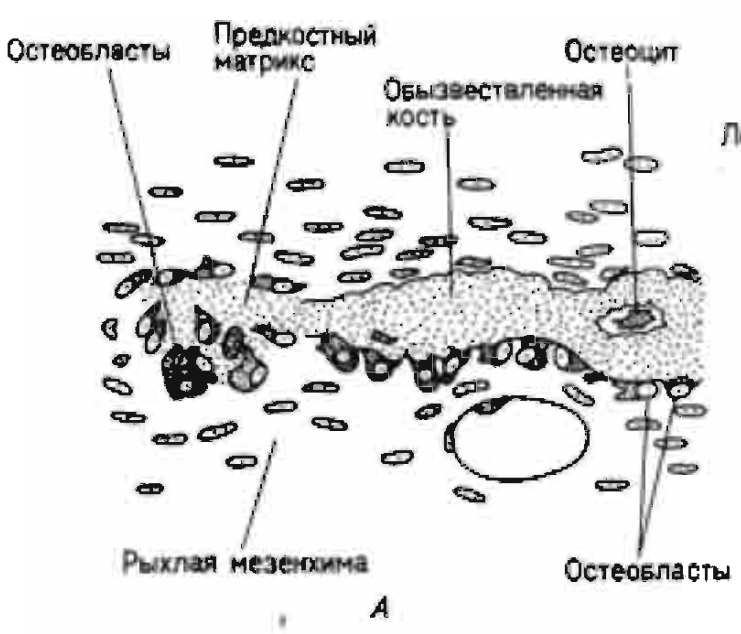


Рис. 6.10. Схема, иллюстрирующая внутримембранное окостенение. *А*. В скоплениях мезенхимы образуются остеобласты, которые секретируют костеподобный (предкостный) матрикс. Эти остеобласты располагаются вдоль обызвествленного участка матрикса. Остеобласты, попавшие внутрь костного матрикса, становятся остеоцитами. *Б*. Распространение костных спикул от места первичного окостенения в костях черепа трехмесячного зародыша человека. Кости, образующиеся путем эндохондрального окостенения, обозначены черным цветом. (По Langman, 1969.)

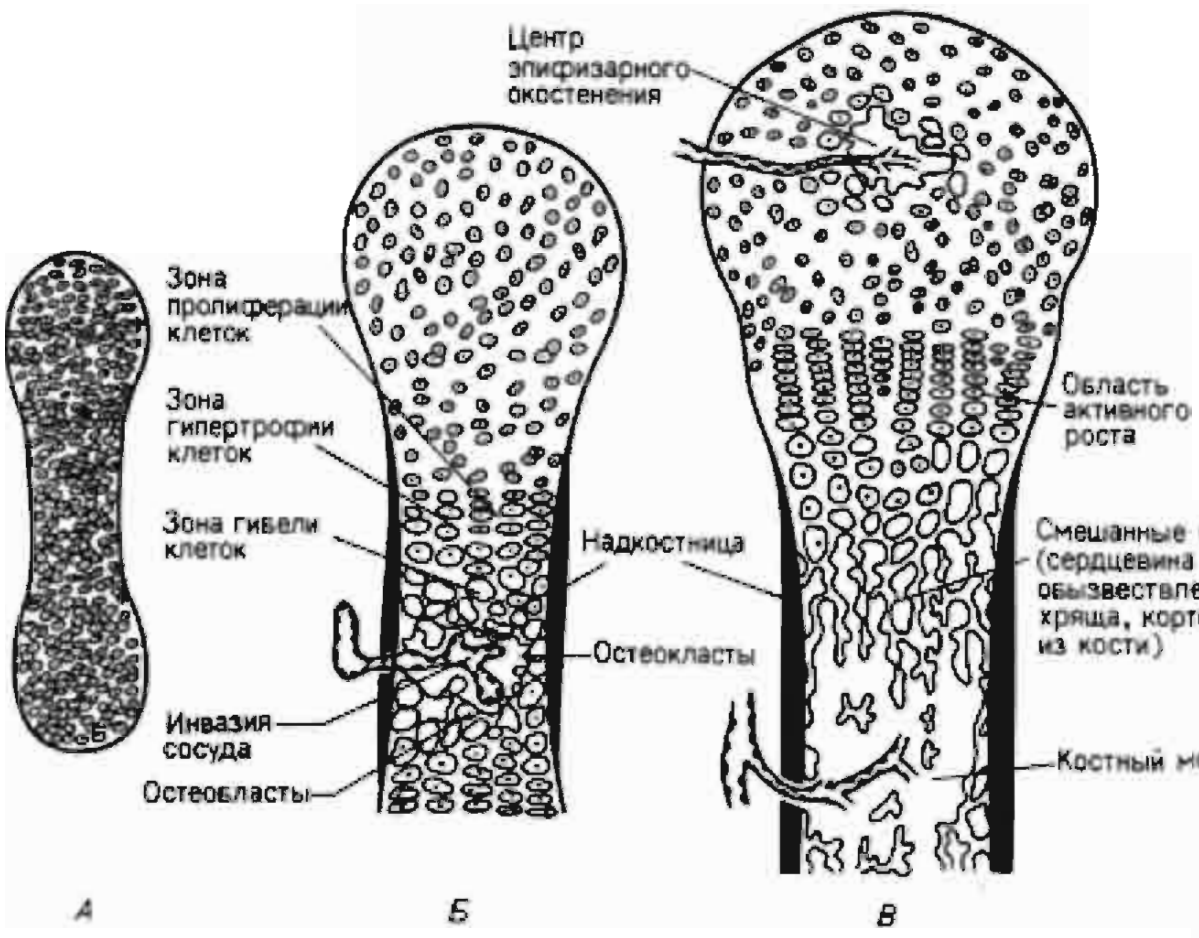


Рис. 6.11. Схема, иллюстрирующая эндохондральное (внутрихрящевое) окостенение. *А*. Хрящевая «модель» кости. *Б*. Инвазия кровеносного сосуда в центр хрящевого диафиза, приводящая к образованию зон клеточной пролиферации, гипертрофии клеток и клеточной гибели. *В*. Формирование костного мозга в диафизе и центра вторичного окостенения в эпифизе. (По Langman, 1969.)

будущих костей позвоночного столба, таза и конечностей, а позже хрящ замещается костной тканью. Этот замечательный процесс координирует хондрогенез (образование хряща) с остеогенезом (ростом кости), в течение которого скелетные элементы одновременно испытывают нагрузку, растут в ширину и отвечают на локальные стрессы. Одна из гипотез, предложенная для объяснения механизма этой координации, постулирует сдвиг в функции митохондрий, вызываемый изменением количества кислорода и питательных веществ, доступных клеткам. У зародыша человека в возрасте 7 нед «длинные кости» образованы только хрящем, окруженным оболочкой из плотной мезенхимы. Эта оболочка становится надкостницей (рис. 6.11). Затем капилляры из надкостницы проникают в центр хрящевого зачатка, ранее лишенного кровеносных сосудов. Хрящ реагирует на это формированием зон интенсивной клеточной пролиферации, гипертрофии клеток (увеличения их размеров) и клеточной гибели.

Если клетка находится в зоне пролиферации, то она лежит вблизи несущего кислород кровеносного сосуда и хорошо снабжается гликогеном — источником энергии. Митохондрии этих делящихся клеток синтезируют АТФ, необходимый для митоза. Однако в зоне гипертрофии снабжение клеток кислородом ухудшается. Согласно этой теории, дыхание клеток в зоне гипертрофии становится анаэробным, и митохондрии переключаются с образования АТФ на накопление кальция (Brighton, Hunt, 1974; Brighton, 1984). В анаэробном участке зоны гипертрофии снабжение клеток гликогеном полностью прекра-



Рис. 6.12. Отложение кальция хондроцитами в дистальной области зоны гипертрофии клеток. Кальций (окрашенный в черный цвет на смонтированной электронной микрофотографии) откладывается во внеклеточном матриксе крупными хондроцитами. (Из Brighton, Hunt, 1974; фотография с любезного разрешения С. Т. Brighton.)



Рис. 6.13. Минерализация скелета у 17-дневных куриных зародышей: нормальных (*справа*) и культивировавшихся без скорлупы (*слева*). Зародышей фиксировали и окрашивали ализарином красным для выявления обызвествленного матрикса. (Из Tuan, Lynch, 1983; фотография с любезного разрешения R. Tuan.)

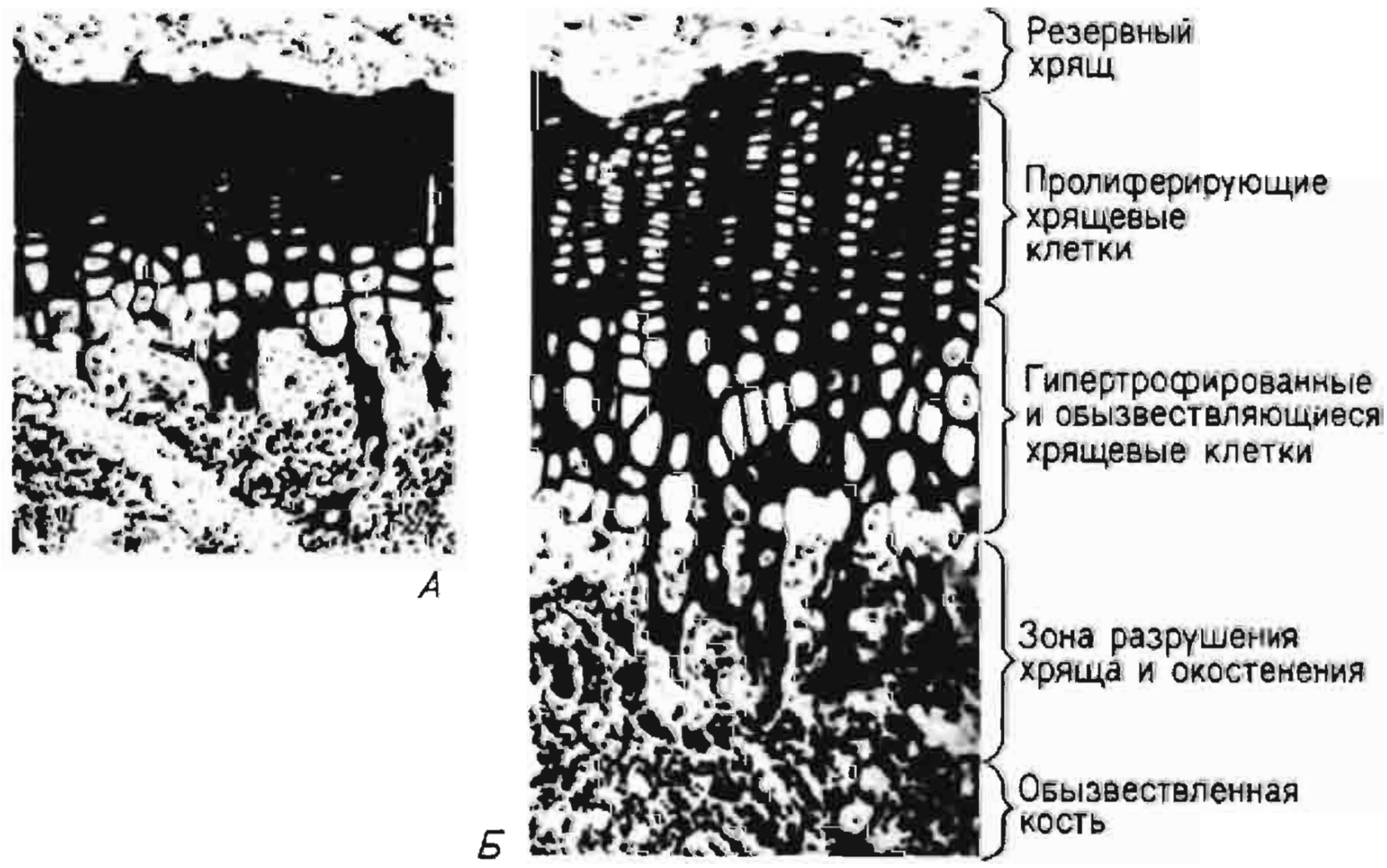
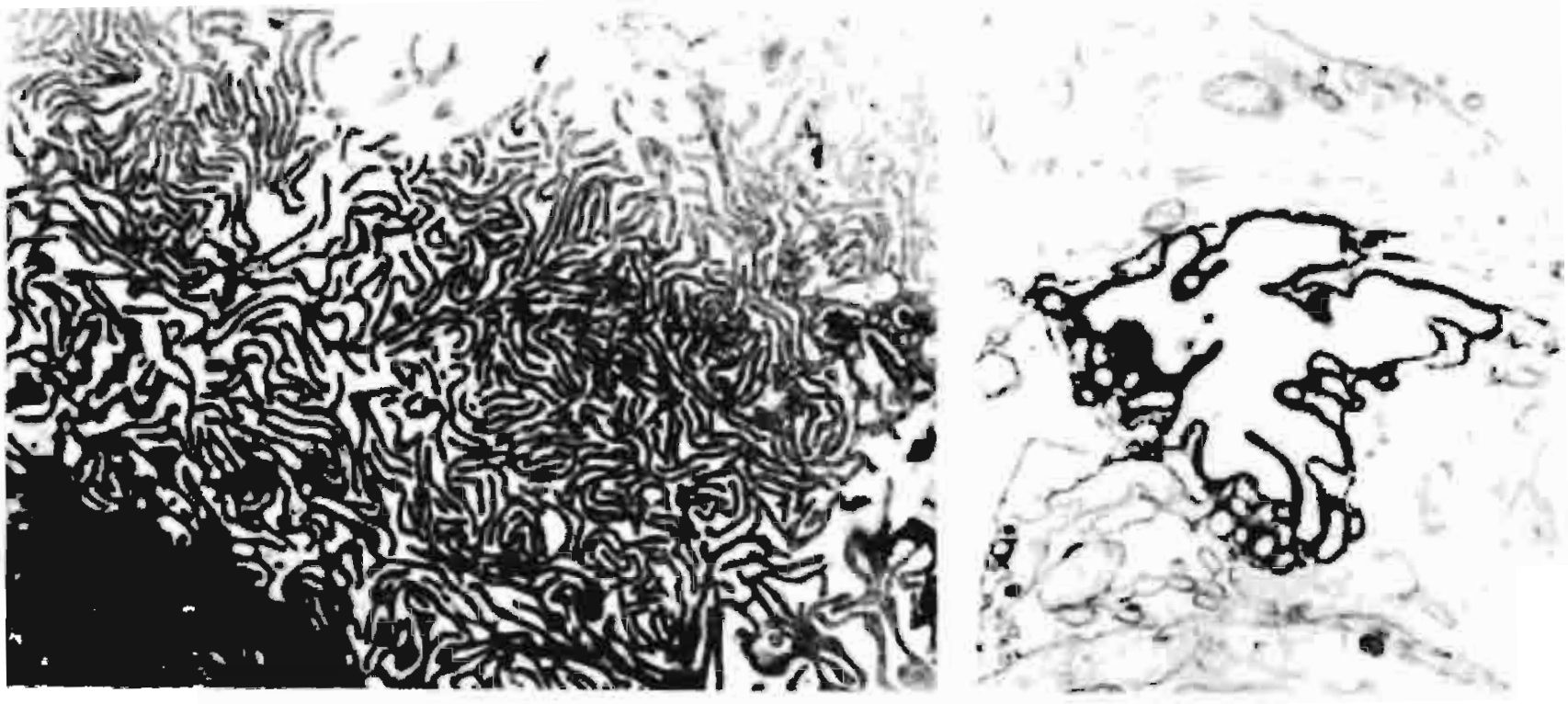
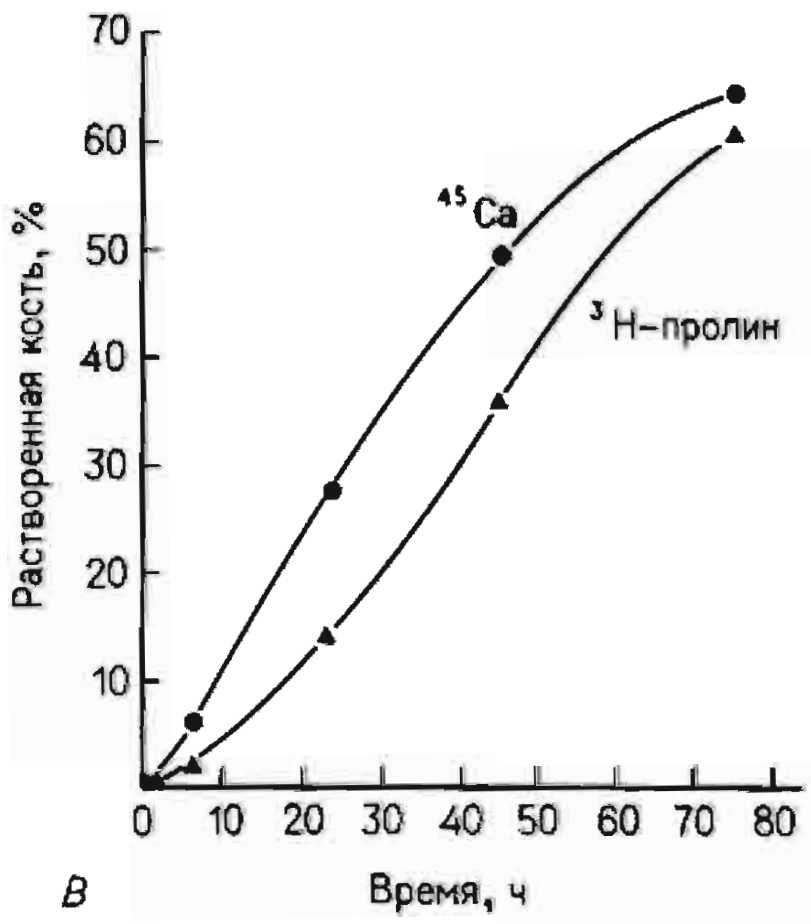


Рис. 6.14. Пролиферация клеток в эпифизарной пластинке, стимулированная гормоном роста. *А*. Участок хряща в кости молодой крысы, у которой удалением гипофиза вызван дефицит гормона роста. *Б*. Такой же участок хряща у крысы после инъекции ей гормона роста. (Фотографии J. Gersh из Bloom, Fawcett, 1975.)



А *Б*



В

Рис. 6.15. Активность остеокластов в костном матриксе. *А*. Ундулирующая мембрана куриного остеокласта, культивируемого на реконструированном костном матриксе. *Б*. Участок ундулирующей мембраны, окрашенной на присутствие АТФазы, способной к транспорту H^+ из клетки. АТФаза локализована только в мембране клеточного отростка. (*А* и *Б* — фотографии получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа). *В*. Растворение неорганического и коллагенового компонентов матрикса (измеряемое соответственно по высвобождению ^{45}Ca и ^{3}H-пролина из 10 000 остеокластов, инкубированных на меченых фрагментах кости). (*А* и *В* — из Blair et al., 1986; *Б* — из Baron et al., 1986. Фотографии с любезного разрешения авторов.)

щается и митохондрии более не могут накапливать кальций (его накопление — активный энергоемкий процесс). В результате отмирающие хондроциты высвобождают кальций, и за его счет формируется провизорный обызвествленный (кальцифицированный) матрикс (рис. 6.12). Остеобласты выстраиваются в ряд вдоль обызвествленных полос матрикса и начинают откладывать на них кость. В конечном счете эти полосы исчезают и остается лишь кость, сформированная остеобластами. Таким образом, кость оказывается там, где ранее находился хрящ.

Другая гипотеза подчеркивает различное происхождение начальных запасов фосфата кальция во внеклеточном матриксе. Согласно этой гипотезе, главными действующими агентами в накоплении кальция являются не митохондрии хондроцитов, а **пузырьки матрикса**. Считают, что эти пузырьки представляют собой специализированные участки плазматической мембраны хондроцита, которые отпочковываются от клетки и прилипают к внеклеточному матриксу. Попав на это место, они накапливают большие количества кальция и фосфата из окружающей лимфы (Dereszewski, Howell, 1978; Wuthier et al., 1985). Действительно, эти пузырьки связаны с самыми начальными отложениями кальция в хряще и кости. Недавно обнаружено (Wuthier et al., 1985), что некоторые пузырьки содержат кальций из хондроцитов. Это позволяет предположить, что обе модели могут быть правильными и что накопление кальция может осуществляться с помощью не одного, а двух или более механизмов.

Замещение хондроцитов остеобластами зависит, по-видимому, от минерализации внеклеточного матрикса. У куриных зародышей источником кальция

служит углекислый кальций скорлупы яйца. За время развития кровеносная система зародыша переносит около 120 мг кальция от скорлупы к скелету (Tuan, 1987). Если у развивающегося куриного зародыша на третьи сутки инкубации удалить скорлупу, поместить его в пластиковую оболочку и культивировать до конца эмбриогенеза, то в условиях дефицита кальция бо́льшая часть хрящевого скелета не превращается в костную ткань (Tuan, Lynch, 1983; рис. 6.13).

Остеогенез в длинных костях начинается в диафизе и постепенно распространяется к концам хрящевого зачатка. У новорожденного младенца диафизы длинных костей обызвествлены, тогда как их концы (называемые эпифизами) все еще образованы хрящом. Вскоре после рождения в хрящевых эпифизах (по мере того как в них проникают кровеносные сосуды) возникают вторичные центры окостенения. Между кальцинированной тканью в эпифизах и диафизом продолжает сохраняться хрящевая пластинка. Эта **эпифизарная пластинка** играет важную роль в росте ребенка после рождения, так как она отвечает пролиферацией на поступающий в нее гормон роста (рис. 6.14). Гормоны также ответственны и за прекращение роста: высокие концентрации эстрогена или тестостерона вызывают слияние центров окостенения в эпифизах и диафизе, что приводит к утрате эпифизарной пластинки. Такое **эпифизарное слияние** происходит в юношеском возрасте, причем у девушек на два года раньше, чем у юношей.

По мере увеличения костного матрикса на периферии кости в ее внутренней части образуются полости и формируется костный мозг. Эта деструкция костной ткани осуществляется **остеокластами** — многоядерными клетками, поступающими в кость по кровеносным сосудам (Kahn, Simmons, 1975).

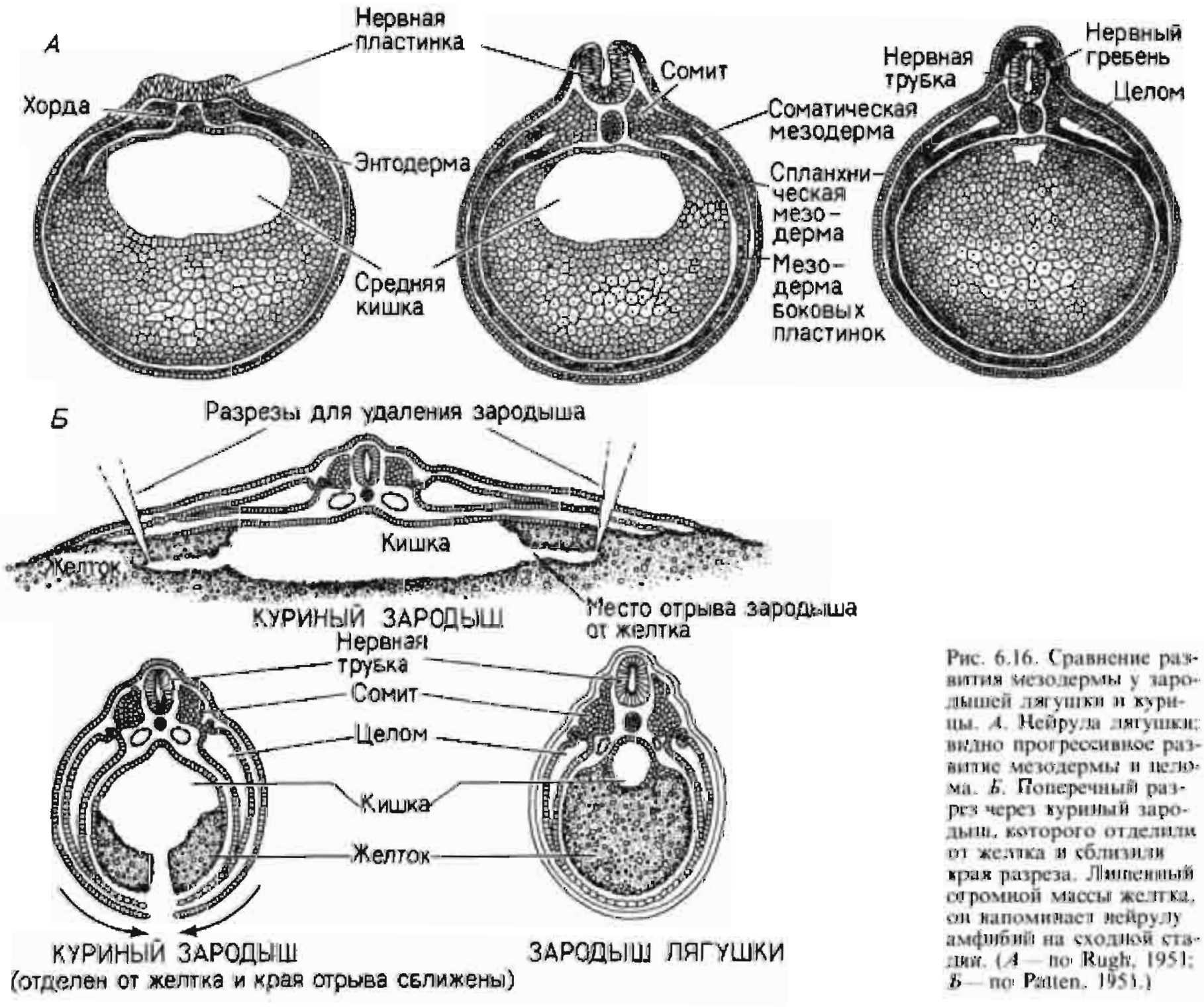


Рис. 6.16. Сравнение развития мезодермы у зародышей лягушки и курицы. *А*. Нейрула лягушки: видно прогрессивное развитие мезодермы и целома. *Б*. Поперечный разрез через куриный зародыш, которого отделили от желтка и сблизили края разреза. Лишенный огромной массы желтка, он напоминает нейрулу амфибий на сходной стадии. (*А* — по Rugh, 1951; *Б* — по Patten, 1951.)

Остеокласты, вероятно, происходят из тех же клеток-предшественников, что и клетки крови; они растворяют как неорганические, так и белковые компоненты костного матрикса (Ash et al., 1980; Blair et al., 1986). Остеокласт направляет многочисленные отростки в матрикс и накачивает ионы водорода в окружающий его материал, тем самым окисляя и растворяя его (Baron et al., 1985, 1986; рис. 6.15). Кровеносные сосуды поставляют в костный мозг также кроветворные клетки, которые остаются в нем на всю жизнь.

Мезодерма боковых пластинок

Мезодермальная мантия не полностью превращается в сомиты. К мезодерме сомитов прилегает область **промежуточной мезодермы** — материал сегментных ножек, из которых развиваются почки и протоки половых желез. Развитие этих систем органов будет подробно рассматриваться в гл. 16 и 21. Далее находится несегментированная **мезодерма боковых пластинок**. Эти пластинки расщепляются продольно на **соматическую (или париетальную) мезодерму**, которая подстилает покровный эпителий, и **спланхническую (висцеральную) мезодерму**, лежащую над энтодермой (см. рис. 6.2, *В*). Между этими двумя слоями образуется вторичная полость тела — **целом**, который простирается от будущего шейного отдела до заднего конца тела. На более поздних стадиях развития соматическая мезодерма образует складки, разделяющие целом на отдельные полости. У млекопитающих целом подразделен на плевральную, перикардиальную и перитонеальную полости. Механизм образования мезодермы сомитов и выстилки тела мало изменялся в процессе эволюции позвоночных, поэтому можно сравнить развитие мезодермы у куриного зародыша и лягушки (рис. 6.16).

Дополнительные сведения и гипотезы

Изоформы

В ходе развития многочисленные линии клеток мезодермы характеризуются замещением одного набора структур (клеток или молекул) другим. Молекулы или клетки, участвующие в этих процессах, часто родственны одна другой и называются **изоформами** (Caplan et al., 1983). Примером набора клеточных изоформ могут служить хондроцит и замещающий его остеобласт. Клетки обоих типов секретируют большое количество обызвествленного (кальцифицированного) матрикса. Примерами молекулярных изоформ являются образующиеся последовательно гемоглобин зародыша, гемоглобин плода и гемоглобины взрослого организма.

В ходе развития у мышей формируются три изоформы популяции миобластов. В популяции первых миобластов (миобласт I), образующихся после отделения миотома от склеротома, слияние идет не очень интенсивно и возникают мелкие мышечные трубочки, содержащие всего лишь 4—6 ядер. Эти трубочки не формируют функционирующих мышц. Вскоре появляется популяция миобластов II; эти миобласты сливаются в крупные мышечные трубочки (20—100 ядер), которые вытесняют миобласты I (Bonner, Hauschka, 1974). В то же самое время аксоны главных двигательных нейронов начинают врастать в конечности. Эти нейроны стимулируют образование третьей популяции миобластов (Womble, Bonner, 1980). Мышечные трубочки, происходящие из популяции миобластов III, образуют мышцы, характерные для новорожденной мыши. В конечностях миобласты III впервые начинают синтезировать характерные для них M- и Z-подобные белки (Jockusch, Jokusch, 1980).

В мышцах, сформированных миобластами III, появляются и исчезают *молекулярные* изоформы. Рассмотрим тяжелые (200 000 дальтон) цепи миозина. Анализ этих белков показывает, что в период развития плода у него обнаруживается эмбриональная форма тяжелой цепи миозина. Ко времени родов она заменяется на форму, характерную для новорожденного, которая позже (в быстрых мышцах) заменяется взрослой формой тяжелой цепи миозина (Whalen et al., 1979). Таким образом, существуют два типа смены изоформ, участвующих в развитии мышц, один на клеточном, другой на молекулярном уровне.

Появление этих изоформ может быть изменено экспериментально (если воспрепятствовать контакту нервов с конечностью) или в результате естественной мутации. У кур существует генетическая мутация, вызывающая мышечную дистрофию. Как и в случае мышечной дистрофии Дюшена у человека, у кур такие мышцы имеют многие признаки, характерные для незрелых мышц,— сходство, которое свидетельствует об отсутствии у них соответствующей программы для нормального развития мышц. Было показано (Bandman, 1985), что у таких мутантов в мышцах продолжается синтез неонатальной

формы в течение долгого времени после того, как эта форма исчезает в нормальной взрослой мышце. Эти факты говорят о том, что развитие ткани не завершается ее формированием. Для того чтобы возник фенотип взрослого индивидуума, необходимо неоднократное моделирование этой ткани как на внутриклеточном, так и на межклеточном уровнях.

Формирование внезародышевых оболочек

Зародышевое развитие у рептилий, птиц и млекопитающих в процессе эволюции приняло новое направление. У рептилий возник механизм откладки яиц на суше, позволивший им использовать ниши, расположенные далеко от воды. Для этого у зародыша появились четыре **внезародышевые оболочки**, служащие посредниками между ним и средой обитания. И хотя у большинства млекопитающих вместо скорлупы сформировалась плацента, у них сохранились те же самые внезародышевые оболочки. У зародышей рептилий, птиц и млекопитающих на ранней стадии развития четких различий между зародышевыми и внезародышевыми областями обнаружить не удается. Однако по мере формирования тела зародыша расположенные на периферии бластодермы эпителиальные ткани образуют ряд туловищных складок, окружающих развивающийся зародыш и тем самым изолирующих его от желтка; они очерчивают контуры собственно зародышевых областей.

Внезародышевые оболочки образуются посредством разрастания эктодермального и энтодермального эпителиев, подостланных мезодермой. При комбинации эктодермы с мезодермой (эту комбинацию часто обозначают термином **соматоплевра**) формируются амнион и хорион; комбинация энтодермы и мезодермы (называемая **спланхноплеврой**) дает начало желточному мешку и аллантоису. Клетки энтодермальной или эктодермальной ткани действуют как функционирующие эпителиальные клетки, а мезодерма дает обширную сеть кровеносных сосудов, несущих кровь от зародыша к эпителию и от эпителия к зародышу. Схематическое изображение полностью сформированных внезародышевых оболочек показано на рис. 1.26, а их формирование — на рис. 6.17.

Первая проблема, возникающая при развитии яйца на суше,— это высыхание. Эмбриональные клетки, оказавшись вне водной среды, должны были бы очень быстро высохнуть. Эту водную среду обеспечивает **амнион**. Клетки амниона секретируют амниотическую жидкость, и таким образом эмбриогенез по-прежнему осуществляется как бы в воде. Это эволюционное новшество оказалось столь значительным и специфическим, что рептилий, птиц и млекопитающих объединили в одну группу **амниот** (Amniota).

Вторая проблема для развития яйца, отложенного на суше,— газообмен. Он осуществляется с помощью **хориона** — самой наружной внезародышевой оболочки. У птиц и рептилий она плотно прилегает к скорлупе и тем самым делает возможным обмен газами между яйцом и наружной средой. У млекопитающих, как мы видели, хорион включается в плаценту, которая кроме дыхательной осуществляет много других функций.

Аллантоис накапливает конечные продукты азотистого обмена и участвует в обмене газов. У рептилий и птиц аллантоис представляет собой большой мешок, поскольку другого пути накопления токсических побочных продуктов метаболизма, образующихся у развивающегося зародыша, нет. Мезодермальный слой аллантоиса часто сближается и сливается с мезодермальным слоем хориона, образуя **хориоаллантоисную оболочку**. Эта чрезвычайно сильно васкуляризованная оболочка имеет очень важное значение для развития куриного зародыша — она ответственна за необходимый для образования костей транспорт кальция из скорлуповой оболочки к зародышу. Размеры аллантоиса у млекопитающих зависят от того, насколько хорошо справляется хорионическая плацента с удалением конечных продуктов азотистого обмена из зародыша. У человека аллантоис представляет собой рудиментарный мешок, тогда как у свиньи это большой и важный орган.

Желточный мешок у птиц и рептилий формируется раньше других внезародышевых оболочек, так как он обеспечивает питание зародышей. Он образуется из энтодермальных клеток, которые обрастают желток. Желточный мешок соединяется со средней кишкой трубкой, открытой на обоих концах,— **желточным протоком**. В результате стенки желточного мешка и стенки кишки переходят друг в друга. Кровеносные сосуды в мезодерме спланхноплевры желточного мешка переносят питательные вещества из желтка в тело зародыша; непосредственно через желточный проток желток не поступает в тело зародыша. Сначала энтодермальные клетки переваривают белки желтка до растворимых аминокислот, которые затем переходят в кровеносные сосуды, окружающие желточный мешок. Таким образом, четыре внезародышевые оболочки делают возможным развитие зародыша на суше.

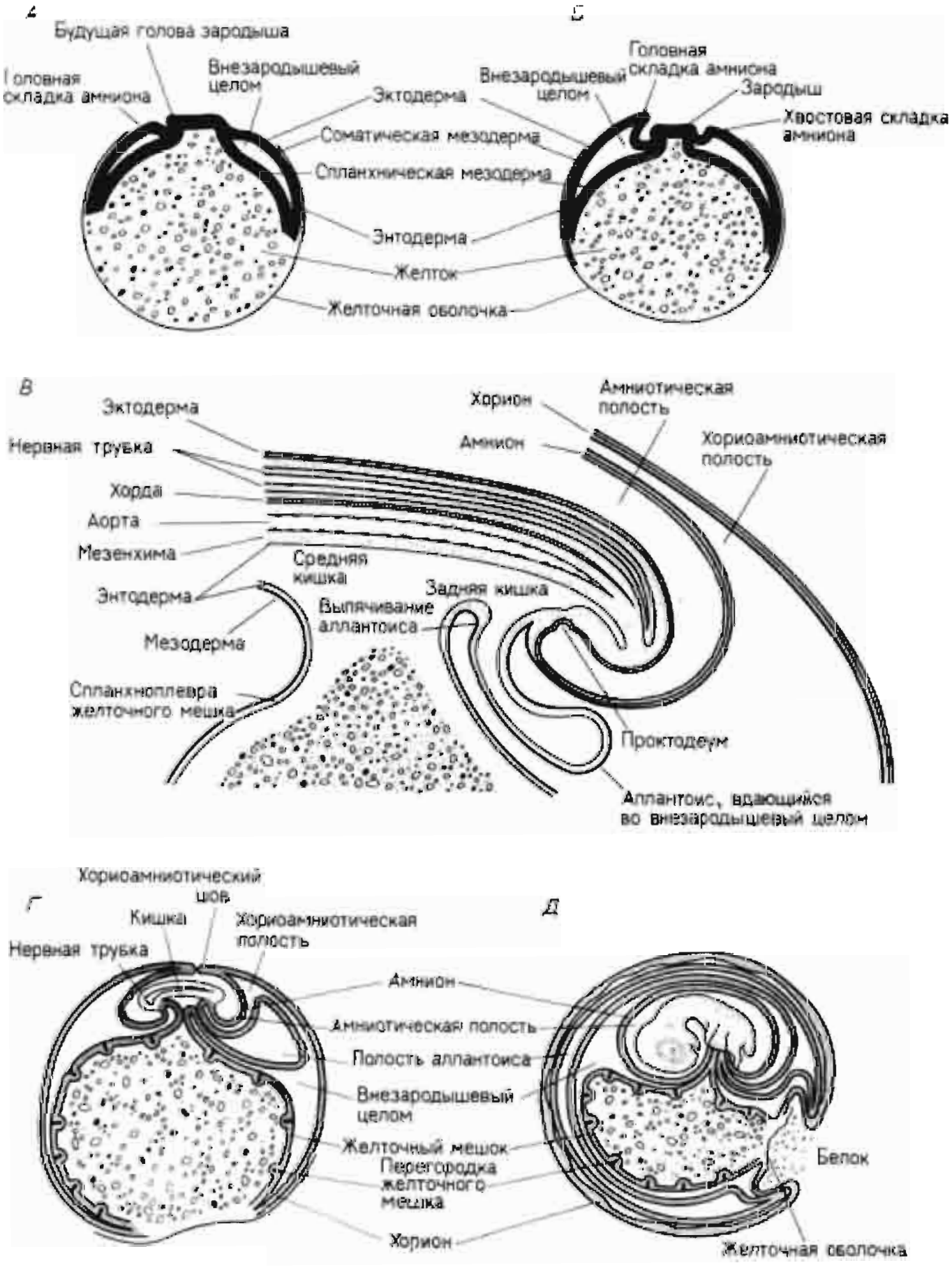


Рис. 6.17. Схема внезародышевых оболочек у куриного зародыша. Зародыш разрезан продольно, белковая и скорлуповая оболочки не показаны. *А*. 2-дневной зародыш. *Б*. 3-дневный зародыш. *В*. Более подробная схема каудальной части 4-дневного зародыша, показывающая формирование аллантоиса. *Г*. 5-дневный зародыш. *Д*. 9-дневный зародыш. По Carlson, 1981.)

Сердце и системы кровообращения

Система замкнутого кровообращения — одно из крупных достижений в эволюции позвоночных животных. Она развивается из мезодермы боковых пластинок и состоит из сердца, форменных элементов крови и сложной сети кровеносных сосудов. Она обеспечивает питание развивающегося зародыша позвоночных животных. Система кровообращения является первой функциональной единицей зародыша, а сердце — его первым функциональным органом.

Сердце

У зародышей позвоночных сердце исходно развивается в переднем отделе, в области спланхнической мезодермы; лишь позже оно перемещается в область груди. У амфибий две презумптивные области образования сердца вначале находятся в са-

мом переднем участке мезодермальной мантии. Во время нейруляции эти две области сходятся в вентральной части зародыша, формируя **сердечную трубку** и общую **перикардиальную полость**. У амниот — птиц и млекопитающих — сердце также развивается путем слияния парных зачатков, но слияние происходит значительно позже в развитии. У этих позвоночных зародыш представляет собой уплощенный диск и мезодерма боковых пластинок не окружает желток полностью. Презумптивные клетки сердца начинают мигрировать из боковых участков мезодермы (на уровне гензеновского узелка), когда зародыш достигнет возраста всего 6—7 ч. К этому времени зародыш еще относительно просто устроен, он состоит только из трех зародышевых листков. Клетки будущего сердца, двигаясь между эктодермой и энтодермой к середине зародыша, сохраняют тесный контакт с поверхностью энтодермы (рис. 6.18; Linask, Lash, 1986). Когда же они достигают передней области зародыша, где находится кишка, их миграция прекращается. Два формирующих сердце зачатка независимо друг от друга претерпевают четко выраженную дифференцировку. У птиц и млекопитающих каждый из них превращается в трубку с двойными стенками: внутренней — **эндокардом** и наружной — **эпимнокардом**. Эндокард будет формировать внутреннюю выстилку сердца, а эпимиокард — мышцу сердца, которая в течение всей жизни организма будет служить насосом, перекачивающим кровь.

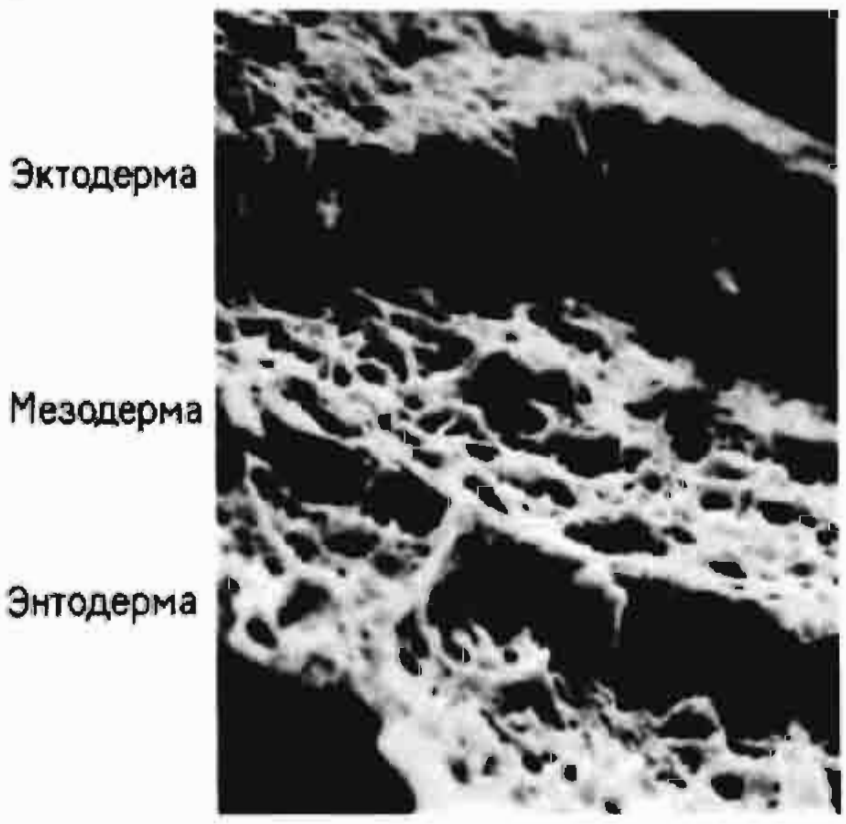


Рис. 6.18. Область мезодермы 6-часового куриного зародыша, образующая сердце (фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). Мезодерма легко отделяется от эктодермы, но остается прочно связанной с энтодермой. (Из Linask, Lash, 1986; фотография с любезного разрешения K. Linask.)

Пока зародыш проходит период нейруляции, выпячивание складки спланхнической мезодермы приводит к обособлению передней кишки (рис. 6.19). В результате две трубки сердца сближаются и в конце концов сливаются вместе, соединяя эпимиокард в одну трубку. Два эндокарда в течение короткого времени находятся в общей камере, но они также сольются. К этому времени исходно парные целомические камеры объединяются, образуя полость тела, в которой располагается сердце. Билатеральное происхождение сердца можно продемонстрировать результатами эксперимента, в котором хирургическим способом предотвращали слияние мезодермы боковых пластинок (Gräper, 1907; DeHaan, 1959). Опыт приводил к состоянию, известному под названием cardia bifida, при котором с каждой стороны тела формируется отдельное сердце (рис. 6.20). Следующей ступенью формирования сердца является слияние эндокардиальных трубок в единую насосную камеру (см. рис. 6.19, *В*, *Г*). Это слияние происходит у куриного зародыша примерно через 29 ч инкубации, а у человека — через три недели беременности. Неслившиеся задние участки эндокарда становятся отверстиями **желточных вен** в сердце (рис. 6.21). Эти вены будут нести питательные вещества из желточного мешка в **венозный синус**. Затем кровь через похожий на створку клапан проходит в предсердный отдел сердца. Сокращения **артериального ствола** быстро прогоняют кровь в **аорту**.

Пульсация сердца начинается еще во время слияния парных зачатков. Водителем ритма (пейсмекером) сердечных сокращений является венозный синус. Здесь начинается сокращение, а затем волна сокращений распространяется по трубчатому сердцу. Таким образом, сердце начинает перекачивать кровь еще до того, как завершится образование сложной системы клапанов. Клетки сердечной мышцы обладают собственной внутренне присущей им способностью к сокращению: изолированные мышечные клетки 7-дневного зародыша крысы или куриного зародыша, помещенные в чашку Петри, продолжают сокращаться (Harary, Farley, 1963; DeHaan, 1967). У зародыша эти сокращения начинают регулироваться электрическими стимулами, поступающими из мозжечка через блуждающий нерв. Через 4 дня электрокардиограмма у куриного зародыша становится очень сходной с электрокардиограммой взрослой особи.

Формирование кровеносных сосудов

Потребности развивающегося зародыша отличаются от потребностей взрослого организма, и эти различия отражает его система кровообращения. Во-первых, пища поступает в зародыш не через кишечник, а либо из желтка, либо из плаценты. Во-

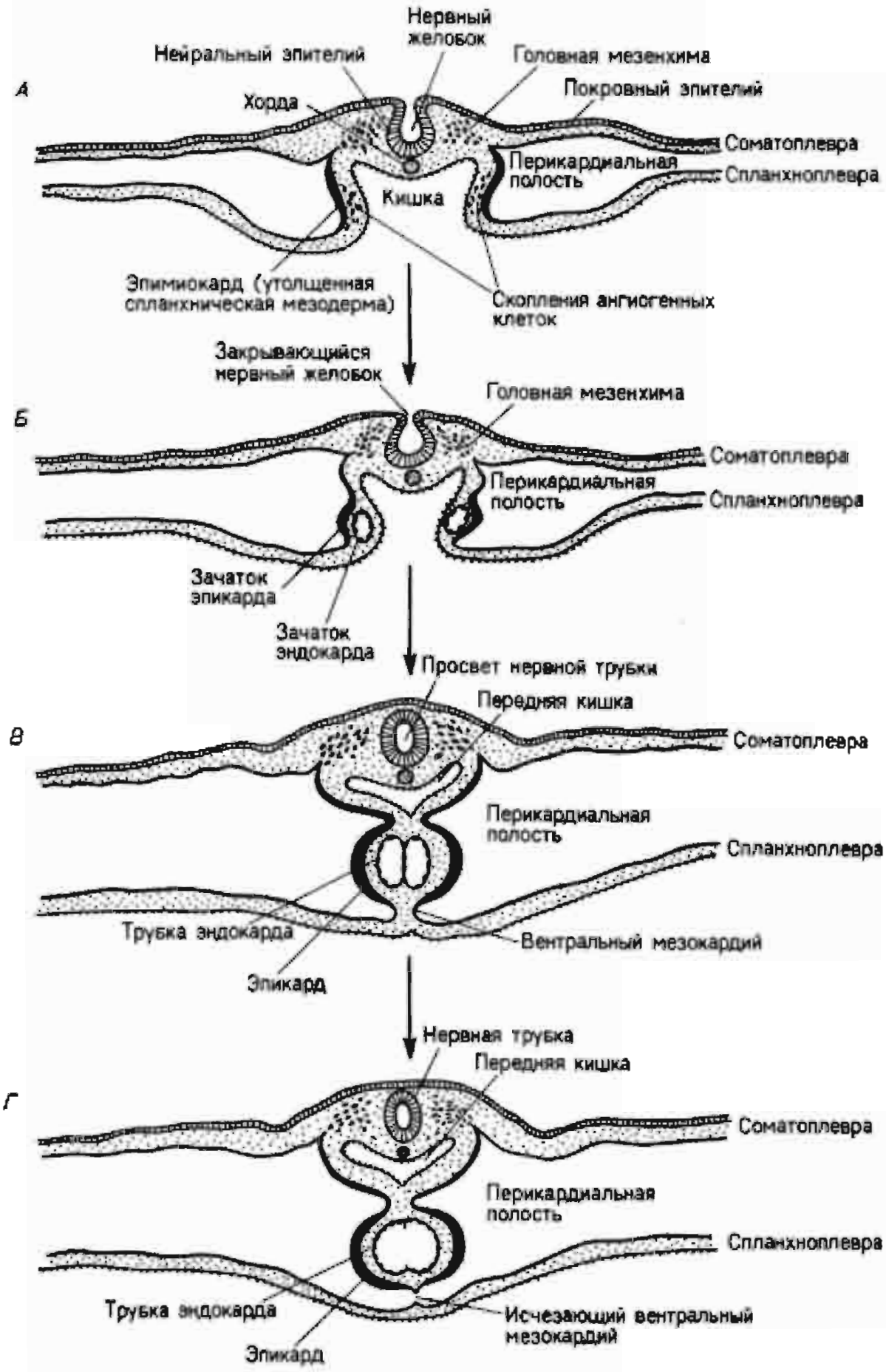


Рис. 6.19. Образование сердца. Схематическое изображение поперечных срезов через область на уровне образования сердца у куриного зародыша в возрасте: *А* — 25 ч; *Б* — 26 ч; *В* — 28 ч; *Г* — 29 ч. (По Carlson, 1981.)

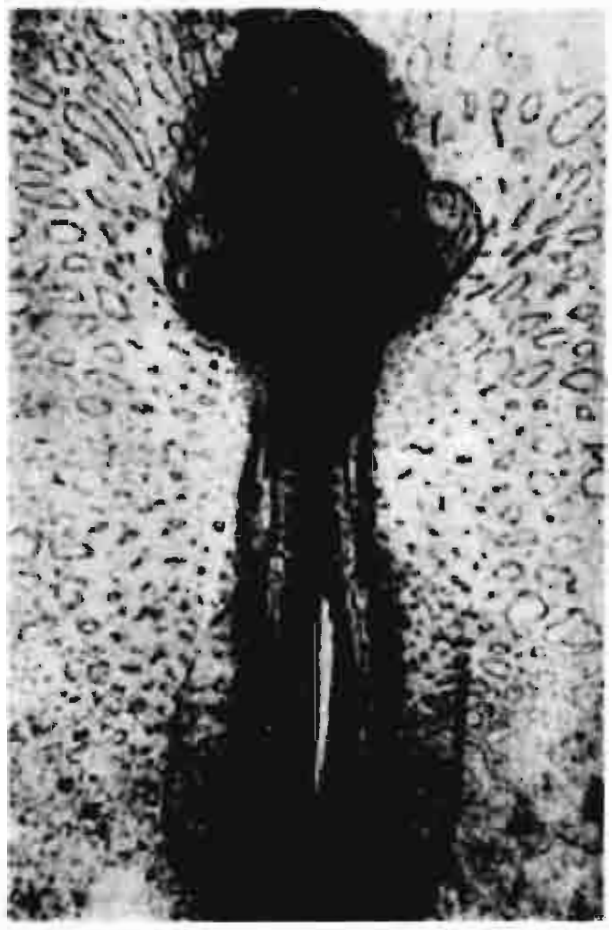


Рис. 6.20. Двойное сердце (cardia bifida) у куриного зародыша. Нарушение развития вызвано экспериментально предотвращением слияния двух зачатков сердца. (С любезного разрешения R. L. DeHaan.)

вторых, процесс дыхания осуществляется не в жабрах или легких, а во внезародышевых оболочках — хорионе или аллантоисе. Таким образом, главные кровеносные сосуды зародыша формируются для обслуживания этих внезародышевых оболочек.

Конструкция кровеносных сосудов помимо необходимости удовлетворять физиологические потребности зародыша диктуется также эволюцией вида. У млекопитающих кровеносные сосуды зародыша будут распространяться по желточному мешку, даже если он не содержит желтка. Кроме того, сосуд, по которому кровь покидает сердце, образует над передней кишкой петли, входящие в спинную аорту. Эти шесть петель — артериальные дуги — образуют арки над глоткой (рис. 6.22). У примитивных рыб эти дуги сохраняются и обеспечивают кровообращение в жабрах, где кровь насыщается кислородом. У взрослых

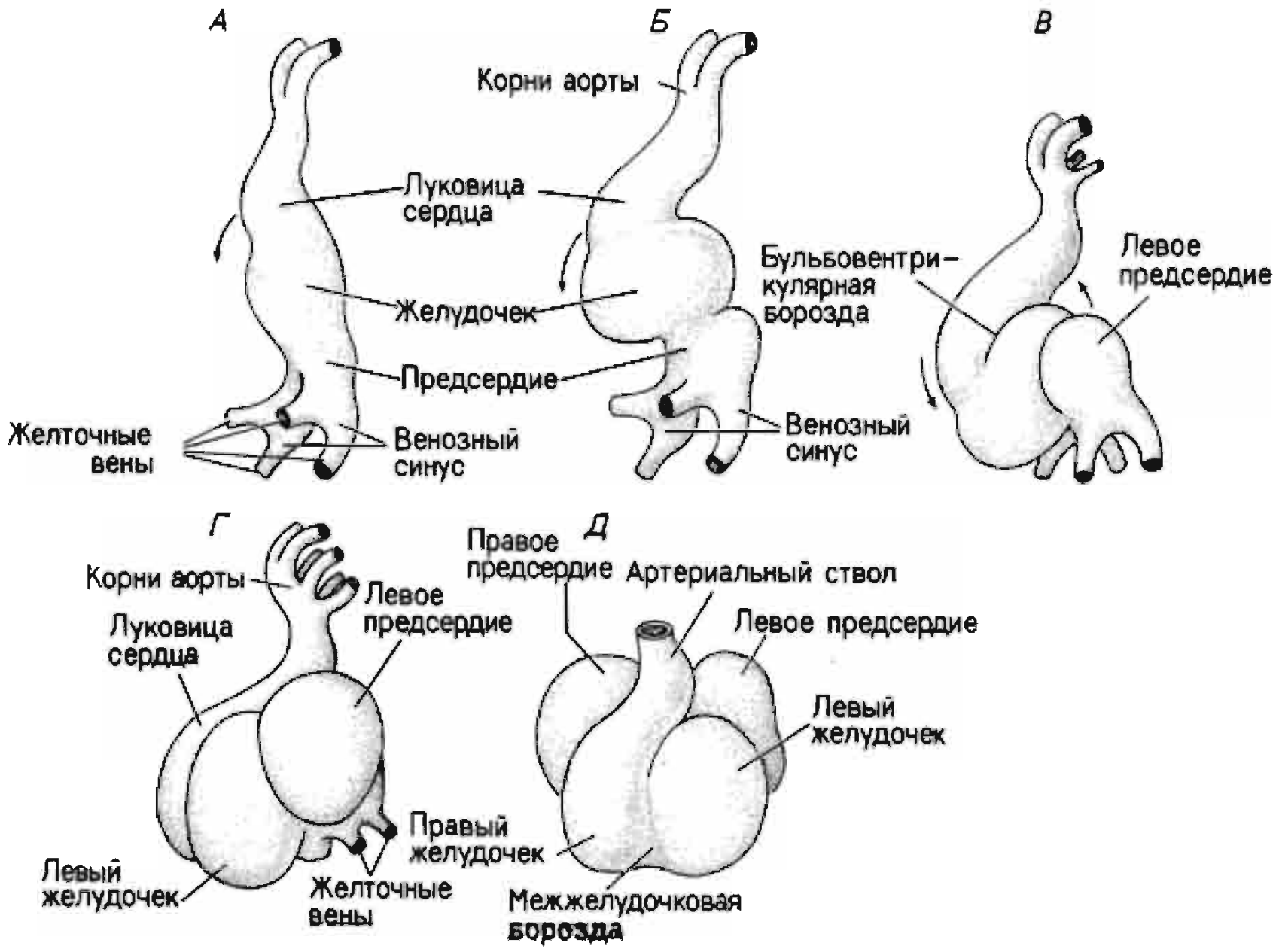


Рис. 6.21. Формирование отделов сердца из простой трубки в течение третьей недели зародышевого развития человека. *А — Г*. Изображение развивающегося сердца с левой стороны. *Д*. Вид спереди. Обратите внимание на то, что имеется два корня аорты, которые разветвляются, образуя дуги аорты (см. рис. 6.22). (По Langman, 1981.)

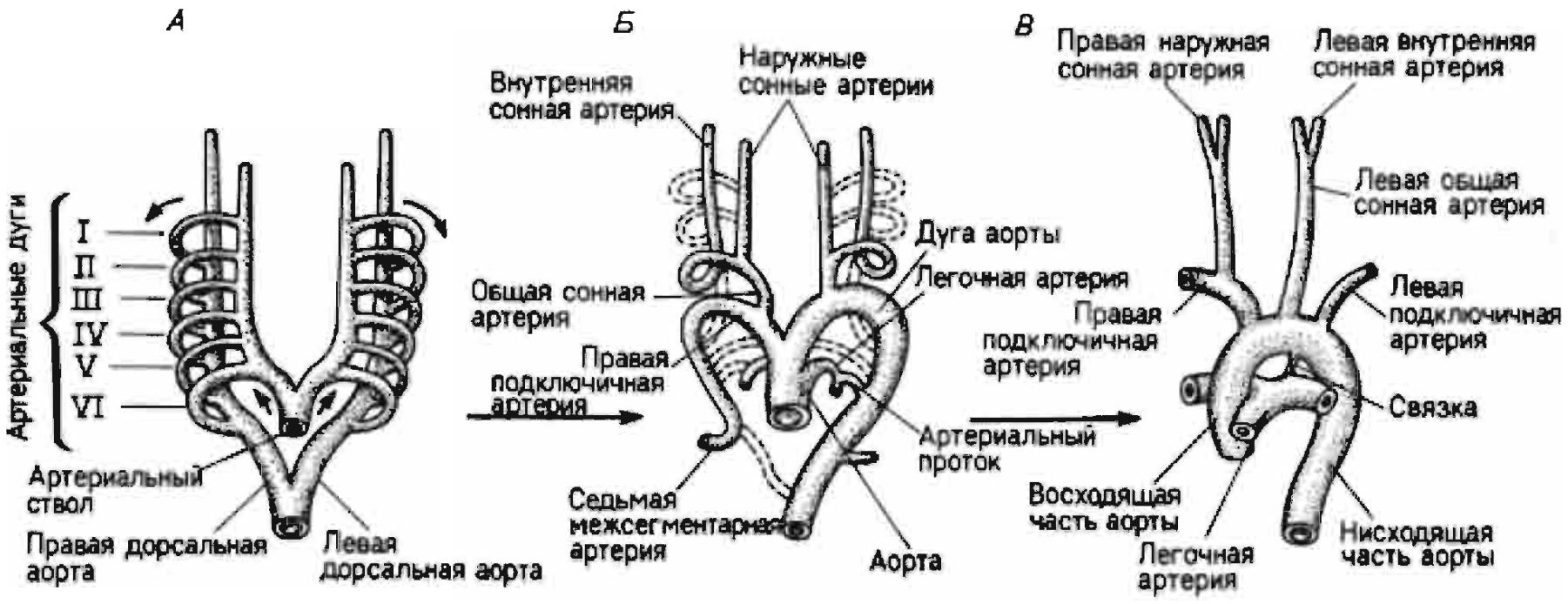


Рис. 6.22. Артериальные дуги у зародыша человека. *А*. Сначала артериальный ствол нагнетает кровь в аорту, которая разветвляется по обе стороны передней кишки. Шесть артериальных дуг получают кровь из вентральной аорты и направляют ее в дорсальную аорту. *Б*. Дуги начинают распадаться или видоизменяться; штриховыми линиями показаны дегенерирующие структуры. *В*. Сохранившиеся дуги изменились, и сформировалась артериальная система взрослого организма. (По Langman, 1981.)

птиц и млекопитающих, у которых этот процесс осуществляется в легких, такая система имеет мало смысла. И хотя у зародышей млекопитающих и птиц формируются все шесть пар артериальных дуг, затем система их упрощается, редуцируясь до единственной дуги. Следовательно, наше эмбриональное развитие отражает эволюцию, хотя физиология зародыша не требует такой структуры.

Главными кровеносными сосудами зародыша являются сосуды, получающие питательные вещества и приносящие их к телу зародыша, а также сосуды, транспортирующие кислород к органам, в которых происходит газообмен, и уносящие от них диоксид углерода. У позвоночных с большим количеством желтка в яйце **желточные (пупочно-брыжеечные)** вены формируются посредством агрегации спланхнических мезенхимных клеток в **ангиогенных скоплениях (кровяных островках)**, расположенных в стенке желточного мешка (рис. 6.23). Эти клетки впервые обнаруживаются в area opaca на стадии, когда первичная полоска достигает максимальной длины (Pardanaud et al., 1987). Вскоре тяжи мезенхимных клеток изгибаются, образуя двустенные трубки, подобные двойной трубке сердца. Клетки внутренней стенки становятся плоскими **эндотелиальными клетками**, выстилающими сосуды, а клетки наружной — гладкомышечными клетками. Между слоями эндотелиальных и гладкомышечных клеток располагается базальная мембрана, содержащая коллаген, специфичный для кровеносных сосудов. Было высказано предположение (Murphy, Carlson, 1978), что эта базальная мембрана инициирует дифференцировку клеток разных типов в сосудах. Центральные клетки кровяных островков дифференцируются в зародышевые клетки крови. Кровяные островки по мере их роста сливаются и образуют сеть капилляров, впадающих в две желточные вены, приносящие питательные вещества и клетки крови к формирующемуся сердцу. Система кровообращения, функционирующая между зародышем и желтком, показана на рис. 6.24.

Капиллярные сплетения в системе кровообращения — те области в каждой ткани, где происходит газообмен и обмен питательными веществами,— могут возникать двумя различными путями. В некоторых органах сплетение капилляров возникает независимо от самой ткани (Auerbach et al., 1985). При этом образование капилляров не является результатом прогрессивного утоньшения разветвлений главных кровеносных сосудов, растущих от сердца. Вероятнее, что мезодерма каждого из этих органов содержит клетки, называемые **ангиобластами**, которые преобразуются в капилляры. Эти органоспецифичные сплетения капилляров в конце концов соединяются с выростами главных сосудов. В других органах (а именно в зачатке конечности, в почках и в мозге) существующие кровеносные сосуды проникают между клетками, формирующими орган (Wilson, 1983). Полагают, что органообразующие области секретируют **ангиогенные факторы**, побуждающие эндотелиальные клетки к митозу и к миграции в эти области. Из мозга трехдневного куриного зародыша был выделен фактор, способствующий миграции эндотелиальных клеток в мозг из кровеносных сосудов, расположенных на поверхности мозга (Risau, 1986).

Зародыши млекопитающих получают пищу и кислород из плаценты. Таким образом, хотя зародыш млекопитающих имеет сосуды, аналогичные желточным венам, пища и кислород поступают в него преимущественно через **пупочную вену**, которая соединяет зародыш с плацентой (рис. 6.25). Эта вена переносит кровь, содержащую кислород и питательные вещества, обратно в зародыш и образуется из той вены, которая у птиц становится правой желточной веной. **Пупочная артерия**, несущая кровь с конечными продуктами обмена в плаценту, у куриного зародыша соответствует аллантоисной артерии. Она отходит от каудальной части аорты, проходит вдоль аллантоиса и впадает в плаценту.

У млекопитающих кровь после попадания ее в сердце зародыша перекачивается в дорсальном на-

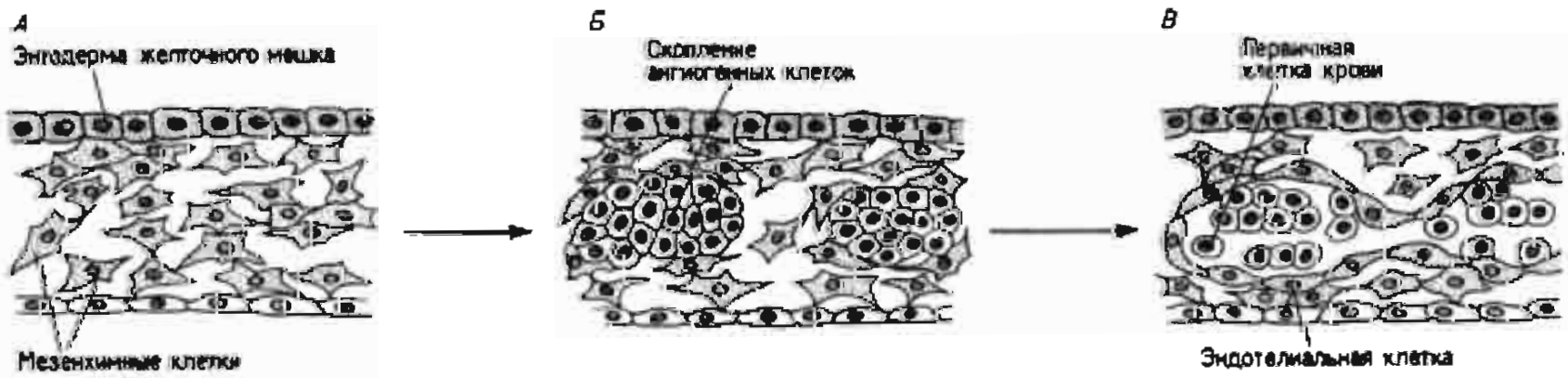


Рис. 6.23. Ангиогенез. Формирование кровеносных сосудов сначала происходит в стенке желточного мешка, где располагается недифференцированная мезенхима (*А*), в которой образуются плотные скопления ангиогенных клеток (*Б*). В центре этих скоплений формируются клетки крови, а на периферии развиваются эндотелиальные клетки кровеносных сосудов (*В*). (По Langman, 1981.)

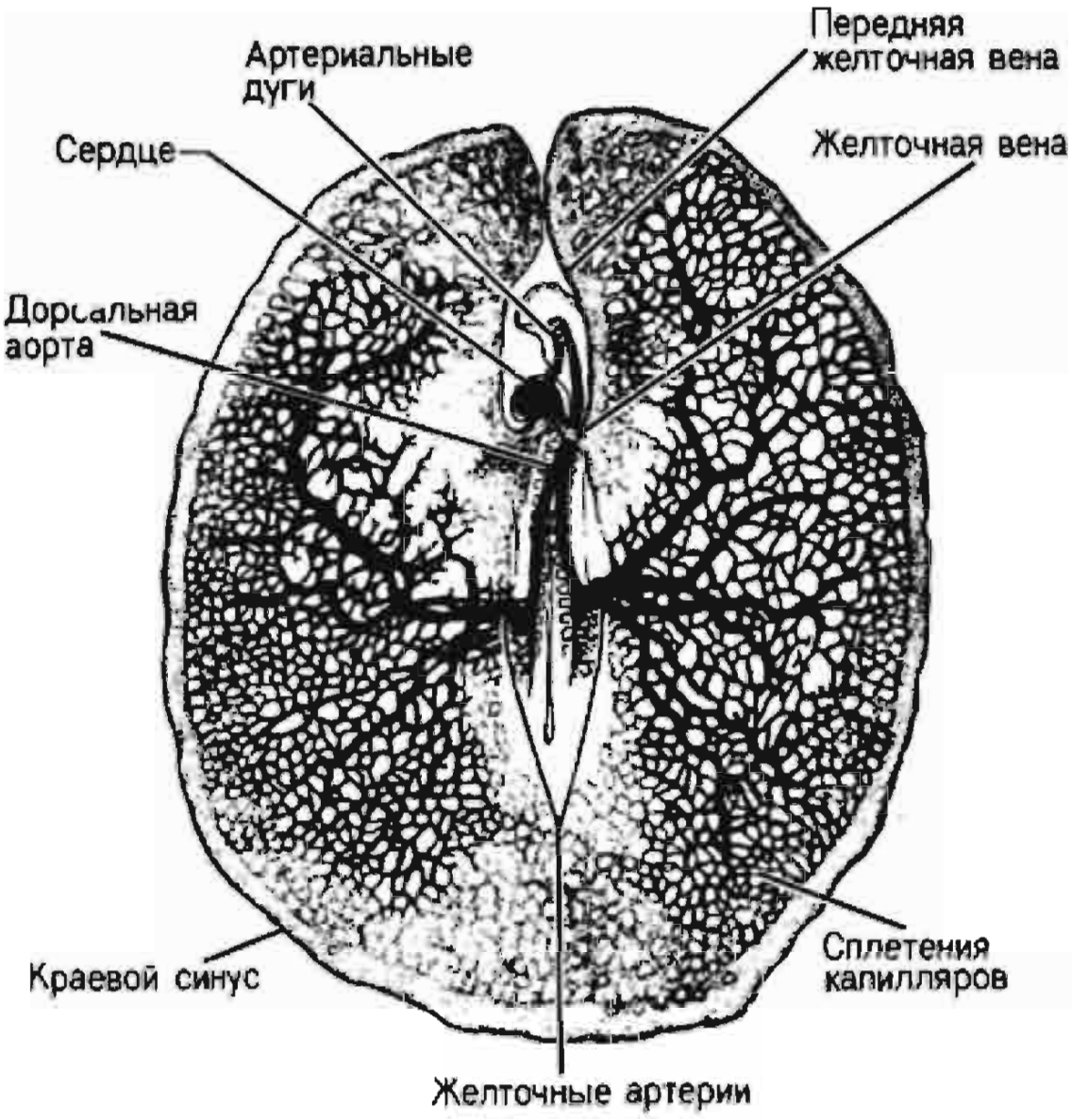


Рис. 6.24. Схема, иллюстрирующая желточную систему кровообращения у 44-часового куриного зародыша (вид с вентральной стороны). Артерии обозначены черным цветом, вены — точками. Краевой синус является наружной границей желточного кровообращения и местом образования клеток крови. (Из Carlson, 1981.)

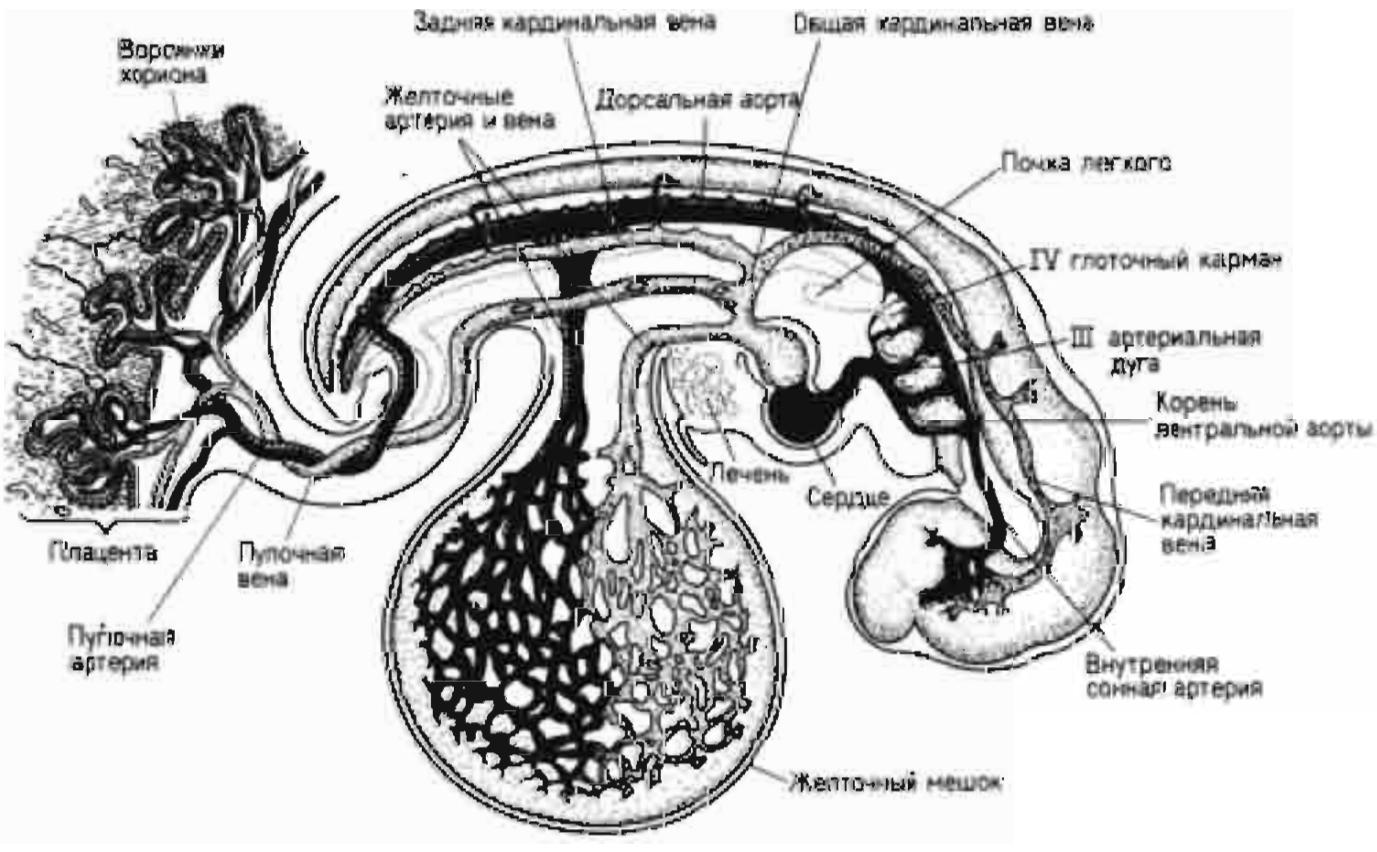


Рис. 6.25. Система кровообращения 4-недельного зародыша человека. Показана только правая сторона, хотя главные кровеносные сосуды на этой стадии парные, т.е. проходят на левой и правой стороне. Артерии обозначены черным цветом. (Из Carlson, 1981.)

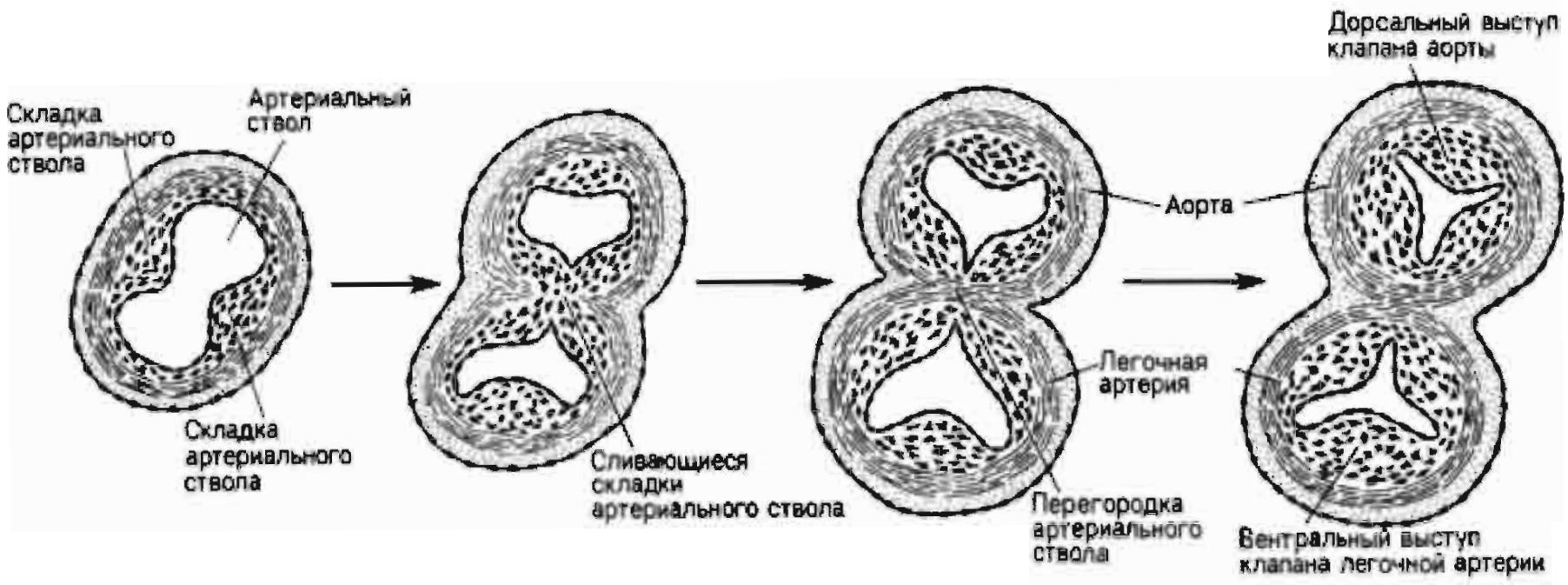


Рис. 6.26. Схемы, иллюстрирующие развитие артериального ствола в аорту и легочные артерии. (По Kramer, 1942.)

правлении по артериальным дугам, окружающим глотку. Четвертая левая дуга — единственная, достигающая аорты у млекопитающих. Четвертая правая дуга образует у них корень подключичной артерии. Третья пара артериальных дуг трансформируется в сонные артерии, снабжающие кровью головной мозг и голову. Из шестой пары дуг формируются легочные артерии, а первая, вторая и пятая пара дегенерируют. Таким образом, аорта и легочная артерия в течение значительного времени развития зародыша открываются в сердце одним общим отверстием. Затем в артериальном стволе образуется перегородка, и в результате он подразделяется на два разных сосуда (рис. 6.26). Только после того, как первый вдох новорожденного животного докажет, что его легкие готовы насыщать кровь кислородом, сердце начнет перекачивать кровь в легочную артерию.

Изменение направления потока крови у новорожденного млекопитающего

Ткани развивающегося плода так же нуждаются в кислороде и питательных веществах, как и ткани взрослого организма. Однако физиология плода чрезвычайно резко отличается от физиологии взрослого. Главное из этих отличий — отсутствие функционирующих легких и кишечника. Весь кислород и все питательные вещества должны поступать к плоду через плаценту. Это обстоятельство ставит перед нами два вопроса: первый — как плод получает кислород из материнской крови, и второй — каким образом меняется направление тока крови

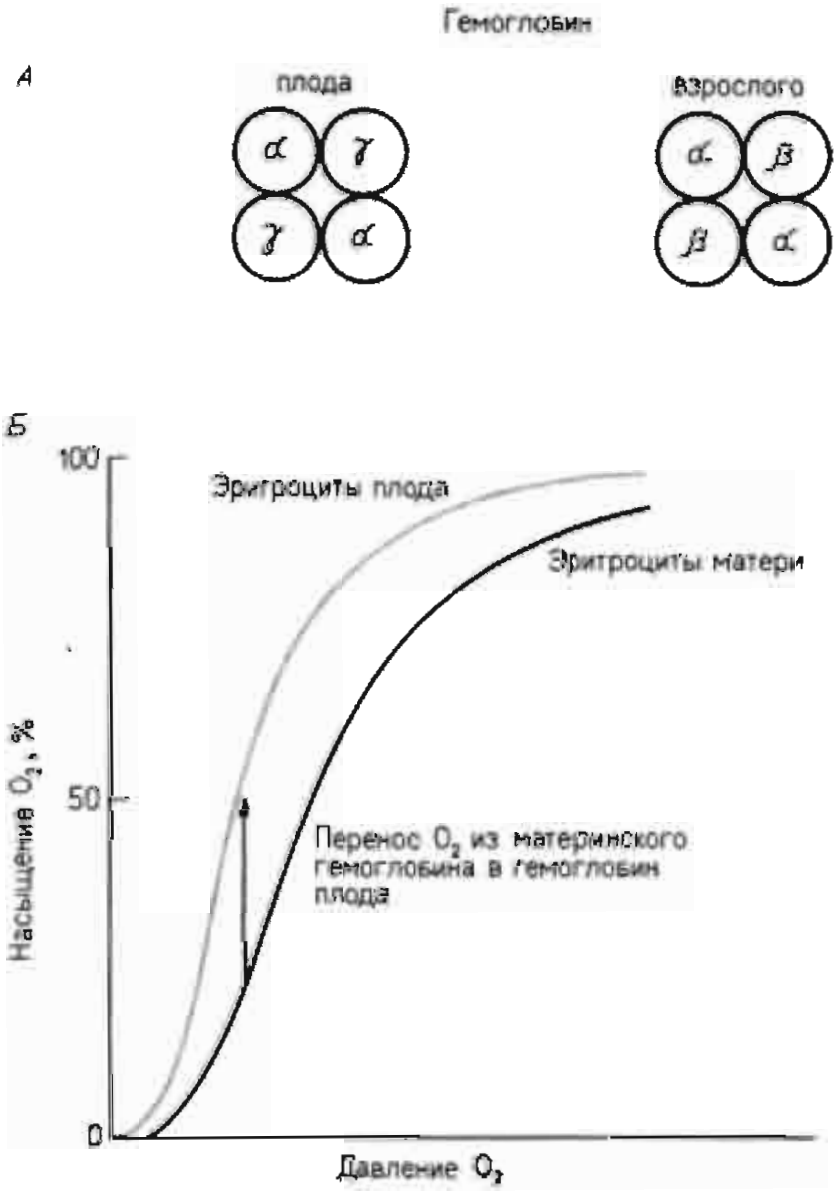


Рис. 6.27. Перенос кислорода от матери к плоду у человека. Субъединицы белка в молекулах гемоглобина взрослого организма и плода отличаются друг от друга (*А*). γ-Цепь гемоглобина плода связывает дифосфоглицерат менее интенсивно, чем β-цепь гемоглобина взрослого. Следовательно, гемоглобин плода может связывать кислород более эффективно, чем гемоглобин взрослого (*Б*). В плаценте, где давление кислорода невелико, происходит перенос кислорода из материнской крови (которая при таком низком давлении отдает кислород тканям) в кровь плода, которая еще может его захватывать. (*Б* — по Stryer, 1981.)

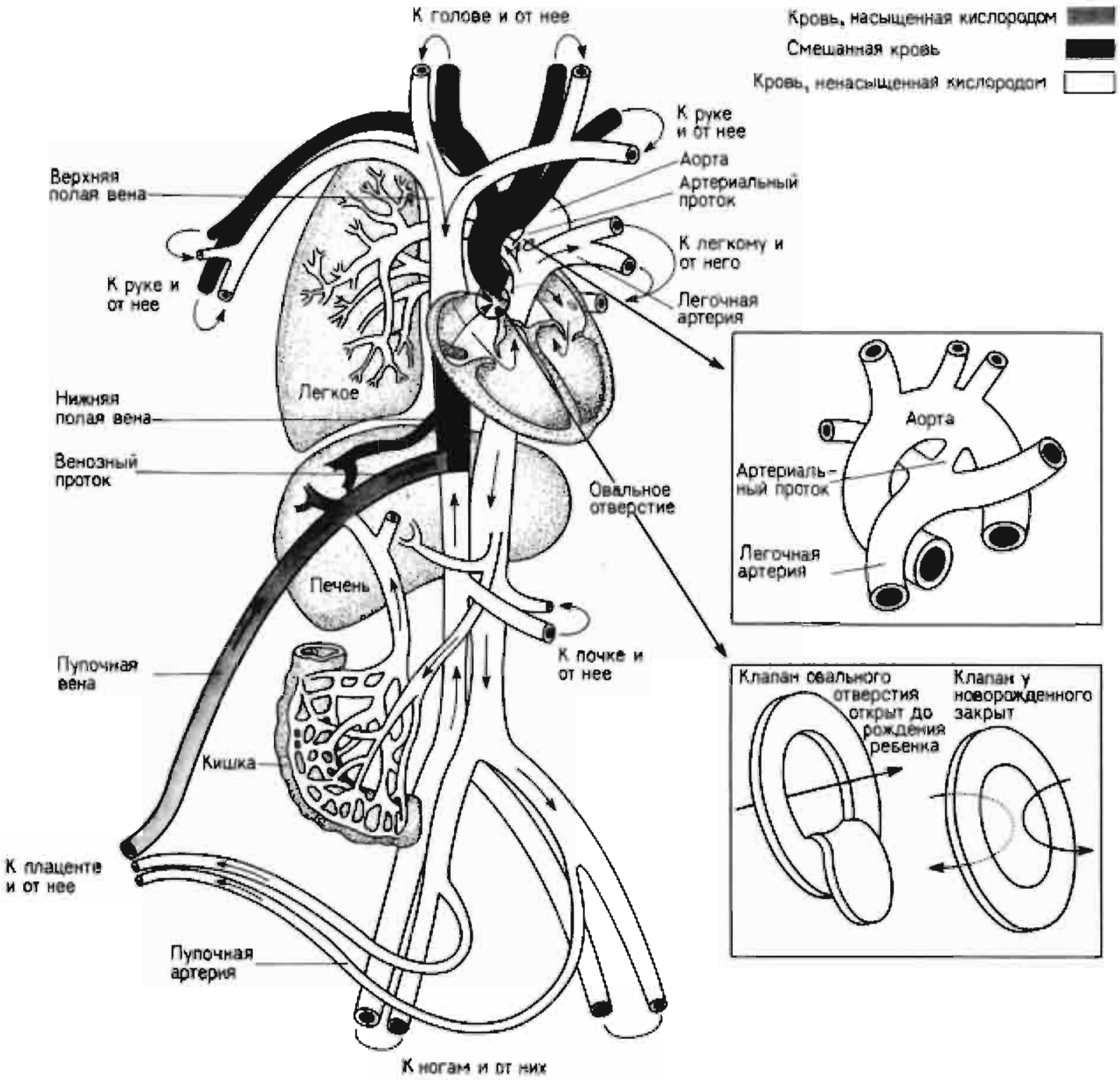


Рис. 6.28. Изменение тока крови при рождении. Заполнение легких воздухом вызывает в них увеличение давления крови и обусловливает изменение направления тока крови у новорожденного младенца. Артериальный проток сжимается, и сообщение аорты с легочными артериями прекращается; закрывается также овальное отверстие — проход между левым и правым предсердиями. Таким образом, легочное кровообращение отделяется от всей системы кровообращения. (По Baker, Allen, 1982.)

так, что она после перерезки пупочного канатика (когда становится необходимым легочное дыхание) начинает поступать в легкие?

В решении проблемы снабжения плода кислородом из материнской крови участвует **гемоглобин плода** (фетальный гемоглобин). Гемоглобин в эритроцитах плода несколько отличается от гемоглобина взрослого организма. Цепи гемоглобина плода имеют несколько иную последовательность аминокислот. Два из четырех пептидов в цепях гемоглобина плода и взрослого идентичны (α-цепи), но две β-цепи гемоглобина взрослого замещены у плода двумя γ-цепями (рис. 6.27,*А*). Нормальные β-цепи связывают естественный регулятор процесса, способствующий высвобождению кислорода,— дифосфоглицерат. Изоформы γ-цепи не обладают способностью связывать дифосфоглицерат и поэтому имеют более высокое сродство к кислороду.

В плаценте — среде с низким содержанием кислорода — он высвобождается из гемоглобина взрослого. В той же среде гемоглобин плода будет не отдавать, а, напротив, связывать кислород. Это небольшое различие в сродстве к кислороду обусловливает возможность переноса кислорода от матери к плоду (рис. 6.27,*Б*). Миоглобин мышц плода имеет еще более высокое сродство к кислороду, поэтому молекулы кислорода будут переходить из гемоглобина плода в его миоглобин, накапливаться в мышцах и использоваться ими. Гемоглобин плода не вреден для новорожденного, и замещение эритроцитов, содержащих этот гемоглобин, эритроцитами, содержащими гемоглобин взрослого, у человека завершается примерно через полгода после рождения ребенка.

Однако, когда плод уже не получает кислорода от матери, как перестраивается его кровообращение, для того чтобы он смог получить кислород из своих легких? Во время развития плода отверстие (**артериальный проток**) направляет ток крови из легочной артерии в аорту (и, следовательно, в плаценту). Поскольку кровь из легочной вены не возвращается в плод, развивающийся плод млекопитающих должен иметь какой-то иной способ получения крови, которую следует перекачать в левый желудочек. Это осуществляется с помощью **овального отверстия** в перегородке, разделяющей левое и правое предсердия. Кровь может поступить в правое предсердие, пройти через овальное отверстие в левое предсердие, а затем перейти в левый желудочек (рис. 6.28). После первого вдоха новорожденного кислород в крови вызывает сокращение мышц, которые окружают артериальный проток; в результате это отверстие закрывается. Как только возрастает давление крови в левой половине сердца, оно заставляет захлопнуться створку над овальным отверстием, и тем самым происходит разделение двух потоков крови: легочного и общего. Так, когда начинается дыхание, осуществляется переключение потока крови с плаценты на легкие.

Дополнительные сведения и гипотезы

Ангиогенез, индуцированный опухолью

У каждого человека за день происходит до 350 миллиардов митозов (Folkman, 1974). С каждым клеточным делением возрастает возможность того, что образовавшиеся в результате деления клетки станут злокачественными. В действительности же опухоли развиваются крайне редко. Фолкман предположил, что клетки, способные к формированию опухолей, появляются с определенной частотой, но подавляющее большинство их не может реализовать эту способность. Причина этого заключается в том, что для выживания со́лидной опухоли, как и любой быстро делящейся ткани, необходимы кислород и питательные вещества. Без снабжения кровью потенциальные опухоли либо погибнут, либо будут сохраняться в «дремлющем» (скрытом, латентном) состоянии. Такие «микроопухоли» остаются стабильной клеточной популяцией, в которой погибающие клетки замещаются новыми.

Решающим моментом для превращения этого узелка опухолевых клеток в быстрорастущую опухоль является васкуляризация. На рис. 6.29 показан экспоненциальный рост такой опухоли. Через две недели после васкуляризации первоначальный объем микроопухоли может увеличиться в 16 000 раз. Без снабжения кровью опухоль не растет (Folkman, 1974; Ausprunk, Folkman, 1977). Для того чтобы васкуляризация произошла, в микроопухоли образуются вещества, называемые опухолевыми факторами ангиогенеза. Один такой фактор — **ангиогенин** — был выделен из популяции опухолевых клеток человека; он оказался одноцепочечным белком с молекулярной массой примерно 14 400 дальтон (Fett et al., 1985). Опухолевые факторы ангиогенеза стимулируют митозы эндотелиальных клеток и формирование из этих клеток сосудов, направляющихся к опухоли. Это явление можно продемонстрировать, имплантировав кусочек опухолевой ткани между слоями роговицы кролика или мыши. Роговица не васкуляризована, но она окружена сосудистым ободком (**лимбом**). Опухолевая ткань индуцирует образование кровеносных сосудов, растущих по направлению к опухоли (рис. 6.30). Бо́льшая часть других тканей взрослого организма не индуцирует формирования сосудов. (Исключение составляют стимулированные антигенами лимфоциты и макрофаги, секретирующие ангиогенные факторы, которые, вероятно, участвуют в заживлении раны.) Очищенный ангиогенин даже в дозе 3,5 пикомоля может индуцировать обширную васкуляризацию роговицы у кролика. Как только кровеносные сосуды вступают в опухоль, она начинает бурно расти и в конце концов разрушает глаз.

Было показано (Folkman et al., 1983), что некоторые природные вещества подавляют ангиогенез, индуцированный опухолью. Гепарин — сложный полисахарид, обнаруженный в матриксе многочисленных соединительнотканных образований — является мощным ингибитором ангиогенеза, особенно если он вводится вместе со стероидным гормоном кортизоном. У мышей с твердо установленными опухоля-

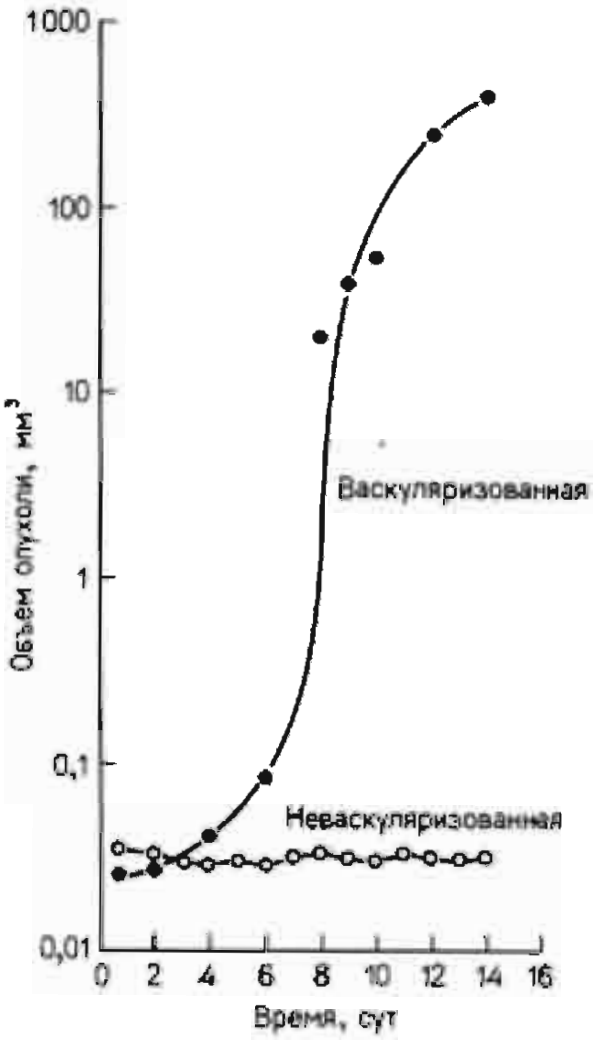


Рис. 6.29. Экспоненциальный рост опухоли после врастания в нее кровеносных сосудов и отсутствие роста в неваскуляризованной опухоли. Опухоли сферической формы были помещены в переднюю камеру глаза кролика; в некоторых опухолях произошла васкуляризация (путем врастания в них капилляров из наружной оболочки), тогда как другие остались неваскуляризованными. (По Folkman, 1974.)

ми, получающих инъекции гепарина и кортизона, эти опухоли заметно регрессируют (уменьшаются). Комбинация гепарина с кортизоном подавляет и нормальный ангиогенез у куриных зародышей.

Помимо того, что новообразованные кровеносные сосуды снабжают опухоли кислородом и питательными веществами, они также представляют собой путь, который облегчает миграцию опухолевых клеток к новым местам и тем самым формирование вторичных опухолей. Этот процесс называется **метастазированием**. В результате бо́льшая часть больных со злокачественными опухолями умирает не от исходной (первичной) опухоли, а от многочисленных вторичных опухолей, распространяющихся путем метастазирования. Чтобы попасть в кровеносный сосуд, опухолевая клетка должна лизировать (растворить) коллагеновый матрикс, окружающий новые капилляры. Полагают, что лизис осуществляется с помощью секреции протеолитического фермента, называемого **активатором плазминогена**. Этот фермент играет важную роль в имплантации бластоцисты в матку (см. гл. 3). Опухолевые клетки используют тот же самый фермент, чтобы проделать отверстие в коллагеновом матриксе, окружающем кровеносные сосуды. Синтез активатора плазминогена коррелирует со способностью опухоли метастазировать; было обнаружено, что антитела против этого фермента подавляют рост метастазов у человека (Ossowski, Reich, 1983). Попав на эндотелиальные клетки капилляров, метастазирующая опухолевая клетка может протиснуться между ними и попасть в кровоток (Kramer, Nicolson, 1979). На рис. 6.31 по-

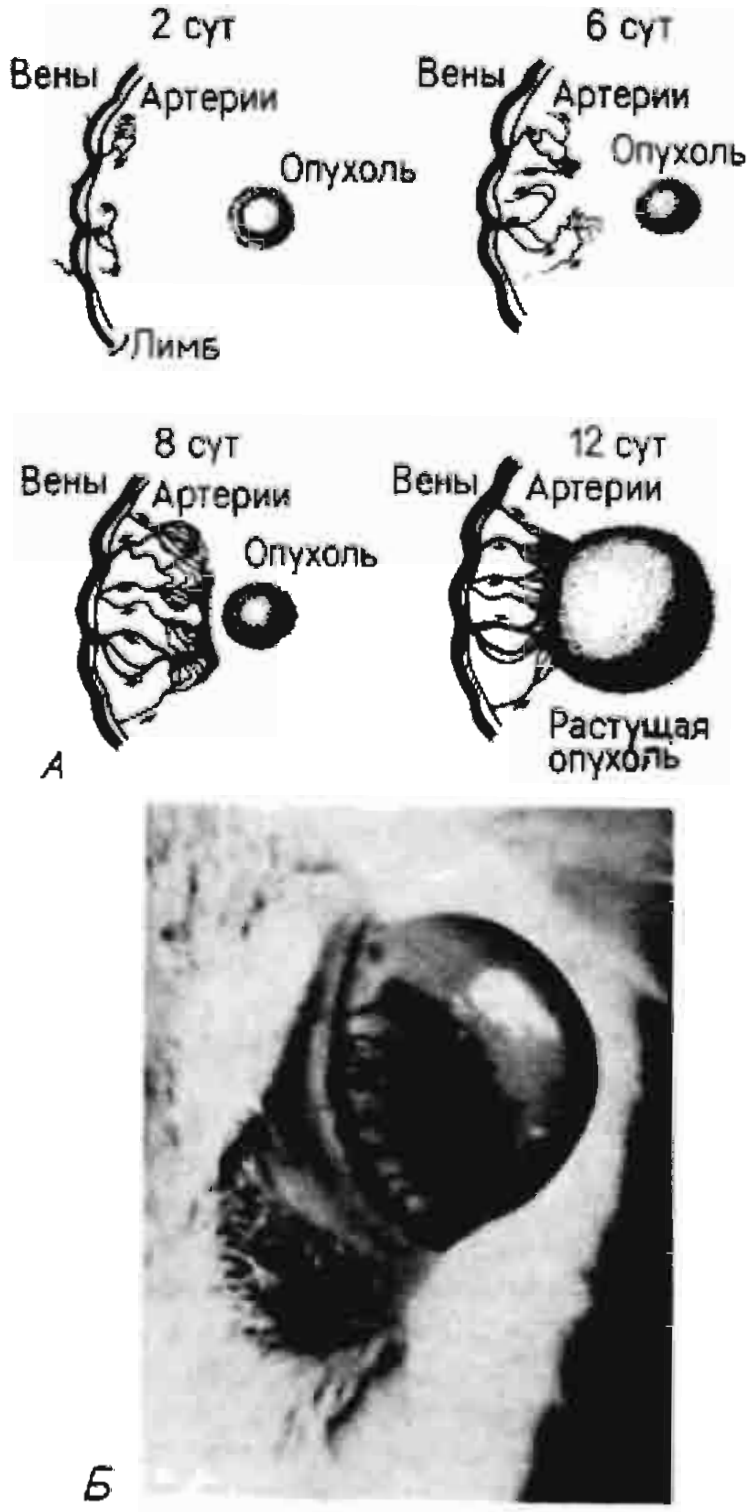


Рис. 6.30. Новый кровеносный сосуд, растущий к опухоли, имплантированной в роговицу глаза белой мыши. *А*. Последовательность событий, ведущих к васкуляризации злокачественной аденокарциномы молочной железы на сроках 2, 6, 8 и 12 сут. *Б*. Фотография живой роговицы белой мыши с новыми сосудами, врастающими в трансплантированную опухоль. (*А* — из Muthukkaruppan, Auerbach, 1979; *Б* — фотография с любезного разрешения R. Auerbach.)

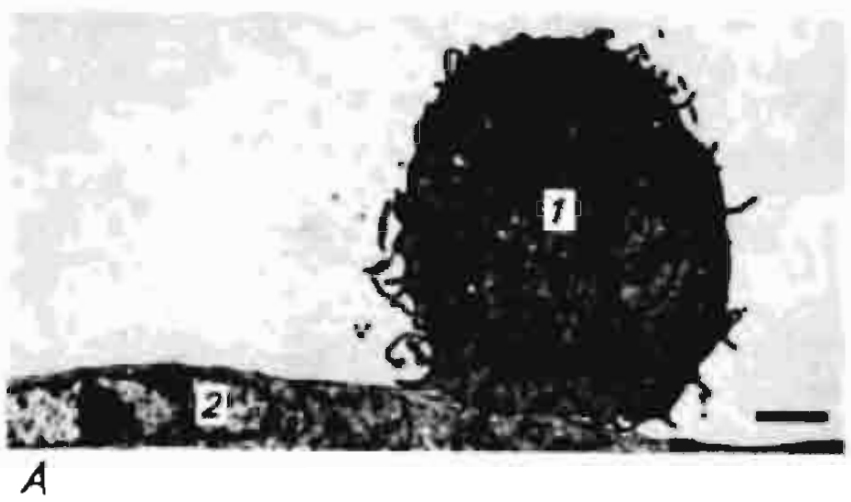


Рис. 6.31. Прикрепление (*А*), инвазия (*Б*) и миграция (*В*) опухолевых клеток меланомы (*1*) под эндотелиальной клеткой сосуда (*2*). Клетки злокачественной меланомы, помещенные на эндотелиальные клетки, растущие в культуре, фотографировали через 0,5, 1 и 3 ч. (Из Kramer, Nicolson, 1979; фотографии с любезного разрешения G. Nicolson.)

казано, как метастазирующая клетка злокачественной меланомы прокладывает себе путь внутрь сосуда между эндотелиальными клетками.

Для метастазирования необходимо, чтобы клетка была способна перемещаться от одного места к другому. Подобно эмбриональным клеткам, многие опухолевые клетки нуждаются в поверхности, по которой могут мигрировать, а некоторые из этих клеток движутся по внеклеточному матриксу, образованному клетками эндотелия кровеносных сосудов (Nicolson et al., 1981). Эта миграция, как и миграция многих эмбриональных клеток, по-видимому, осуществляется с помощью фибронектина. У мышей, которым инъецированы опухолевые клетки определенной линии меланомы, эти клетки специфически мигрируют в легкие, где и формируют вторичные опухоли (рис. 6.32). Если клетки меланомы предварительно инкубируют в среде, содержащей фибронектин или его участок, связывающийся с клетками (так чтобы клетка не могла связываться с собственным фибронектином хозяина), то около 90% инъецированных клеток не достигают легких (Humphries et al., 1986).

По способности быстро делиться, секретировать активатор плазминогена и ангиогенный фактор, а также по характеру миграции опухолевые клетки сходны с нормальными эмбриональными клетками. Нередко опухолевые клетки — это клетки взрослого организма, но вернувшиеся к эмбриональной стадии своего существования. Эти данные позволяли предложить новые подходы к терапии рака, включая введение агентов, которые предотвращают ангиогенез или действительно способствуют дифференцировке «эмбриональной» опухолевой клетки в нормальную «взрослую» клетку (Sachs, 1978; Jimenez, Yunis, 1987).

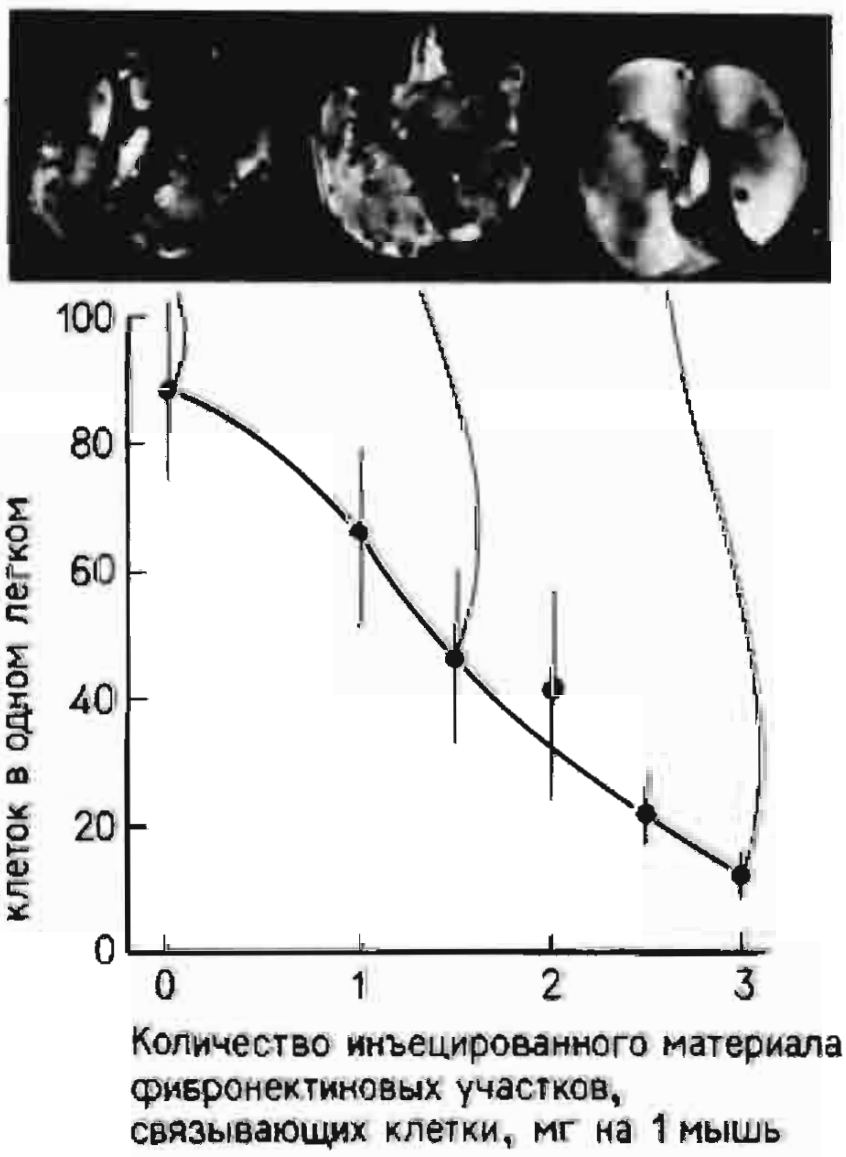


Рис. 6.32. Метастазирование злокачественной меланомы. Способность отдельных клеток метастазировать в легкие подавлена связывающими клетки фибронектиновыми участками. Клетки меланомы инъецировали мышам в хвостовую вену. Спустя 14 сут животных усыпляли с помощью эфира и подсчитывали число метастазов в легкое. Каждая точка на кривой — среднее для 8 мышей. (Из Humphries, 1986; фотография с любезного разрешения K. M. Yamada.)

Развитие клеток крови

Полипотентные стволовые клетки и их микроокружение

Бóльшая часть тканей позвоночных животных состоит из дифференцированных клеток, которые не делятся. Миобласты, например, образуют быстроделящуюся популяцию клеток до тех пор, пока не объединятся в мышечные трубочки. Однако некоторые ткани, такие, как эпидермис, кишечный эпителий и клетки крови, обладают особой «эмбриональной» клеточной популяцией. В соответствии с этим их клеточный состав постоянно меняется даже у взрослых животных. Это явление наиболее наглядно можно продемонстрировать на примере эритроцитов млекопитающих; эритроцит у них лишен ядра, и продолжительность его жизни в кровяном русле у человека равна всего лишь 120 сут. В норме у человека ежедневно погибает $3 \cdot 10^{11}$ эритроцитов, но они замещаются таким же количеством новых (Hay, 1966). Источником непрерывного формирования новых эритроцитов (так же как и клеток крови других типов) служат **кроветворные** («формирующие кровь») **стволовые клетки**.

Стволовые клетки представляют собой загадочный и еще мало понятный феномен. От них в буквальном смысле слова зависит вся наша жизнь. Стволовая клетка — это клетка, способная к интенсивной пролиферации; она дает начало таким же стволовым клеткам (самоподдержание) и более дифференцированному потомству (Siminovitch et al., 1963). Так, одна стволовая клетка может дать начало клону, содержащему миллионы дифференцированных клеток, а также небольшому числу стволовых клеток. Тем самым стволовые клетки обеспечивают непрерывную пролиферацию клеток-предшественников тканей на протяжении длительного времени. Кроветворные стволовые клетки млекопитающих мигрируют в костный мозг, где сохраняются в течение всей жизни животного. Стволовые клетки имеются и для таких непрерывно возобновляющихся тканей, как эпидермис, а также для возобновления числа спермиев в семенниках. Некоторые стволовые клетки, например стволовые клетки скелетной мускулатуры, существуют, вероятно, в течение развития плода (Quinn et al., 1985). Представление о судьбе стволовой клетки дает рис. 6.33.

У млекопитающих и птиц имеется, по-видимому, общая **полипотентная кроветворная клетка**, которая может дать начало эритроцитам, гранулоцитам, макрофагам, тромбоцитам и иммунокомпетентным клеткам — лимфоцитам. Существование таких стволовых клеток было показано исследователями (Till, McCulloch, 1961), инъецировавшими клетки костного мозга облученным летальной дозой мышам той же генетической линии, что и доноры костного мозга. Некоторые из этих клеток образовали обособленные узелки (колонии) в селезенке хозяина (рис. 6.34). Результаты микроскопического исследования показали, что эти узелки содержат клетки-предшественники эритроцитов, гранулоцитов и тромбоцитов. Следовательно, единичная клетка из костного мозга способна формировать клетки крови многих различных типов. Ответственная за это клетка была названа **КОЕ-с** — *к*олоние*о*бразующей *е*диницей в *с*елезенке. В дальнейших исследованиях с использованием хромосомных маркеров было подтверждено, что различные типы клеток в пределах колонии формируются единичной КОЕ-с. В этих исследованиях клетки костного мозга облучали так, что выживали лишь немногие клетки; значительная часть их имела хромосомные аномалии, четко выявляемые при изучении с помощью светового микроскопа. Когда такие облученные клетки костного мозга инъецировали мыши, у которой собственные кроветворные клетки были разрушены, каждая клетка селезеночной колонии, будь то клетка-предшественник гранулоцита или эритроцита, имела ту же самую хромосомную аномалию (Becker et al., 1963). Важную часть концепции стволовой клетки составляет требование, в соответствии с которым стволовая клетка помимо



Рис. 6.33. Схема, иллюстрирующая динамику пролиферации и дифференцировки стволовой клетки.



Рис. 6.34. Изолированные колонии кроветворных клеток. Если облученной мыши инъецируют костный мозг, содержащий кроветворные стволовые клетки, то на поверхности селезенки этой мыши видны отдельные колонии кроветворных клеток. В селезенке справа таких колоний больше, чем в селезенке слева. (Из Till, 1981; фотография с любезного разрешения J. E. Till.)

образования дифференцированных клеточных типов должна воспроизводить также себе подобные стволовые клетки. Это обнаружено и в данном случае. Когда колонии клеток в селезенке, образовавшиеся из единственной клетки КОЕ-с, были ресуспендированы и инъецированы в другую мышь, у нее в селезенке возникли множественные колонии (Jurášková, Tkadleček, 1965; Humphries et al., 1979). Следовательно, мы убеждаемся в том, что единичная клетка костного мозга может формировать многочисленные разные типы клеток, а также и воспроизводить такие же, как она сама, клетки; другими словами, КОЕ-с является полипотентной стволовой кроветворной клеткой.

Из приведенных выше данных следует, что, хотя КОЕ-с может давать начало многим типам форменных элементов крови, она неспособна к образованию лимфоцитов. Этот вывод опирается на опыты, в которых было показано (Abramson et al., 1977), что КОЕ-с и лимфоциты происходят из стволовых клеток разных типов. Когда мышам, имеющим наследственный дефицит кроветворных клеток, вводили облученные клетки костного мозга, одинаковые хромосомные аномалии обнаруживались как в клетках из селезеночных колоний, так и в лимфоцитах, циркулирующих в крови. Результаты, полученные Абрамсон и ее коллегами, были подтверждены в опытах, когда мышам вместе с клетками костного мозга инъецировали определенные вирусы, которые случайным образом включались в различные участки ДНК клетки. Одни и те же гены вирусного происхождения были обнаружены в одинаковых областях генома и в лимфоцитах, и в клетках крови (Keller et al., 1985; Lemischka et al., 1986). На рис. 6.35 суммированы результаты нескольких исследований. Первой полипотентной кроветворной стволовой клеткой является КОЕ-м,л (колониеобразующая единица для миелоидного и лимфоидного ряда). Эта клетка дает начало КОЕ-с (клетки крови) и КОЕ-л (лимфоциты). КОЕ-с и КОЕ-л также представляют собой полипотентные стволовые клетки, потому что их потомство может дифференцироваться в многочисленные клеточные типы. Однако непосредственное потомство КОЕ-с представляет собой *коммитированные* стволовые клетки. Каждая из них помимо воспроизведения себе подобных дает начало только одному типу клеток. Например БОЕ-э (бурстообразующие клетки эритроидного ряда) формируются из КОЕ-с и могут дать только один тип клеток в дополнение к себе подобным. Эта новая клетка называется КОЕ-э (колониеобразующая единица эритроидного ряда); она способна в ответ на действие гормона **эритропоэтина** образовывать первую четко определяемую дифференцированную клетку этого ряда — **проэритробласт**. Эритропоэтин является гликопротеином, который быстро индуцирует синтез глобиновой мРНК (Krantz, Goldwasser, 1965). Он синтезируется главным образом в почках, и на его синтез влияют окружающие условия. Если уровень насыщения крови кислородом снижается, увеличивается количество эритропоэтина, и это приводит к увеличению образования эритроцитов. Проэритробласт превращается в **эритробласт**, синтезирующий огромные количества гемоглобина. В конце концов эритробласт у млекопитающих выталкивает ядро и превращается в **ретикулоцит**. Ретикулоциты уже не могут синтезировать глобиновую мРНК, но способны еще транслировать имеющиеся в клетке мРНК. Конечная стадия дифференцировки проэритробласта — **эритроцит**. Он не делится и не синтезирует ни РНК, ни белок. Такая клетка покидает костный мозг, чтобы выполнить свою роль поставщика кислорода к тканям тела. Клетки КОЕ-л, по-видимому, развиваются сходным образом, а именно полипотентная стволовая клетка продуцирует другие стволовые клетки, каждая из которых коммитирована к дифференцировке определенного типа лимфоцитов. Так, имеются коммитированные стволовые клетки для тромбоцитов и коммитированные стволовые клетки для гранулоцитов и макрофагов.

Молекулы, влияющие на дифференцировку клеток крови, относятся к классу растворимых белков, называемых **гемопоэтическими факторами роста**, одним из которых является эритропоэтин. Некоторые

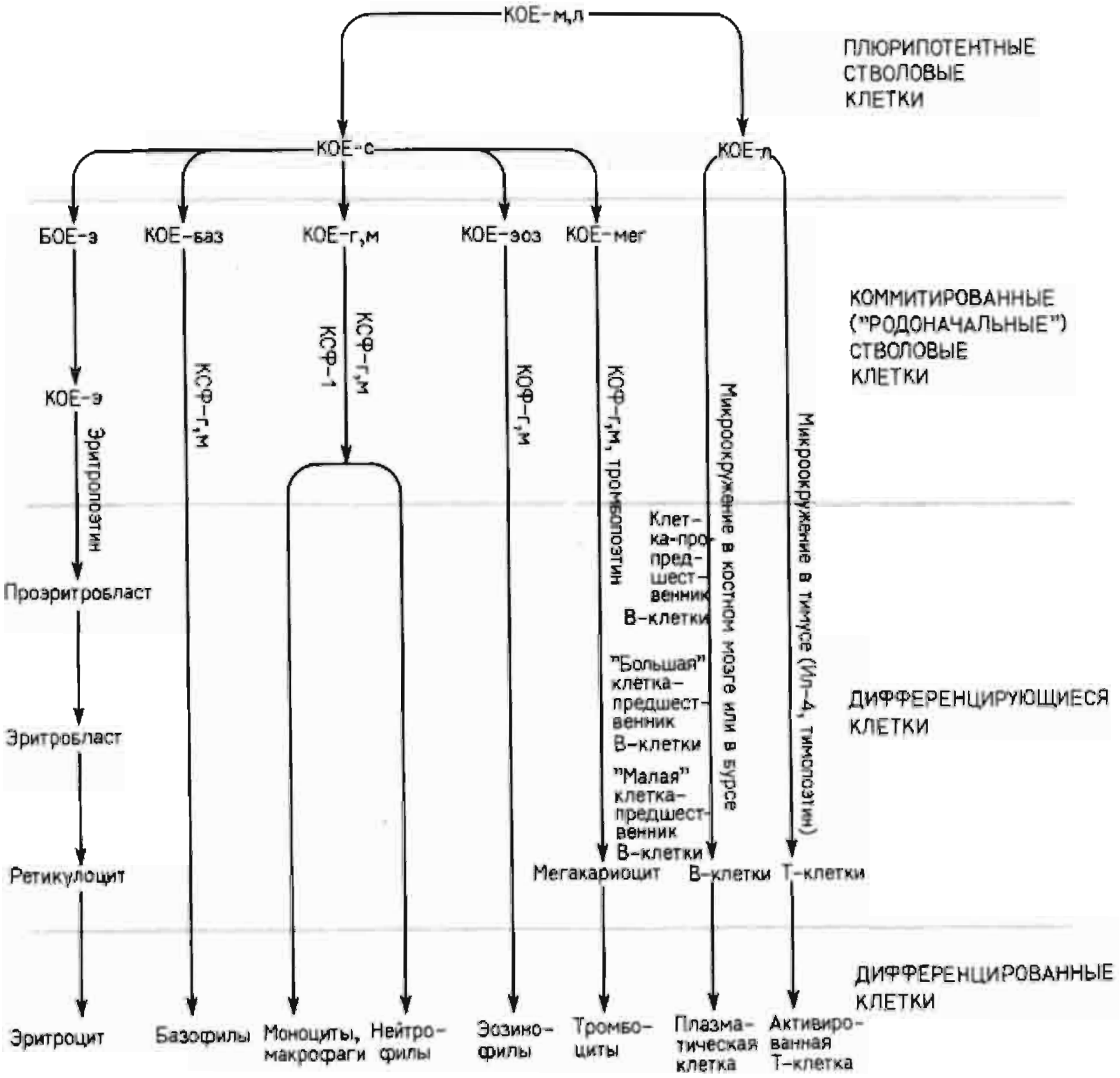


Рис. 6.35. Схема, иллюстрирующая происхождение форменных элементов крови и лимфы у млекопитающих. Факторы роста перечислены в табл. 6.1, за исключением ФР-В-клеток и ФД-В-клеток (соответственно факторов роста и дифференцировки В-клеток), которые обсуждаются в гл. 16. (По Quesenberry, Levitt, 1979; Whetton, Dexter, 1986; Muller-Sieburg et al., 1986; Clark, Kamen, 1987.) (В четвертой и пятой строках по вертикали вместо КОФ-г,м следует читать КСФ-г,м.)

из этих факторов стимулируют деление и созревание более примитивных стволовых клеток, тем самым увеличивая число форменных элементов крови всех типов. Другие факторы являются специфичными только для определенных клеточных линий. Способность клетки реагировать на эти факторы зависит от присутствия рецепторов для них на ее поверхности. Число таких рецепторов очень мало. На поверхности КОЕ-э имеется всего лишь около 700 рецепторов для эритропоэтина; большинство других кроветворных клеток характеризуется столь же низким числом рецепторов для факторов роста. (Исключение составляют рецепторы для колониестимулирующего фактора (КСФ-1), которых может быть в некоторых клетках-предшественниках до 73 000 на клетку.) Некоторые из известных гемопоэтических факторов роста и их клеточные мишени перечислены в табл. 6.1.

Таблица 6.1. Гемопоэтические факторы роста [1]

Факторы роста	Вид	Реагирующие клетки
Интерлейкин-3	Мышь	КОЕ-с, БОЕ-э КОЕ-г,м (клетка, образующая колонию гранулоцитов и макрофагов) КОЕ-эоз (клетка, образующая колонию эозинофилов) КОЕ-мег (клетка, образующая колонию мегакариоцитов) Клетки-предшественники эритроидного ряда Тучные клетки
Гемопоэтин-1	Мышь, человек	Малоэффективен сам по себе, но усиливает способность интерлейкина-3 стимулировать КОЕ-с
КСФ-г (фактор, стимулирующий образование колоний гранулоцитов)	Человек	Клетки-предшественники нейтрофилов
КСФ-1 (колониестимулирующий фактор-1)	Мышь, человек	Некоторые КОЕ-г,м клетки Предшественники макрофагов Зрелые макрофаги
Фактор, стимулирующий образование колоний гранулоцитов и макрофагов (КСФ-г,м)	Мышь	КОЕ-г,м КОЕ-эоз КОЕ-мег
Эритропоэтин	Мышь, человек	КОЕ-э
Интерлейкин-2	Мышь	Т-клетки, В-клетки
Интерлейкин-4	Мышь	Т-клетки, В-клетки
Полипоэтин	Человек	КОЕ-с КОЕ-г,м БОЕ-э
Бурсин	Курица	Клетки-предшественники В-клеток
Тимопоэтин	Курица, мышь	Клетки-предшественники Т-клеток

[1] Audhya et al. (1986); Clark, Kamen (1987); Palachios et al. (1987); Stanley et al. (1986); Whetton, Dexter (1986).

По меньшей мере часть таких факторов синтезируется клетками стромы (фибробластами или другими элементами соединительной ткани) самого костного мозга. В строме селезенки находятся клетки, коммитированные преимущественно к развитию клеток эритроидного ряда. В костном мозге преобладают клетки, развивающиеся в гранулоциты. Было показано (Wolf, Trentin, 1968), что эти результаты обусловлены короткодистантными взаимодействиями. Исследователи помещали фрагменты костного мозга в селезенку мыши, а затем инъецировали ей стволовые клетки. Колонии клеток в селезенке были преимущественно эритроидными, тогда как в костном мозге — преимущественно гранулоцитарными. Клетки же в колонии, развившейся из стволовой клетки, которая оказалась у края фрагмента костного мозга, в части колонии, находившейся в селезенке, были главным образом эритроидными, а в части, находившейся в костном мозге,— преимущественно гранулоцитарными. Области детерминации КОЕ называют **гемопоэтическим индуцирующим микроокружением**.

Бесклеточная культуральная среда, в которой росли клетки стромы, может поддерживать рост лимфоцитов и клеток-предшественников лейкоцитов, пролиферация которых зависит от определенных факторов роста (Hunt et al., 1987; Whitlock et al., 1987). Кроме того, эти факторы могут действовать, связываясь с внеклеточным матриксом в специфических участках костного мозга. Было показано (Gordon et al., 1987), что колониестимулирующий фактор (КСФ-г,м) связывается с гликозаминогликанами стромы костного мозга. Таким способом факторы роста могут компартментализоваться, стимулируя стволовые клетки в одной области к дифференцировке в один клеточный тип, а стволовые клетки того же самого типа в другой области — к дифференцировке в клетки другого типа.

Локализация гемопоэза (кроветворения)

У взрослых особей большинства млекопитающих главным источником клеток крови является костный мозг. (У некоторых видов, например у мышей, в кроветворении принимает участие и селезенка.) Однако результаты многочисленных опытов показывают, что кроветворные стволовые клетки не образуются ни в костном мозге, ни в селезенке. Они мигрируют в эти органы из других областей зародыша. На самом деле кроветворные стволовые клетки, по-видимому, поступают в них *не из собственно зародыша*, а из желточного мешка. Когда Мур с сотрудниками удаляли желточный мешок у зародышей мыши на стадиях до образования сомитов, у этих зародышей не формировались клетки крови, а в культивируемых изолированных желточных мешках наблюдались эритропоэз и образование КОЕ-с. Было показано (Moore, Metcalfe, 1970), что максимальная активность КОЕ-с в желточном мешке наблюдается на 10-й день развития. В противо-

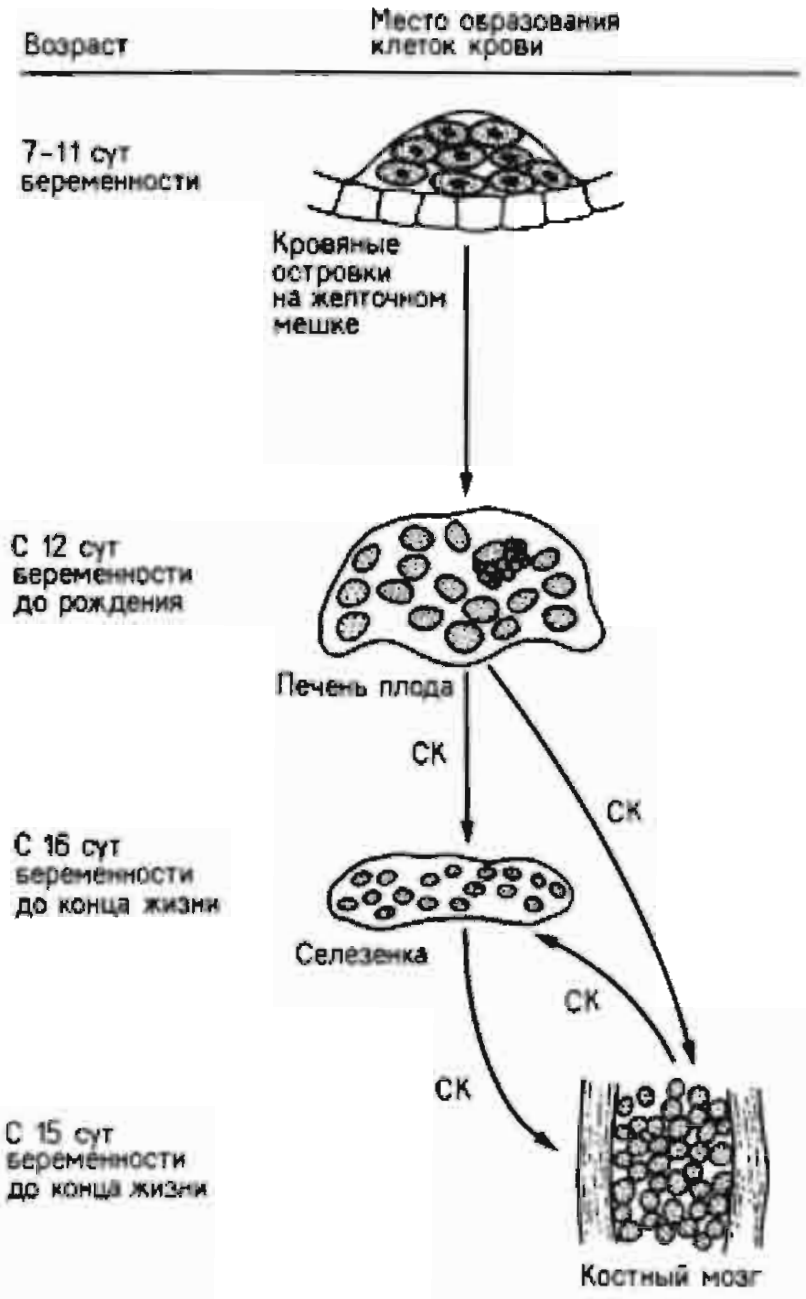


Рис. 6.36. Последовательность смены мест кроветворения у зародышей мыши. Стрелками показаны возможные пути миграции полипотентных кроветворных стволовых клеток (*СК*).

положность этому наличие стволовых клеток в печени зародыша начинает выявляться только после 11 сут. Эти исследователи утверждали, что стволовые клетки мигрируют из желточного мешка в печень зародыша, а затем в селезенку и костный мозг. Клетки желточного мешка зародыша также выполняют функции лимфоцитов до того, как начнет выявляться какая-либо активность стволовых клеток в собственно зародыше (Hofman, Globerson, 1973; Dahl et al., 1980). Таким образом, считается, что исходная полипотентная стволовая клетка образуется в пределах желточного мешка и мигрирует из него сначала в печень, а затем в кроветворные органы взрослой особи (рис. 6.36).

Современные данные подтверждают представление о том, что стволовые клетки в костном мозге взрослой особи происходят из потомков этих эмбриональных стволовых клеток. Ванг и др. (Wong et al., 1986) культивировали стволовые клетки из желточного мешка мыши и обнаружили, что некоторые из них дают начало эритроцитам, в которых синтезируется гемоглобин взрослого типа, а не эмбриональный. Напротив, результаты изучения формирования клеток крови у человека (Peschle et al., 1985) показали, что клетки печени 6-недельного зародыша совершенно так же, как клетки желточного мешка 5-недельного зародыша, синтезируют эмбриональные формы гемоглобина (рис. 6.37).

Однако другая группа исследователей (Rossant et al., 1986) утверждает, что миграция стволовых клеток может быть не столь простой, как полагали ранее. Для того чтобы определить идентичность клеточных клонов, эти исследователи использовали химерных мышей; оказалось, что большинство, если не все клоны кроветворных клеток в постнатальной печени, продуцировали только *одну* линию клеток.

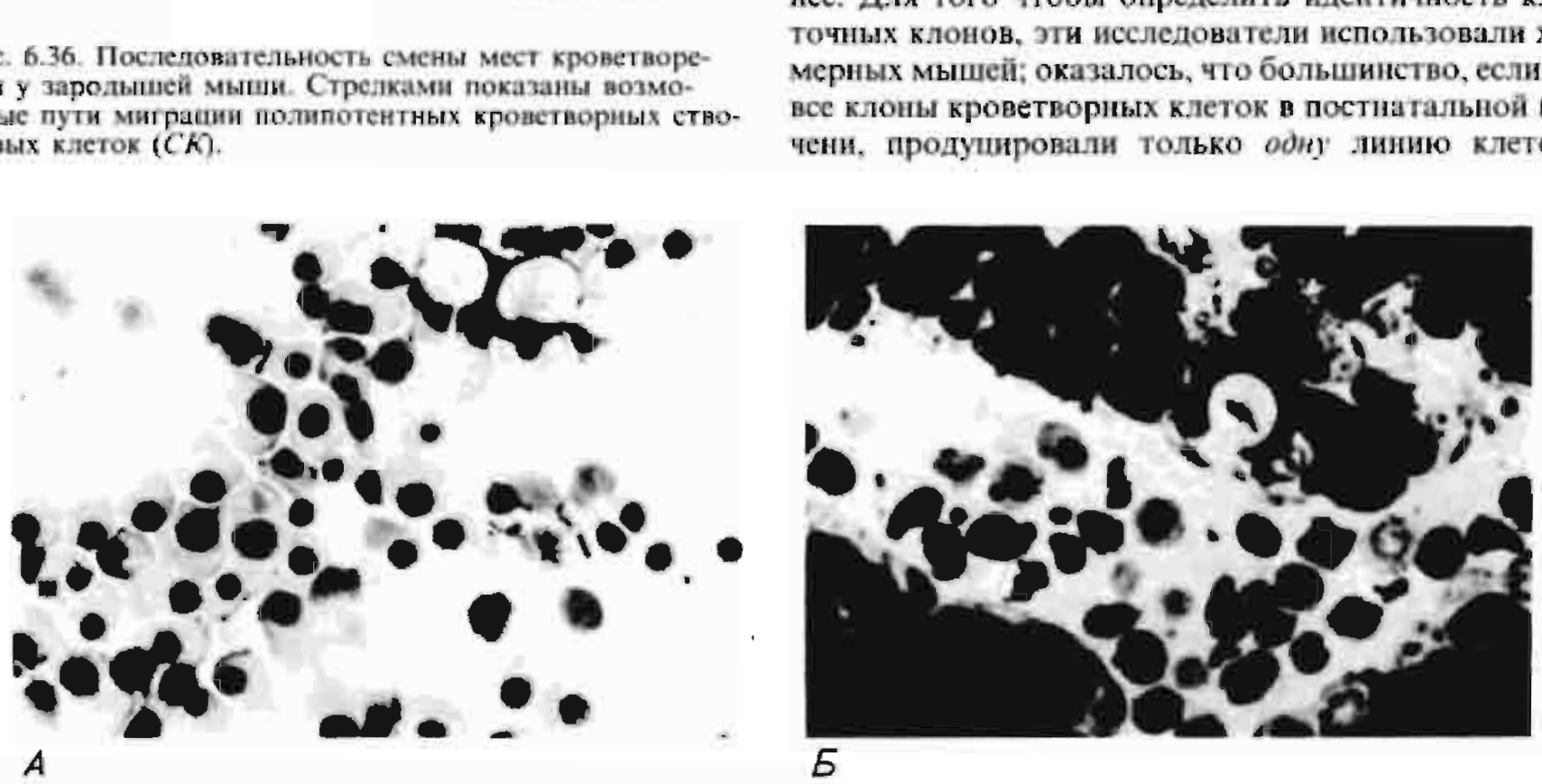


Рис. 6.37. Ранние клетки крови человека. *А*. Эритробласты из желточного мешка на сроке 5 нед после зачатия. *Б*. Срез печени 6-недельного зародыша человека; видны крупные красные кровяные клетки (мегалобласты). (Из Peschle et al., 1985; фотографии с любезного разрешения C. Peschle.)

Другими словами, данный клон был либо миелоидным, либо лимфоидным клоном. Этот результат свидетельствует либо о том, что стволовые клетки, которые мигрируют в печень из желточного мешка, являются коммитированными, а не полипотентными, либо о том, что за 17 дней, в течение которых стволовые клетки находились в печени, одна клеточная линия стала преобладающей (доминирующей). Дальнейшие исследования, по-видимому, позволят сделать выбор между этими двумя в равной степени увлекательными возможностями.

Полагают, что сходная ситуация наблюдается у зародышей птиц, но у них, видимо, имеются два разных источника кроветворных стволовых клеток. Первый, как и у зародышей млекопитающих, локализован в стенке желточного мешка. Эти клетки, однако, представляют собой временную популяцию. Главным источником стволовых клеток являются локальные островки, которые формируются в собственно зародыше. Это открытие было сделано в серии изящных опытов Дитерлен-Ливр, которая пересаживала бластодерму японского перепела на желточный мешок куриного зародыша (рис. 6.38). Клетки курицы легко отличить от клеток перепела, ядра которых значительно сильнее окрашиваются и поэтому служат постоянным маркером для различения клеток двух типов. Использование таких «химерных желточных мешков» показало (Dieterlen-Lievre, Martin, 1981), что стволовые клетки желточного мешка не поставляют клетки взрослому животному; настоящие стволовые клетки формируются в узелках мезодермы, которая выстилает брыжейки и главные кровеносные сосуды. До сих пор считают, что у млекопитающих желточный мешок является

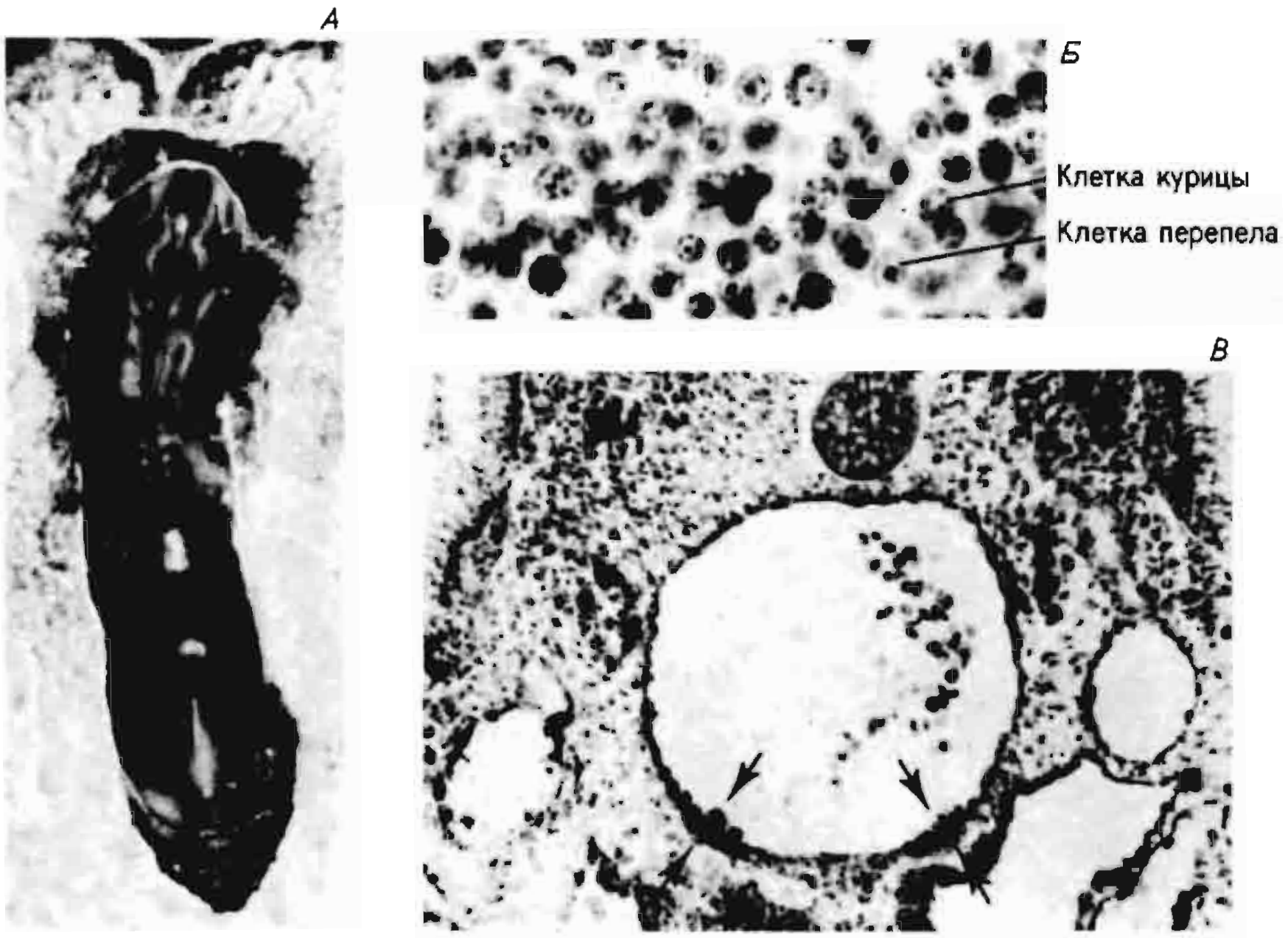


Рис. 6.38. Маркировка клеток крови посредством создания химер «курица — перепел». *А*. Фотография «химерного желточного мешка», т. е. бластодермы куриного зародыша, пересаженной на желточный мешок перепела. *Б*. Фотография, на которой видны клетки курицы и перепела в тимусе химерного животного, различающиеся по окраске ядер. Все лимфоидные клетки куриного происхождения, тогда как структурные клетки тимуса происходят из клеток бластодермы перепела. *Б*. Срез аорты трехдневного куриного зародыша; стрелками указаны клетки, которые дадут начало кроветворным стволовым клеткам. Если клетки из этой области взять у зародышей перепела и поместить на куриный зародыш, то кровь у куриного зародыша будет кровью перепела. (Из Martin et al., 1978; Dieterlen-Lievre, Martin, 1981; фотографии с любезного разрешения F. Dieterlen-Lievre.)

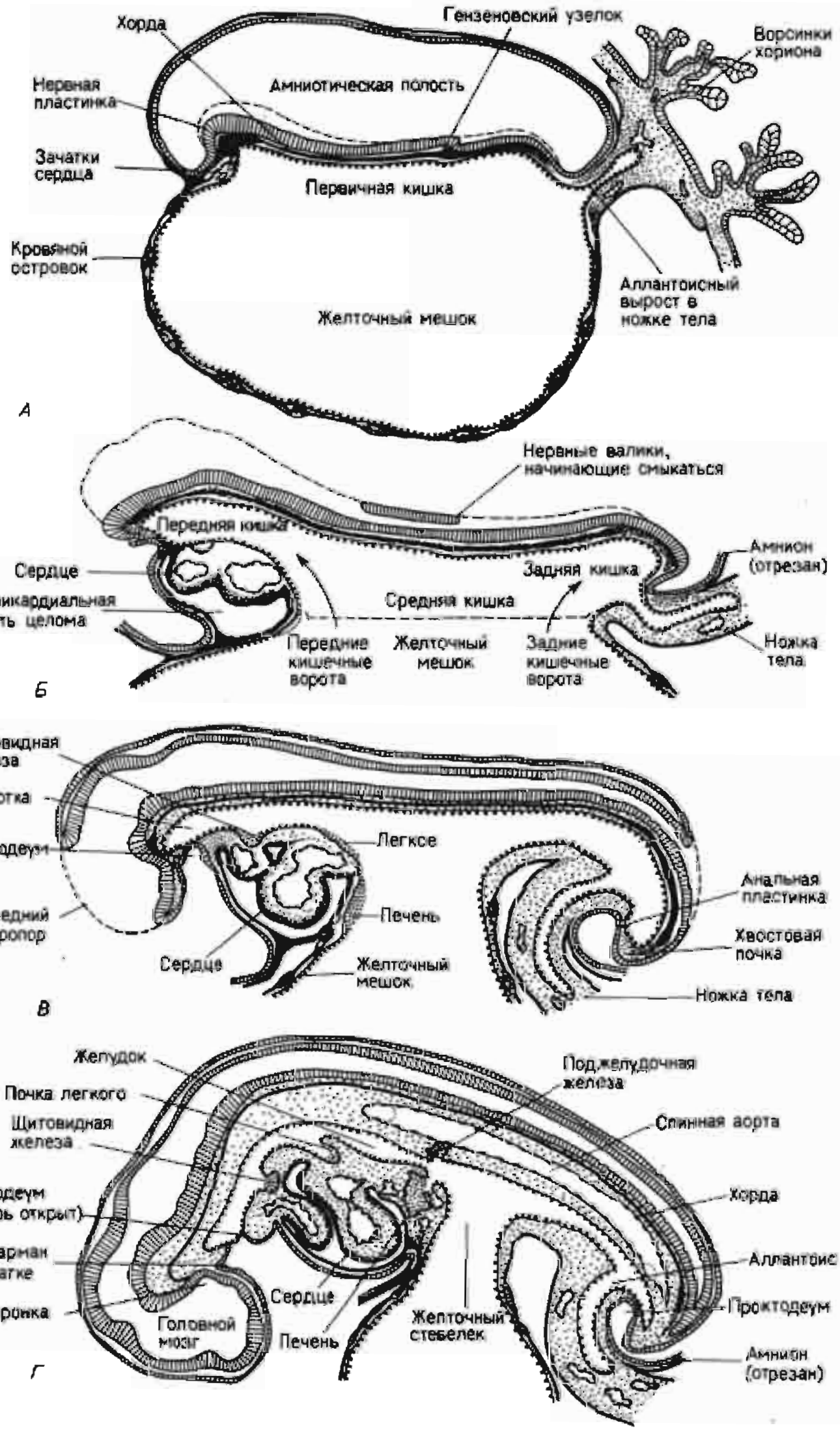


Рис. 6.39. Формирование пищеварительной системы у человека. Схематические изображения сагиттальных срезов зародышей в возрасте примерно: *А* — 16 сут; *Б* — 18 сут; *В* — 22 сут; *Г* — 28 сут. (Из Carlson, 1981.)

источником всех кроветворных стволовых клеток; однако результаты некоторых исследований (Kubai, Auerbach, 1983) показывают, что эти клетки-предшественники стволовых клеток желточного мешка сами могут происходить из стволовых клеток, которые находятся в выстилке брюшной полости.

ЭНТОДЕРМА

Из энтодермы развиваются органы пищеварения и связанные с ними железы, а также органы дыхания (рис. 6.39). По мере того как концы энтодермы загибаются в вентральном направлении и перемещаются к центру зародыша, формируются передняя кишка и задняя кишка, представляющие собой части будущей пищеварительной трубки. На месте будущего ротового отверстия образуется эктодермальное углубление — **стомодеум**, которое потом приходит в контакт со стенкой передней кишки. Область их объединения называется **ротовой пластинкой**. Эта пластинка позднее (у эмбриона человека в возрасте около 22 сут) разрывается, а стомодеум превращается в **ротовую полость**. Эктодермальный эпителий крыши ротовой полости образует выступ (карман Ратке), который растет навстречу нейральному выросту дна зачатка промежуточного мозга — воронке или инфундибулюму. Эти два эктодермальных зачатка взаимодействуют друг с другом и вместе образуют гипофиз. Из кармана Ратке развивается железистая часть гипофиза, а из воронки — его нервная часть. Таким образом, гипофиз имеет двойное происхождение, и эта двойственная природа гипофиза отражается на его функции во взрослом организме.

Энтодермальная часть пищеварительной трубки начинается в глотке. Здесь у зародыша млекопитающих образуются четыре **глоточных кармана**. Борозды между этими карманами иногда называют **жаберными щелями**, потому что они напоминают такие же структуры у зародышей рыб (рис. 6.40). Однако вместо того, чтобы дать начало жабрам, развитие глоточных карманов у млекопитающих изменилось в соответствии с наземной средой обитания. Первая пара глоточных карманов преобразуется в слуховые полости среднего уха и связанные с ними евстахиевы трубы. Из второй пары карманов развиваются стенки миндалин. Тимус образуется из третьей пары глоточных карманов. На более поздних стадиях развития эта железа будет обеспечивать дифференцировку лимфоцитов. Из этой же пары глоточных карманов происходит одна пара парашитовидных желез, а вторая их пара возникает из четвертой пары глоточных карманов. В дополнение к этим парным карманам между глоточными карманами второй пары на дне глотки формируется маленький центрально расположенный вырост (дивертикул). Этот энтодермально-мезенхимный дивертикул отпочковывается

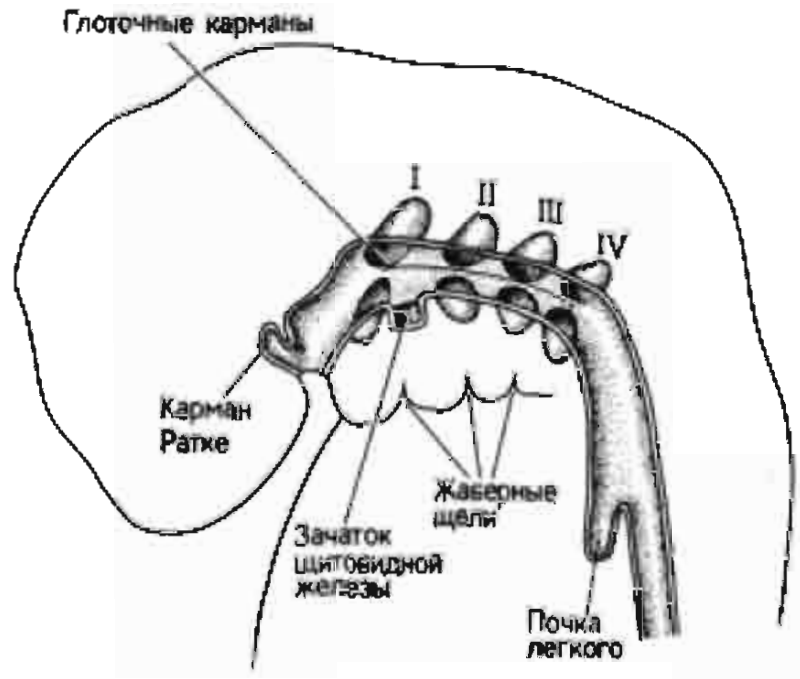


Рис. 6.40. Глоточные карманы и жаберные щели у 5-недельного зародыша человека. (По Carlson, 1981.)

от глотки и мигрирует в область шеи, где дифференцируется в щитовидную железу. Здесь же от стенки глотки отшнуровывается зачаток дыхательной трубки — ларинготрахеальная борозда.

Пищеварительная трубка и ее производные

Позади глотки пищеварительная трубка сужается, переходя в пищевод, за которым следуют желудок, тонкий кишечник и толстый кишечник. Энтодермальные клетки образуют только выстилку пищеварительной трубки и ее желез, тогда как мезодермальные мезенхимные клетки, которые окружают эту трубку, дифференцируются в мышцы, обеспечивающие перистальтику.

На рис. 6.41 видно, что желудок развивается подобно глотке, как расширенный участок трубки. Каудальнее формируется кишечник, и связь между ним и желточным мешком в конечном счете прерывается. На каудальном конце кишечника возникает углубление, в котором энтодерма встречается с лежащим над ней покровным эпителием. Тонкая **клоакальная мембрана** разделяет эти две ткани. Впоследствии она разрывается, и образуется отверстие, которое станет анальным.

Печень, поджелудочная железа и желчный пузырь

Энтодерма также образует выстилку трех дополнительных органов, которые развиваются непосредственно за желудком, каудальнее его. **Печеночный дивертикул** представляет собой энтодермальную трубку, которая простирается от передней кишки в окружающую мезенхиму. Мезенхима индуцирует

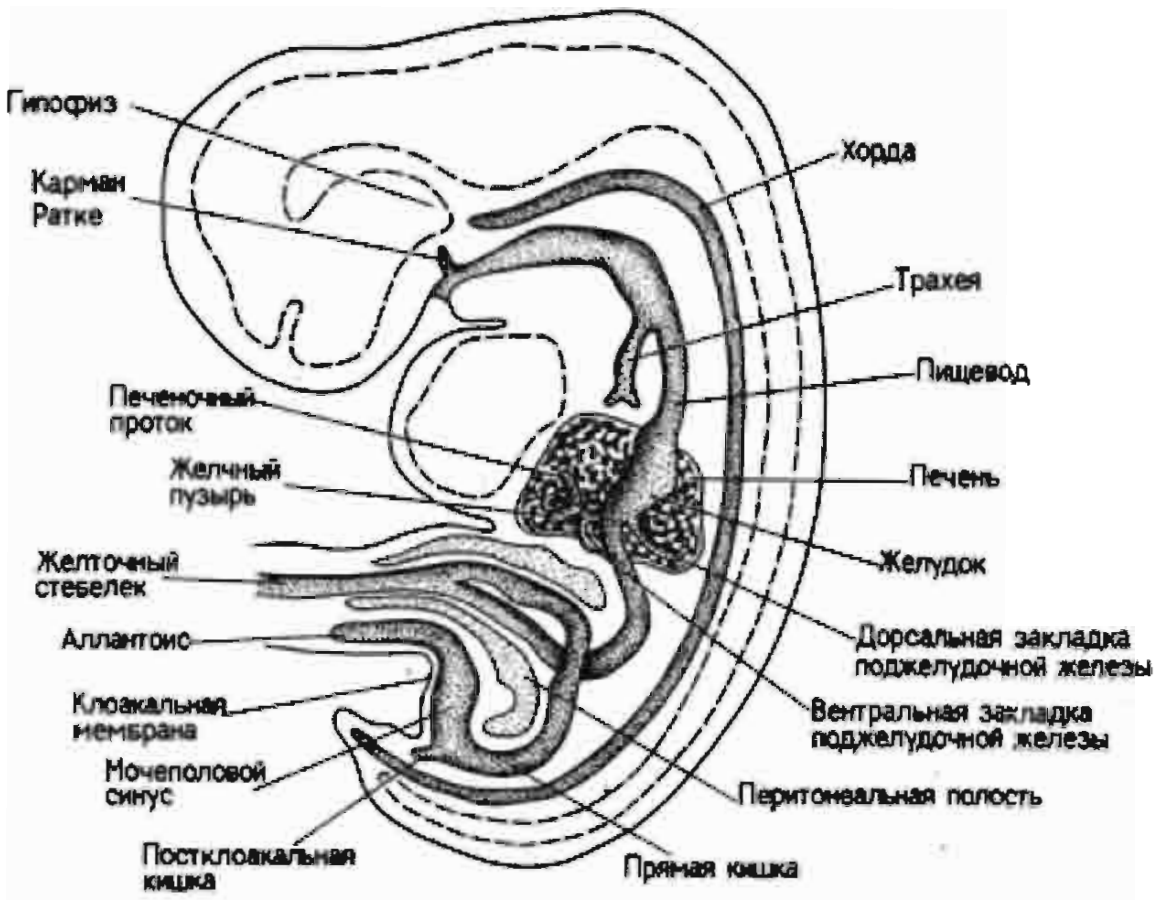


Рис. 6.41. Пищеварительная система 6-недельного зародыша человека. Область желудка в пищеварительной трубке начала расширяться; поджелудочная железа представлена двумя закладками, которые впоследствии сольются. (По Langman, 1981.)

энтодерму, которая в ответ на ее воздействие пролиферирует, ветвится и формирует железистый эпителий печени. Часть печеночного дивертикула (область, ближайшая к пищеварительной трубке) продолжает функционировать как дренажный проток печени, а из ответвления от этого протока образуется желчный пузырь (рис. 6.42).

Поджелудочная железа развивается в результате слияния четко выраженных дорсального и вентрального дивертикулов. Оба этих зачатка возникают из области энтодермы, расположенной непосредственно за желудком; по мере их роста они сближаются и в конце концов сливаются. У взрослого человека сохраняется только вентральный проток, несущий

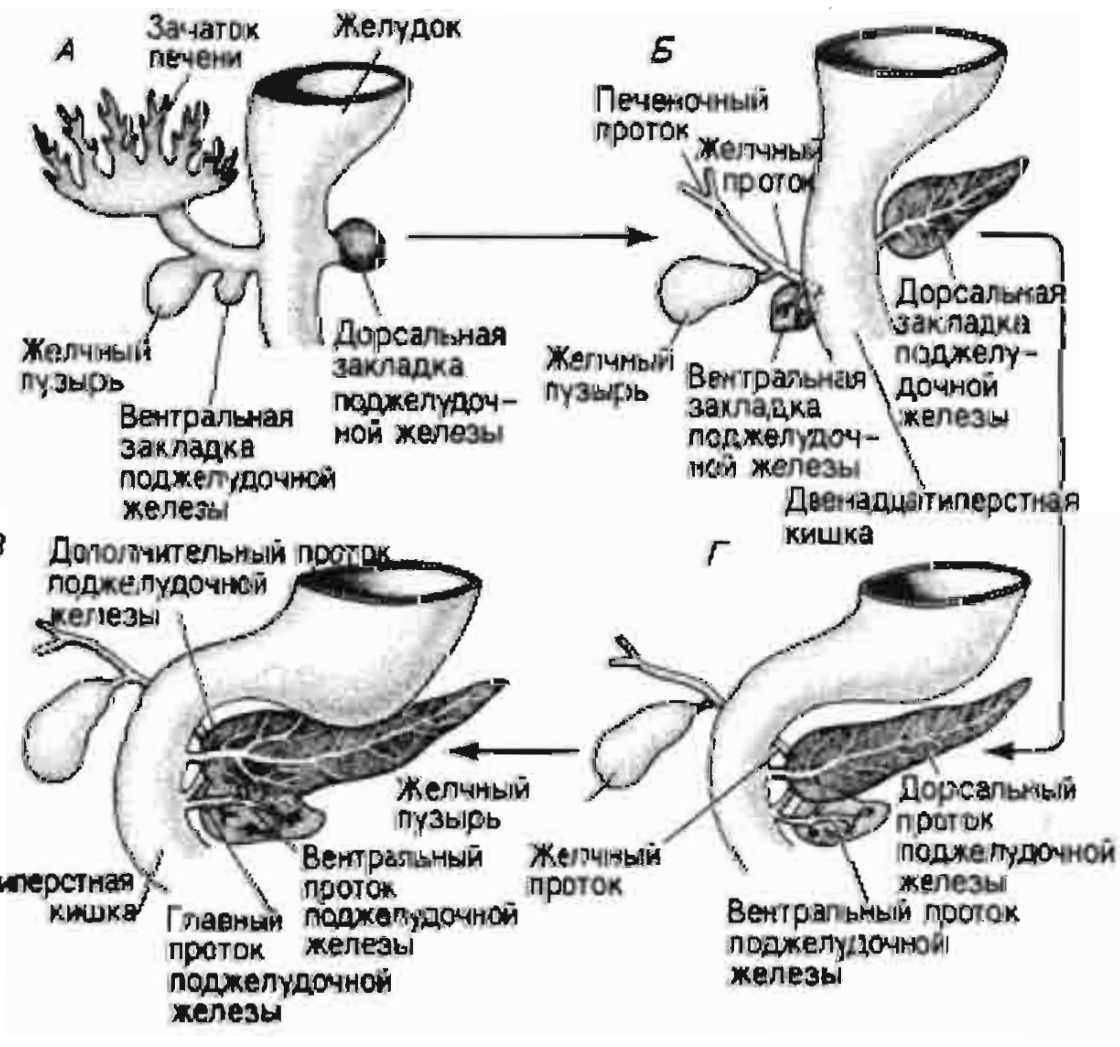


Рис. 6.42. Развитие поджелудочной железы у человека. На 30 сут развития зародыша (*А*) вентральная закладка поджелудочной железы расположена вблизи зачатка печени. К 35 сут железа начинает мигрировать назад. (*Б*). В течение шестой недели развития вентральная закладка поджелудочной железы приходит в контакт с дорсальной закладкой (*В*). У большинства людей дорсальная закладка железы утрачивает свой проток в двенадцатиперстную кишку. Однако примерно у 10% популяции сохраняется система двух протоков (*Г*). (По Langman, 1969.)



Рис. 6.43. Разделение передней кишки на пищевод и дыхательный дивертикул (трахею) в течение третьей и четвертой недель беременности у человека. *А*. Вид сбоку (конец третьей недели). *Б*, *В*. Вид с брюшной стороны (четвертая неделя беременности). (*По* Langman, 1969.)

пищеварительные ферменты в кишечник. У других видов (например, у собак) оба протока — дорсальный и вентральный — открываются в кишечник.

Дыхательная трубка

Легкие также являются производными пищеварительной трубки, хотя они совсем не участвуют в пищеварении. В центре задней области глотки между четвертой парой глоточных карманов появляется **ларинго-трахеальная борозда,** которая тянется по вентральной поверхности передней кишки (рис. 6.43). Эта борозда затем раздваивается на две главные ветви, которые образуют легкие. Ларинготрахеальная энтодерма становится выстилкой трахеи, двух бронхов и воздушных мешков (альвеол) легких. Как мы увидим в одной из последующих глав, ветвление этой энтодермальной трубки зависит от взаимодействий между разными типами мезодермальных клеток на ее пути.

Легкие являются эволюционным новшеством, и они последними из органов млекопитающих завершают свою дифференцировку. Легкие должны быть способны к поглощению кислорода с первым вдохом ребенка. Чтобы это осуществить, альвеолярные клетки секретируют в жидкость, омывающую легкие, поверхностноактивное вещество — **сурфактант**. Этот сурфактант, состоящий из фосфолипидов, таких, как сфингомиелин и лецитин, секретируется на поздних стадиях беременности, и необходимый физиологически полезный уровень их содержания достигается у человека обычно на 34-й неделе беременности. Эти вещества дают альвеолярным клеткам возможность соприкасаться не слипаясь. Дети, родившиеся преждевременно, часто испытывают затруднения в дыхании, и их приходится держать в респираторных камерах (где длительное время поддерживается искусственное дыхание) до тех пор, пока не созревают клетки, секретирующие сурфактант.

Дополнительные сведения и гипотезы

Тератокарцинома

Половая клетка млекопитающих или ранний бластомер содержит в себе всю информацию, необходимую для последующего развития. Что может случиться, если такая клетка станет злокачественной? В этом случае возникает **тератокарцинома**. Опухоли этого типа иногда спонтанно развиваются в яичнике или в семеннике. Образование тератокарцином можно вызвать экспериментально, имплантируя бластоцисту не в матку, а в иное место (например, внутрь соединительнотканной капсулы, окружающей почку). Независимо от того, возникла ли тератокарцинома спонтанно или в результате экспериментального вмешательства, она содержит популяцию недифференцированных стволовых клеток, которые по биохимическим свойствам и по способностям к развитию похожи на клетки внутренней клеточной массы (Graham, 1977). Эти стволовые клетки (называемые клетками эмбриональной карциномы) не только делятся, но могут также дифференцироваться в самые разнообразные ткани, в том числе в кишечный и дыхательный эпителий, мышечную, нервную, хрящевую и костную ткани (рис. 6.44). Образующиеся дифференцированные клетки больше не делятся и потому не являются злокачественными. Итак, эти опухоли могут дать начало самым разнообразным тканям, встречающимся в организме.

Эмбриональные карциномы можно переносить из одной мыши в другую; их клетки можно индуцировать к образованию **эмбриоидных тел**, инъецируя эти клетки в перитонеальную (брюшную) полость,

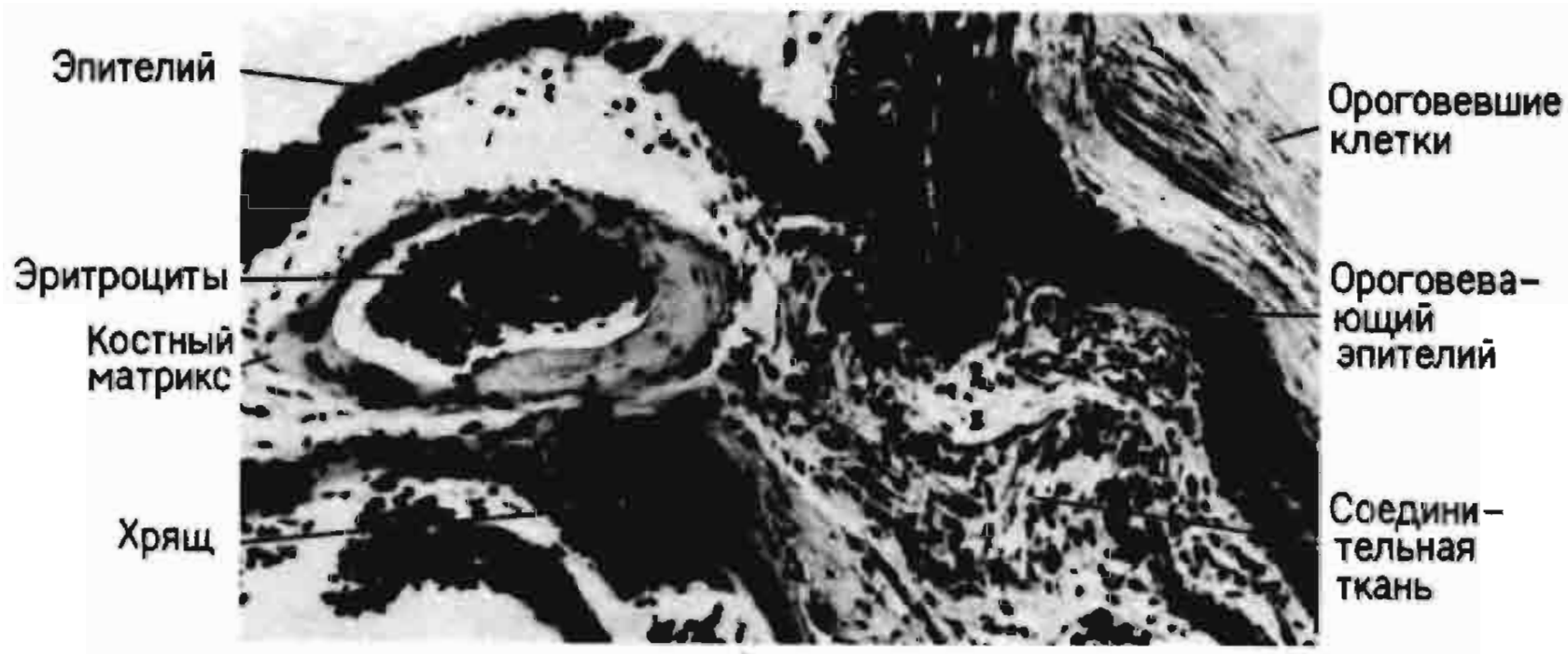


Рис. 6.44. Микрофотография среза карциномы. Видны дифференцированные клетки многих типов. (Из Gardner, 1982; фотография из C. Graham с любезного разрешения R. L. Gardner.)

где затем появляются аморфные скопления дифференцированных клеток (в том числе кроветворные колонии) в «энтодерме» (рис. 6.45). Было показано (Adamson et al., 1977), что эта «энтодерма» способна синтезировать α-фетопротеин, белок, обычно синтезируемый нормальными энтодермальными клетками млекопитающих. Следовательно, клетки эмбриональной карциномы имитируют раннее развитие млекопитающих, но развитие формируемой ими опухоли имеет случайный, неупорядоченный характер.

Эти опухоли, вероятно, происходят из половых клеток, однако по своим биохимическим, морфологическим и поверхностным свойствам образующие ее клетки напоминают бластомеры внутренней клеточной массы. Стюарт и Минц (Stewart, Mintz, 1981) получили мышь из клеток, часть которых происходила из стволовой клетки тератокарциномы! Стволовые клетки из тератокарциномы мышей линии агути культивировали в течение нескольких клеточных поколений и убедились, что они сохраняют хромосомный набор, характерный для родительской мыши. Затем изолированные стволовые клетки этого типа инъецировали в бластоцисты белых мышей. Бластоцисты переносили в матку приемной матери, которая родила живых мышат. Шкурки у некоторых мышат были двухцветными; это свидетельствовало о включении опухолевой клетки в развитие зародыша (рис. 6.46). Более того, когда химерную мышь спаривали с мышью, несущей соответствующий маркер, некоторые из рожденных ею мышат имели черты, характерные для фенотипа опухолевого «родителя». Злокачественная клетка эмбриональной карциномы образовала многие, если не все, типы нормальных соматических клеток и даже нормально функционирующие половые клетки! Если спаривали

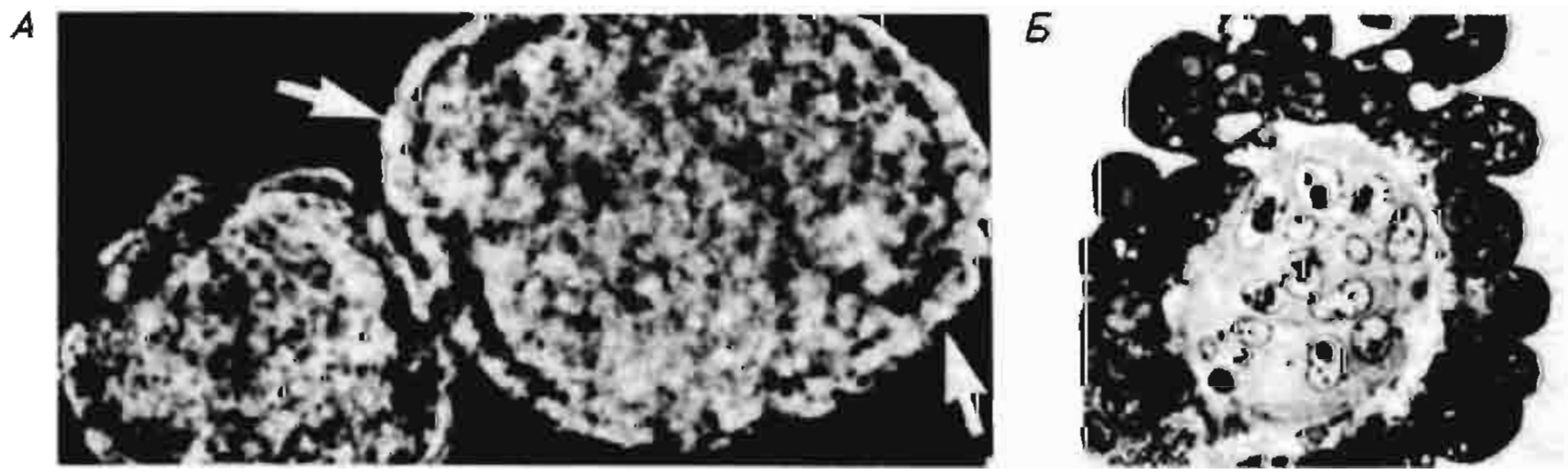


Рис. 6.45. Эмбриоидные тела. *А*. Живые эмбриоидные тела в культуре (фотографирование с помощью фазово-контрастного устройства). Стрелки указывают области, в которых можно видеть клетки двух разных типов (внутренние и наружные). *Б*. Срез такого эмбриоидного тела; препарат окрашен гематоксилином и эозином. Стволовые клетки (*в центре*) окружены клетками, очень напоминающими раннюю эмбриональную энтодерму. (Фотографии с любезного разрешения G. Martin.)

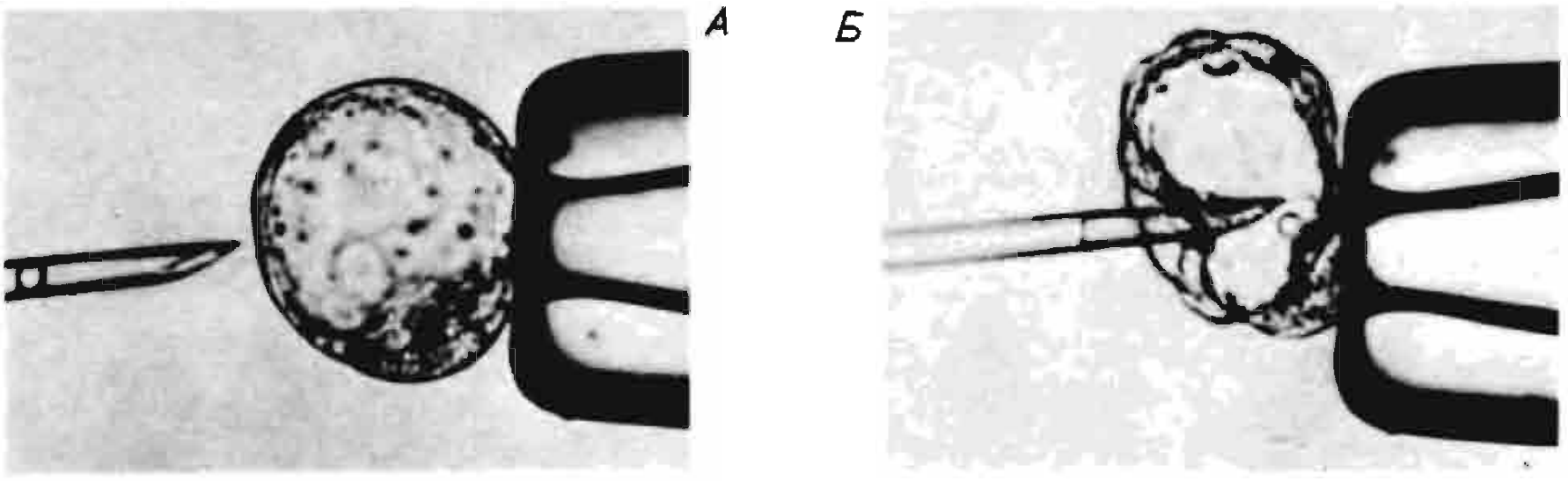


Рис. 6.46. Введение клетки эмбриональной карциномы в бластоцисту мыши. *А*. Микропипетка со стволовой клеткой тератокарциномы приближается к бластоцисте, прочно удерживаемой обычной пипеткой. *Б*. Инъекция стволовой клетки во внутреннюю клеточную массу. *В*. Мыши, развившиеся в опыте, в котором стволовая клетка тератокарциномы из черной линии мышей интегрировалась во внутреннюю клеточную массу бластоцисты мышей белой линии. На голове и спине мышей можно видеть черный мех, указывающий на то, что по крайней мере пигментные клетки были опухолевого происхождения. (*А* и *Б* — с любезного разрешения K. Illmensee, *В* — из Papaioannuou, 1979; фотография с любезного разрешения V. E. Papaioannou.)

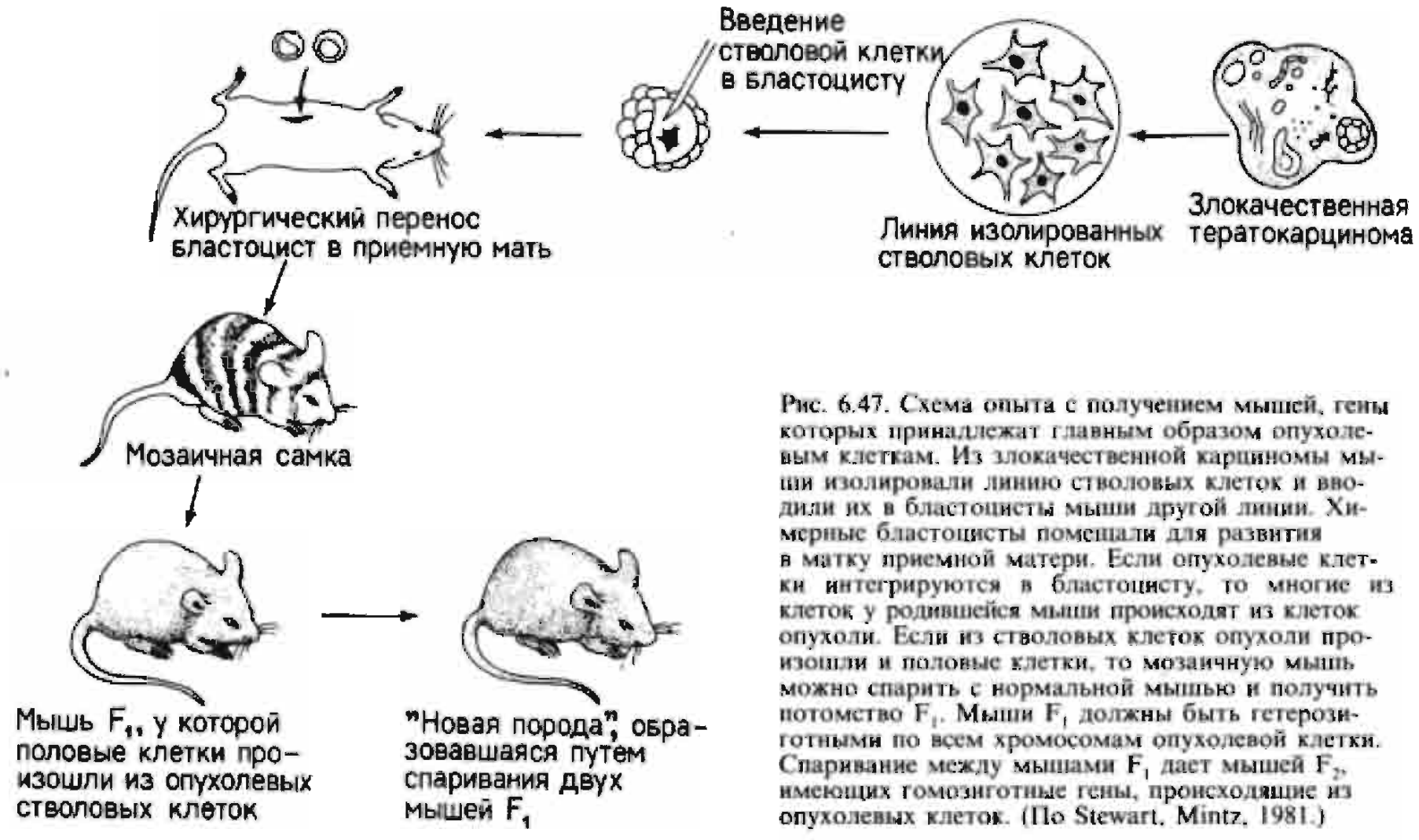


Рис. 6.47. Схема опыта с получением мышей, гены которых принадлежат главным образом опухолевым клеткам. Из злокачественной карциномы мыши изолировали линию стволовых клеток и вводили их в бластоцисты мыши другой линии. Химерные бластоцисты помещали для развития в матку приемной матери. Если опухолевые клетки интегрируются в бластоцисту, то многие из клеток у родившейся мыши происходят из клеток опухоли. Если из стволовых клеток опухоли произошли и половые клетки, то мозаичную мышь можно спарить с нормальной мышью и получить потомство F_1. Мыши F_1 должны быть гетерозиготными по всем хромосомам опухолевой клетки. Спаривание между мышами F_1 дает мышей F_2, имеющих гомозиготные гены, происходящие из опухолевых клеток. (По Stewart, Mintz, 1981.)

мышей, получивших опухолевую клетку от одного из родителей, то в потомстве оказывались мыши, гомозиготные по большому числу генов опухолевой клетки (рис. 6.47).

Поскольку культивирование ранних зародышей млекопитающих является трудной задачей, клетки эмбриональной карциномы дают исследователям уникальную возможность для анализа раннего развития млекопитающих. Кроме того, благодаря способности клеток эмбриональной карциномы мутировать в культуре при инъекции таких клеток в бластоцисты можно также создать мышей, мутантных почти по любому гену.

На этом мы завершим обзор основных черт развития животных и обратимся к механизмам, которые делают возможным это развитие. Во втором томе книги мы рассмотрим различные способы, с помощью которых осуществляется дифференцировка клеток, а третий том будет посвящен вопросам взаимодействия клеток между собой при формировании тканей и органов.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

Abramson S., Miller R. G., Phillips R. A. (1977). The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. J. Exp. Med. **145**, 1567—1579.

Adamson E., Evans M. J., Magrane G. G. (1977). Biochemical markers of the progress of differentiation in cloned teratocarcinoma cell lines. Eur. J. Biochem. **79**, 607—615.

Ash P. J., Loutit J. F., Townsend K. M. S. (1980). Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. Nature **283**, 669—670.

Audhya T., Kroon D., Heavner G., Viamontes G., Goldstein G. (1986). Tripeptide structure of bursin, a selective B cell-differentiating hormone of the bursa of Fabricius. Science **231**, 987—999.

Auerbach R., Alby L., Morrissey L., Tu M., Joseph J. (1985). Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. Microvasc. Res. **29**, 401—411.

Ausprunk D. H., Folkman J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc. Res. **14**, 53—65.

Bandman E. (1985). Continued expression of neonatal myosin heavy chain in adult dystrophic skeletal muscle. Science **127**, 780—782.

Baron R., Neff L., Louvard D., Courtoy P. J. (1985). Cell mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing lacuna and localization of a 100 kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. J. Cell Biol. **101**, 2210—2222.

Baron R., Neff L., Roy C., Boisvert A., Caplan M. (1986). Evidence for a high and specific concentration of (Na^+, K^+) ATPase in the plasma membrane of the osteoclast. Cell **46**, 311—320.

Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen cells derived from transplanted mouse marrow cells. Nature **197**, 452—454.

Blair H. C., Kahn A. J., Crouch E. C., Jeffrey J. J., Teitelbaum S. L. (1986). Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. J. Cell Biol. **102**, 1164—1172.

Bloom W., Fawcett D. W. (1975). Textbook of Histology, 10th Ed. Saunders, Philadelphia.

Bonner P. H., Hauschka S. D. (1974). Clonal analysis of vertebrate myogenesis. I. Early developmental events in the chick limb. Dev. Biol. **37**, 317—328.

Brighton C. T. (1984). The growth plate. Orthoped. Clin. N. A. **15**, 571—594.

Brighton C. T., Hunt R. M. (1974). Mitochondrial calcium and its role in calcification. Clin. Orthop. **100**, 406—416.

Buckley P. A., Konigsberg I. R. (1974). Myogenic fusion and the postmitotic gap. Dev. Biol. **37**, 193—212.

Caplan A. I., Fiszman M. Y., Eppenberger H. M. (1983). Molecules and cell isoforms during development. Science **221**, 923—927.

Carlson B. M. (1981). Patten's Foundations of Embryology. McGraw-Hill, New York.

Cheney C. M., Lash J. W. (1984). An increase in cell—cell adhesion in the chick segmental plate results in meristic pattern. J. Embryol. Exp. Morphol. **79**, 1—10.

Chevallier A., Kieny M., Mauger A., Sengel P. (1977). Developmental fate of the somitic mesoderm in the chick embryo. In: D. A. Ede, J. R. Hinchliffe and M. Balls (eds.), Vertebrate Limb and Somite Morphogenesis. Cambridge University Press, Cambridge, PP. 421—432.

Clark S. C., Kamen R. (1987). The human hematopoietic colony stimulating factors. Science **236**, 1229—1237.

Dahl C. A., Kahan B. W., Auerbach R. (1980). Studies with mouse embryonic yolk sac cells: An approach to understanding the patterns of ontogeny of cell-mediated immune functions. In: J. D. Horton (ed.), Development and Differentiation of Vertebrate Lymphocytes, Elsevier North-Holland, Amsterdam, pp. 241—253.

Daubas P., Caput D., Buckingham M., Gros F. (1981). A comparison between the synthesis of the contractile proteins and the accumulation of their translatable mRNAs during calf myoblast differentiation. Dev. Biol. **84**, 133—143.

David J. D., See W. M., Higginbotham C. A. (1981). Fusion of chick embryo skeletal myoblasts: Role of calcium influx preceding membrane union. Dev. Biol. **82**, 297—307.

DeHaan R. (1959). *Cardia bifida* and the development of pacemaker function in the early chicken heart. Dev. Biol. **1**, 586—602.

DeHaan R. L. (1967). Regulation of spontaneous activity and growth of embryonic chick heart cells in tissue culture. Dev. Biol. **16**, 216—249.

Dereszewski G., Howell D. S. (1978). The role of matrix vesicles in calcification. Trends Biochem. Sci. **4**, 151—153.

Devlin R. B., Emerson C. P., Jr. (1978). Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation. Cell **13**, 599—611.

Devlin R. B., Emerson C. P., Jr. (1979). Coordinate accumulation of contractile protein mRNAs during myoblast differentiation. Dev. Biol. **69**, 202—216.

Dieterlen-Lievre F., Martin C. (1981). Diffuse intraembryonic hemopoiesis in normal and chimeric avian development. Dev. Biol. **88**, 180—191.

Fett J. W., Strydom D. J., Lubb R. R., Alderman E. M., Bethune J. L., Riordan J. F., Vallee B. L. (1985). Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenin protein from human carcinoma cells. Biochem. **24**, 5480—5486.

Folkman J. (1974). Tumor angiogenesis. Adv. Cancer Res. **19**, 331—358.

Folkman J., Langer R., Linhardt R. J., Haudenschild C., Taylor S. (1983). Angiogenesis inhibition and tumor regression caused heparin or heparin fragment in the presence of cortisone. Science **221**, 719—725.

Gardner R. L. (1982). Manipulation of development. In: C. R. Austin and R. V. Short (eds.), Embryonic and Fetal Development, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 159—180.

Gordon M. Y., Riley G. P., Watt S. M., Greaves M. F. (1987). Compartmentalization of a haematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. Nature **326**, 403—405.

Craham C. F. (1977). Teratocarcinoma cells and normal mouse embryogenesis. In: M. I. Sherman (ed.), Concepts in Mammalian Embryogenesis. MIT Press, Cambridge, Mass., pp. 315—394.

Cräper L. (1907). Untersuchungen über die Herzbildung der Vögel. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **24**, 375—410.

Harary I., Farley W. (1963). In vitro studies on single beating rat heart cells. II. Intercellular communication. Exp. Cell Res. **29**, 466—474.

Hay E. (1966). Regeneration. Holt, Rinehart &Winston, New York.

Hofman F., Groberson A. (1973). Graft-versus-host response induced in vitro by mouse yolk sac cells. Fur. J. Immunol. **3**, 179—181.

Humphries M. J., Oldern K., Yamada K. M. (1986). A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis in murine melanoma cells. Science **233**, 467—470.

Humphries R. K., Jacky P. B., Dill F. J., Eaves A. C., Eaves C. J. (1979). CFUs in individual erythroid colonies derived in vitro from adult mature mouse marrow. Nature **279**, 718—720.

Hunt P., Robertson D., Weiss D., Rennick D., Lee F., Witte O. N. (1987). A single bone marrow stromal cell type supports the in vitro growth of early lymphoid and myeloid cells. Cell **48**, 997—1007.

Jimenez J. J., Yunis A. A. (1987). Tumor cell rejection through terminal cell differentiation. Science **238**, 1278—1280.

Jockusch M., Jockusch B. M. (1980). Structural organization of the Z-line protein, α-actinin, in developing skeletal muscle cells. Dev. Biol. **75**, 231—238.

Jurišková V., Tkadleček L. (1965). Character of primary and secondary colonies of haematopoiesis in the spleen of irradiated mice. Nature **206**, 951—952.

Kahn A. J., Simmons D. J. (1975). Investigation of cell lineage in bone using a chimaera of chick and quail embryonic tissue. Nature **258**, 325—327.

Kalderon N., Gilula N. B. (1979). Membrane events involved in myoblast fusion. J. Cell Biol. **81**, 411—425.

Kaufman S. J., Foster R. F. (1985). Remodeling of the myoblast membrane accompanies development. Dev. Biol. **110**, 1—14.

Keller G., Paige C., Gilboa E., Wagner E. F. (1985). Expression of a foreing gene in myeloid and lymphoid cells derived from multipotent hematopoietic precursors. Nature **318**, 149—154.

Knudsen K. A. (1985). The calcium-dependent myoblast adhesion that precedes cell fusion is mediated by glycoproteins. J. Cell Biol. **101**, 891—897.

Konigsberg I. R. (1963). Clonal analysis of myogenesis. Science **140**, 1273—1284.

Kramer R. H., Nicolson G. L. (1979). Interaction of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: A model for metastatic invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5704—5708.

Kramer T. C. (1942). The partitioning of the truncus and conus and the formation of the membranous portion of the intraventricular septum in the human heart. Am. J. Anat. **71**, 343—370.

Krantz S. B., Goldwasser E. (1965). On the mechanism of erythropoietin induced differentiation. II. The effect on RNA synthesis. Biochim. Biophys. Acta **103**, 325—332.

Kubai L., Auerbach R. (1983). A new source of embryonic lymphocytes in the mouse. Nature **301**, 154—156.

Langer R., Conn H., Vacantai J., Haudenschild C., Folkman J. (1980). Control of tumor growth in animals by infusion of an angiogenesis inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 4331—4335.

Langman J. (1969). Medical Embryology, 3rd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Langman J. (1981). Medical Embryology, 4th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

Lash J. W., Seitz A. W., Cheney C. M., Ostrovsky D. (1984). On the role of fibronectin during the compaction stage of somitogenesis in the chick embryo. J. Exp. Zool. **232**, 197—206.

Lash J. W., Yamada K. M. (1986). The adhesion recognition signal of fibronectin: A possible trigger mechanism for compaction during somitogenesis. In: R. Bellairs, D. H. Ede, J. W. Lash (eds.), Somites in Developing Embryos. Plenum, New York, pp. 201—208.

Lemischka I. R., Raulet D. H., Mulligan R. C. (1986). Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. Cell **45**, 917—927.

Linask K. K., Lash J. W. (1986). Precardiac cell migration: Fibronectin localization at mesoderm—endoderm interface during directional movement. Dev. Biol. **114**, 87—101.

Lipton B. H., Jacobson A. G. (1974). Analysis of normal somite development. Dev. Biol. **38**, 73—90.

Lough J., Bischoff R. (1977). Differentiation of creatine phosphokinase during myogenesis: Quantitative fractionation of isozymes. Dev. Biol. **57**, 330—344.

Martin C., Beaupain D., Dieterlen—Lievre F. (1978). Developmental relationships between vitelline and intraembryonic haemopoiesis studied in avian yolk sac chimeras. Cell Differ. **7**, 115—130.

Meier S. (1979). Development of the chick mesoblast: Formation of the embryonic axis and the establishment of the metameric pattern. Dev. Biol. **73**, 25—45.

Mintz B., Baker W. W. (1967). Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **58**, 592—598.

Moore M. A. S., Metcalfe D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: Yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. Br. J. Haematol. **18**, 279—296.

Muller-Sieburg C. E., Whitlock C. A., Weissman I. L. (1986). Isolation of two early B lymphocyte progenitors from mouse marrow: A committed pre-pre-B cell and a clonogenic Thy-1^{lo} hematopoietic stem cell. Cell **44**, 653—662.

Murphy M. E., Carlson E. C. (1978). Ultrastructural study of developing extracellular matrix in vitelline blood vessels of the early chick embryo. Am. J. Anat. **151**, 345—375.

Muthukkaruppan V. R., Auerbach R. (1979). Angiogenesis in the mouse cornea. Science **205**, 1416—1418.

Nameroff M., Munar E. (1976). Inhibition of cellular differentiation by phospholipase C. II. Separation of fusion and recognition among myogenic cells. Dev. Biol. **49**, 288—293.

Nicolson G. L., Irimura T., Gonzalez R., Ruoslahti E. (1981). The role of fibronectin in adhesion of metastatic melanoma cells to endothelial cells and their basal lamina. Exp. Cell Res. **135**, 461—465.

O'Neill M. C., Stockdale F. E. (1972). Differentiation without cell division in cultured skeletal muscle. Dev. Biol. **29**, 410—418.

Ossowski L., Reich E. (1983). Antibodies to plasminogen activator inhibit tumor metastasis. Cell **35**, 611—619.

Ostrovsky D., Cheney C. M., Seitz A. W., Lash J. W. (1984). Fibronectin distribution during somitogenesis in the chick embryo. Cell Differ. **13**, 217—223.

Packard D. S., Meier S. (1983). An experimental study of somitomeric organization of the avian vegetal plate. Dev. Biol. **97**, 191—202.

Palacios R., Sideras P., von Boehmer H. (1987). Recombinant interleukin 4/BSF-1 promotes growth and differentiation of intrathymic T cell precursors from fetal mice in vitro. EMBO J. **6**, 91—95.

Papahadjopoulos D. (1978). Calcium-induced phase changes and fusion in natural and model membranes. In: G. Poste and G.C. Nicolson (eds.), Membrane Fusion. Elsevier North-Holland, New York, pp. 766—790.

Papaioannou V. (1979). Interactions between mouse embryos and teratocarcinomas. In: N. LeDouarin (ed.), Cell Lineage, Stem Cells, and Cell Determination. Elsevier North-Holland, New York, pp. 141—155.

Pardanaud L., Altmann C., Kitos P., Dieterlen-Lievre F., Buck C. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. Development **100**, 339—349.

Patten B.M. (1951). Early Embryology of the Chick, 4th Ed. McGraw-Hill, New York.

Peschle C. and twelve others. (1985). Haemoglobin switching in human embryos: Asynchrony of zeta to alpha and epsilon to gamma switches in primitive and definitive erythropoietic lineage. Nature **313**, 235—238.

Przybylski R.J., Chlebowski J.S. (1972). DNA synthesis, mitosis, and fusion of myocardial cells. J. Morphol. **137**, 417—432.

Quesenberry P., Levitt L. (1979). Hematopoietic stem cells. N. Engl. J. Med. **301**, 755—760.

Quinn L.S., Holtzer H., Nameroff M. (1985). Generation of chick skeletal muscle cells in groups of 16 from stem cells. Nature 313, 692—694.

Risau W. (1986). Developing brain produces an angiogenesis factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3855—3859.

Rossant J., Vijh K.M., Grossi C.E., Cooper M.D. (1986). Clonal origin of haematopoietic colonies in the postnatal mouse liver. Nature **319**, 507—511.

Rugh R. (1951). The Frog: Its Reproduction and Development. Blakiston, Philadelphia.

Russell E.S. (1979). Hereditary anemias of the mouse: A review for geneticists. Adv. Genet. **20**, 357—459.

Sachs L. (1978). Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukemias. Nature **274**, 535—539.

Shainberg A., Yagil G., Yaffe D. (1969). Control of myogenesis in vitro by Ca^{++} concentration in nutritional medium. Exp. Cell Res. **58**, 163—167.

Siminovitch L., McCulloch E.A., Till J.E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. J. Cell. Comp. Physiol. **62**, 327—336.

Stanley E.R., Bartocci A., Patinkin D., Rosendal M., Bradley T.R. (1986). Regulation of very primitive, multipotent hemopoietic cells by hemopoietintive, multipotent hemopoietic cells by hemopoietin-1. Cell **45**, 667—674.

Stewart T.A., Mintz B. (1981). Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 6314—6318.

Stryer L. (1981). Biochemistry, 2nd Ed., Freeman, San Francisco.

Sutherland W.M., Konigsberg I.R. (1983). CPK accumulation in fusion-blocked quail myocytes. Dev. Biol. **99**, 287—297.

Till J.E. (1981). Cellular diversity in the blood—forming system. Am. Sci. **69**, 522—527.

Till J.E., McCulloch E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Rad. Res. **14**, 213—222.

Tuan R. (1987). Mechanisms and regulation of calcium transport by the chick embryonic chorioallantoic membrane. J. Exp. Zool. [Suppl] **1**, 1—13.

Tuan R.S., Lynch M.H. (1983). Effect of experimentally induced calcium deficiency on the developmental expression of collagen types in chick embryonic skeleton. Dev. Biol. **100**, 374—386.

Wakelam M.J.O. (1985). The fusion of myoblasts. Biochem. J. **228**, 1—12.

Whalen R.G., Schwartz K., Bouveret P., Sell S.M., Gros F. (1979). Contractile protein isozymes in muscle development: Identification of an embryonic form of myosin heavy chain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5197—5201.

Whetton A.D., Dexter T.M. (1986). Hemopoietic growth factors. Trends Biochem. Sci. **11**, 207—211.

Whitlock C.A., Tidmarsh G.F., Muller-Sieburg C., Weissman I.L. (1987). Bone marrow stromal cell lines with lymphopoietic activity express high levels of a pre-B neoplasia-associated molecule. Cell **48**, 1009—1021.

Wilson D. (1983). The origin of the endothelium in the developing marginal vein of the chick wing bud. Cell Differ. **13**, 63—67.

Wolf N.S., Trentin J.J. (1968). Hemopoietic colony studies. V. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells. J. Exp. Med. **127**, 205—214.

Womble M.D., Bonner P.H. (1980). Developmental fate of a distinct class of chick myoblasts transplantation of cloned cells into quail embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. **58**, 119—130.

Wong P.M.C., Chung S.W., Chui D.H.K., Eaves J. (1986). Properties of the earliest clonogenic hemopoietic precursors to appear in the developing murine yolk sac. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3851—3854.

Wuthier R.-E., Chin J.E., Hale J.E., Register T.C., Hale L.V., Ishikawa Y. (1985). Isolation and characterization of calcium-accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. J. Biol. Chem. **260**, 15972—15979.

Yablonka Z., Yaffe D. (1977). Synthesis of myosin light chains and accumulation of mRNA coding for light chain-like polypeptides in differentiating muscle cultures. Differentiation **8**, 133—143.

Yaffe D., Feldman M. (1965). The formation of hybrid multinucleated muscle fibres from myoblasts of different genetic origin. Dev. Biol. **11**, 300—317.

Оглавление

Предисловие редакторов перевода 5
Предисловие автора к русскому изданию . . 7
Предисловие 9

Часть I. Как происходит развитие

Глава 1. Введение в изучение развития животных. *Перевод А. С. Гинзбург* . . 11

Введение 11
Основные особенности развития 12
Наше эукариотическое наследие 12
Развитие одноклеточных эукариот . . . 16
Колониальные эукариоты: эволюция дифференцировки 22

Дополнительные сведения и гипотезы 26
Пол и смерть у Volvocales 26
Особенности развития разных многоклеточных 31
Цитированная литература 33

Глава 2. Оплодотворение: возникновение нового организма. *Перевод А. С. Гинзбург* 35

Введение 35
Строение гамет 35
Узнавание спермия и яйца: воздействие на расстоянии 42
Узнавание спермия и яйца: контакт между гаметами 45
Слияние гамет и предотвращение полиспермии 50
Слияние генетического материала . . . 59

Дополнительные сведения и гипотезы 61
Неравнозначность пронуклеусов у млекопитающих 61
Активация метаболизма яйца 63

Дополнительные сведения и гипотезы 65
Биохимия активации яйца 65
Цитированная литература 69

Глава 3. Дробление: создание многоклеточности. *Перевод А. С. Гинзбург* . . . 74

Введение 74
Пространственные закономерности дробления зародыша 75
Радиальное голобластическое дробление . 76
Спиральное голобластическое дробление . 83

Дополнительные сведения и гипотезы 85
Адаптация путем изменения процесса дробления зародыша 85
Билатеральное голобластическое дробление 87
Чередующееся (rotational) голобластическое дробление 88

Дополнительные сведения и гипотезы 91
Клеточная поверхность и механизм компактизации 91

Дополнительные сведения и гипотезы 95
Близнецы 95
Меробластические типы дробления . . . 97
Механизмы дробления 101
Инициация дробления 101
Цитоскелетный механизм митоза . . . 102
Образование новых мембран 106
Резюме 106
Цитированная литература 107

Глава 4. Гаструляция: перераспределение клеток. *Перевод Г. М. Игнатьевой* 110

Введение: основные черты гаструляции . 110
Гаструляция у морского ежа 111
Гаструляция у амфибий 118
Гаструляция у птиц 131
Гаструляция у млекопитающих 136

Дополнительные сведения и гипотезы 140
Функция хориона 140
Цитированная литература 142

Глава 5. Раннее развитие позвоночных. Производные эктодермы, их органо- и гистогенез. *Перевод Г. М. Игнатьевой* 145

Основные черты развития позвоночных . 145
Нейруляция 147
Нервная трубка и происхождение центральной нервной системы 150

Дополнительные сведения и гипотезы 159
Эволюция развития головного мозга . . . 159
Нервный гребень и его производные . . 169
Эпидермис и его производные 175

Дополнительные сведения и гипотезы 178
Тератология 178
Резюме 182
Цитированная литература 183

Глава 6. Раннее развитие позвоночных. Производные мезодермы и энтодермы, их органо- и гистогенез. *Перевод Г. М. Игнатьевой* 186
Введение 186
Мезодерма 186
Дорсальная мезодерма: дифференцировка сомитов 186
Мезодерма боковых пластинок 199
Дополнительные сведения и гипотезы 199
Изоформы 199
Формирование внезародышевых оболочек 200
Сердце и системы кровообращения . . . 201
Дополнительные сведения и гипотезы 209
Ангиогенез, индуцированный опухолью . . 209
Развитие клеток крови 212
Энтодерма 219
Пищеварительная трубка и ее производные 219
Дополнительные сведения и гипотезы 221
Тератокарцинома 221
Цитированная литература 224

Уважаемый читатель!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва,
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

Учебное издание

Скотт Ф. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах
Том I

Заведующая редакцией
канд. биол. наук М. Д. Гроздова
Научный консультант акад. Т. М. Турпаев
Ведущий редактор М. Б. Николаева
Редактор И. А. Ермакова
Художник А. Е. Волков
Художественные редакторы Н. М. Иванов, Л. М. Алевичева
Технический редактор И. И. Володина
Корректор В. И. Киселева

ИБ № 7423

Сдано в набор 25.02.91. Подписано к печати 11.12.92. Формат $84 \times 108^1/_{16}$. Бумага офсетная № 2. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 7,25 бум. л. Усл. печ. л. 24,36. Усл. кр.-отт. 26,89. Уч. изд. л. 26,54. Изд. № 4/7636. Тираж 7000 экз. Зак. 204. С 264

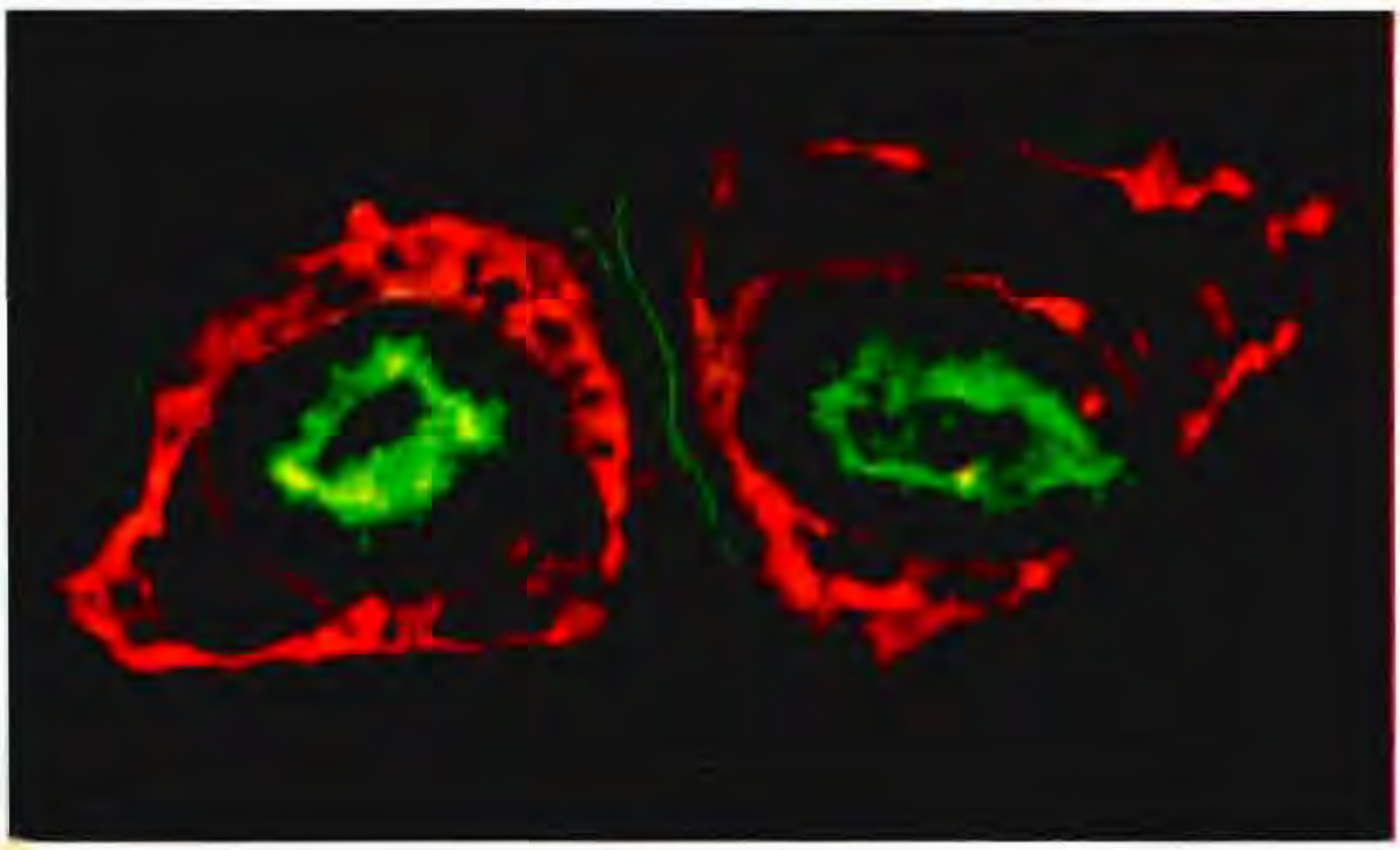
Издательство "Мир" Министерства печати и информации Российской Федерации, 129820, ГСП, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфический комбинат Министерства печати и информации Российской Федерации, 143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

Мыши, имеющие по шесть родителей

Эти разноцветные мыши были получены в результате смешивания клеток трех зародышей, находившихся на 4-клеточной стадии. Каждый из зародышей имел двух родителей: двух черных, двух белых или двух бурых. При этом трехголовых монстров не возникало, а образовывалась одна мышь (нормальных размеров), в развитие которой внесли вклад все три зародыша. У гибридной мыши развиваются половые клетки трех типов. Об этом свидетельствует тот факт, что от скрещивания химерной мыши с рецессивной (белой) мышью были получены белые, черные, бурые и пятнистые потомки (показанные на фотографии). Глава 3. (Фотография любезно предоставлена C. Markert и The Journal of Heredity.)





Тканеспецифические различия клеточных мембран

Не все клеточные мембраны одинаковы. Способность клеток изменять свое местоположение в зародыше является следствием изменений, происходящих на их поверхности. На фотографии виден белок (окрашенный в красный цвет с помощью флуоресцирующих моноклональных антител), локализующийся на поверхности только тех клеток, которые предназначены для образования скелетных игл личинки морского ежа. Другие компоненты клеточной поверхности (окрашены в зеленый цвет) обнаружены только в тех клетках, которые формируют кишку личинки. Фотография среза, перпендикулярного дорсо-вентральной оси личинки. Глава 4. (Фотография любезно предоставлена G. Wessel.)

Я прекрасно помню то острое чувство удовлетворения и восторга, с которым я часами слушал фуги Баха... и мне часто приходило в голову, что наслаждение, получаемое от музыкальных произведений такого рода... созвучно с тем, что я получаю при изучении очень многих морфологических проблем: перед Вами проходит тема из произведения старого мастера, которая прослеживается во всех своих бесконечных вариациях, появляется вновь и вновь и напоминает о том, что в многообразии есть единство.

Томас Хаксли (1895)

Еще и еще, и еще,
Это вечное стремление Вселенной
рождать и рождать,
Вечно плодородное движение мира.
Из мрака выходят двое, они несхожи, но равны:
вечно материя, вечно рост, вечно явление пола,
Вечно ткань из различий и тождеств, вечно
зарождение жизни.

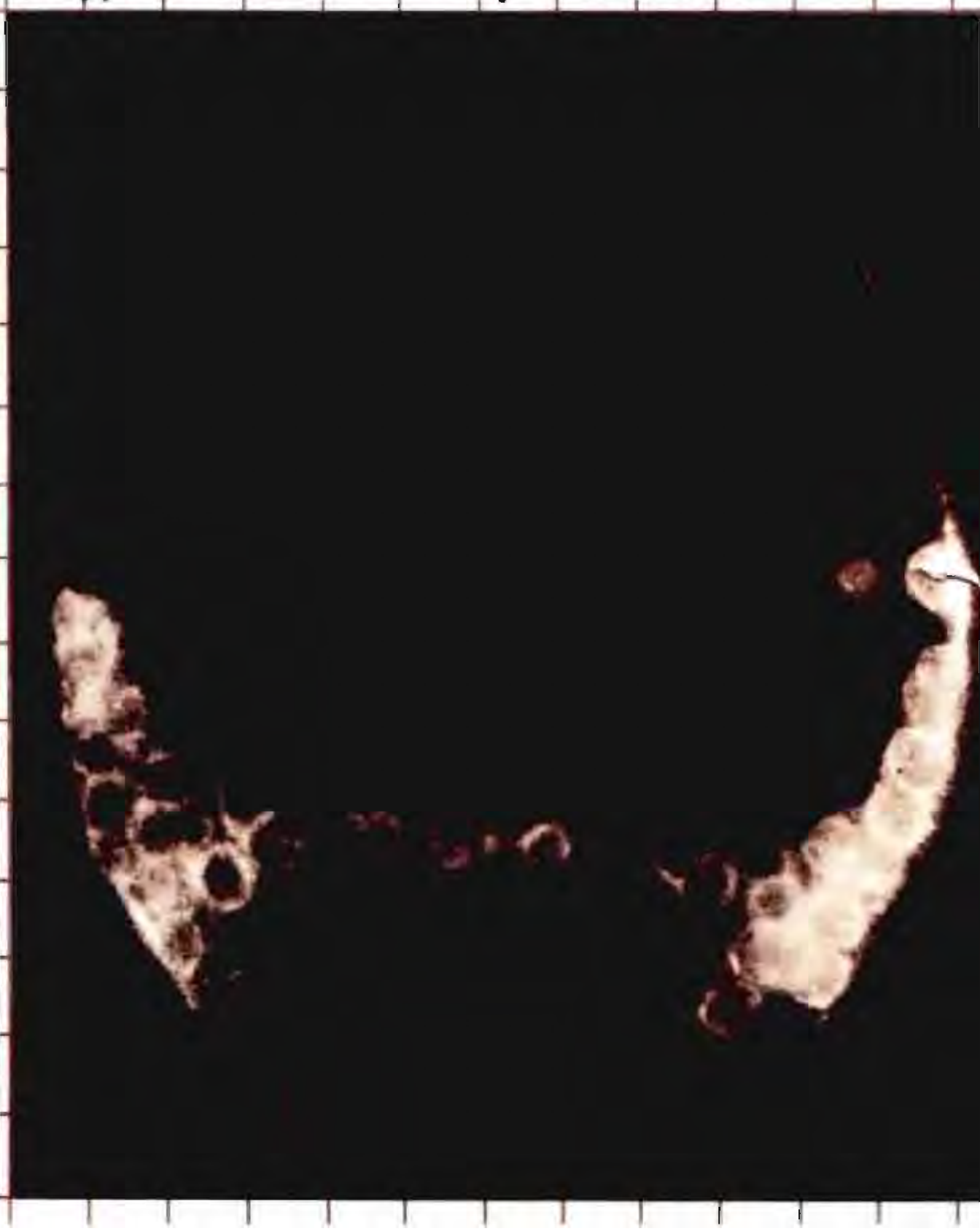
Уолт Уитмен (1855)

С. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

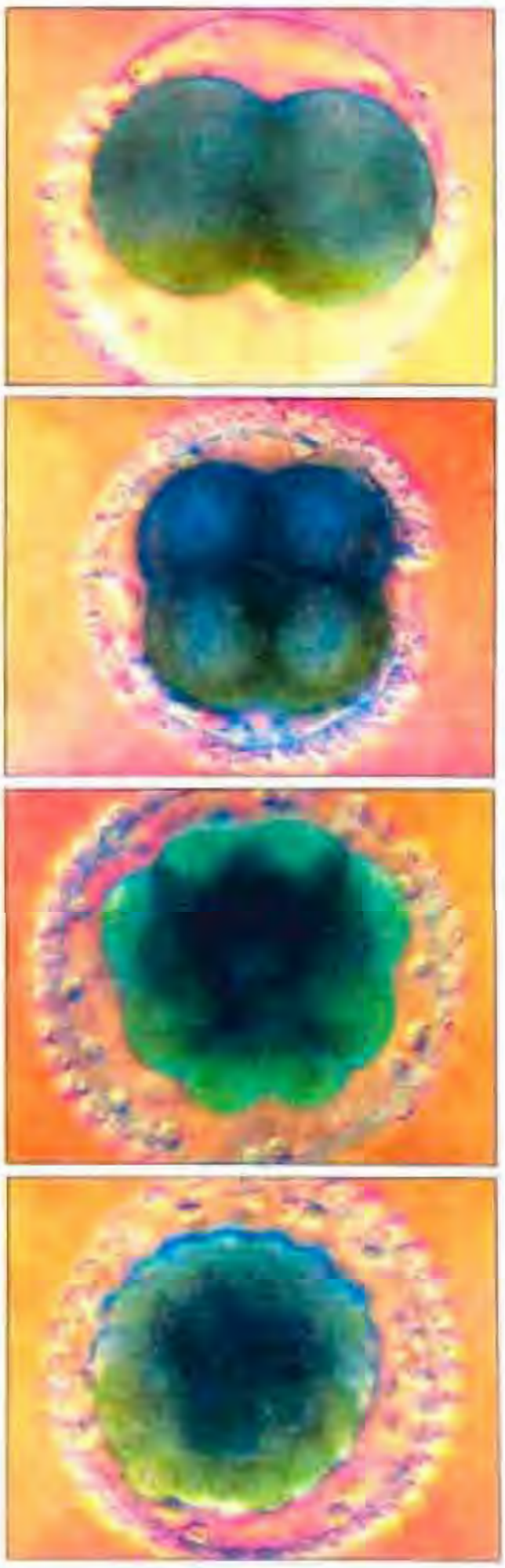
Издательство «Мир» Москва





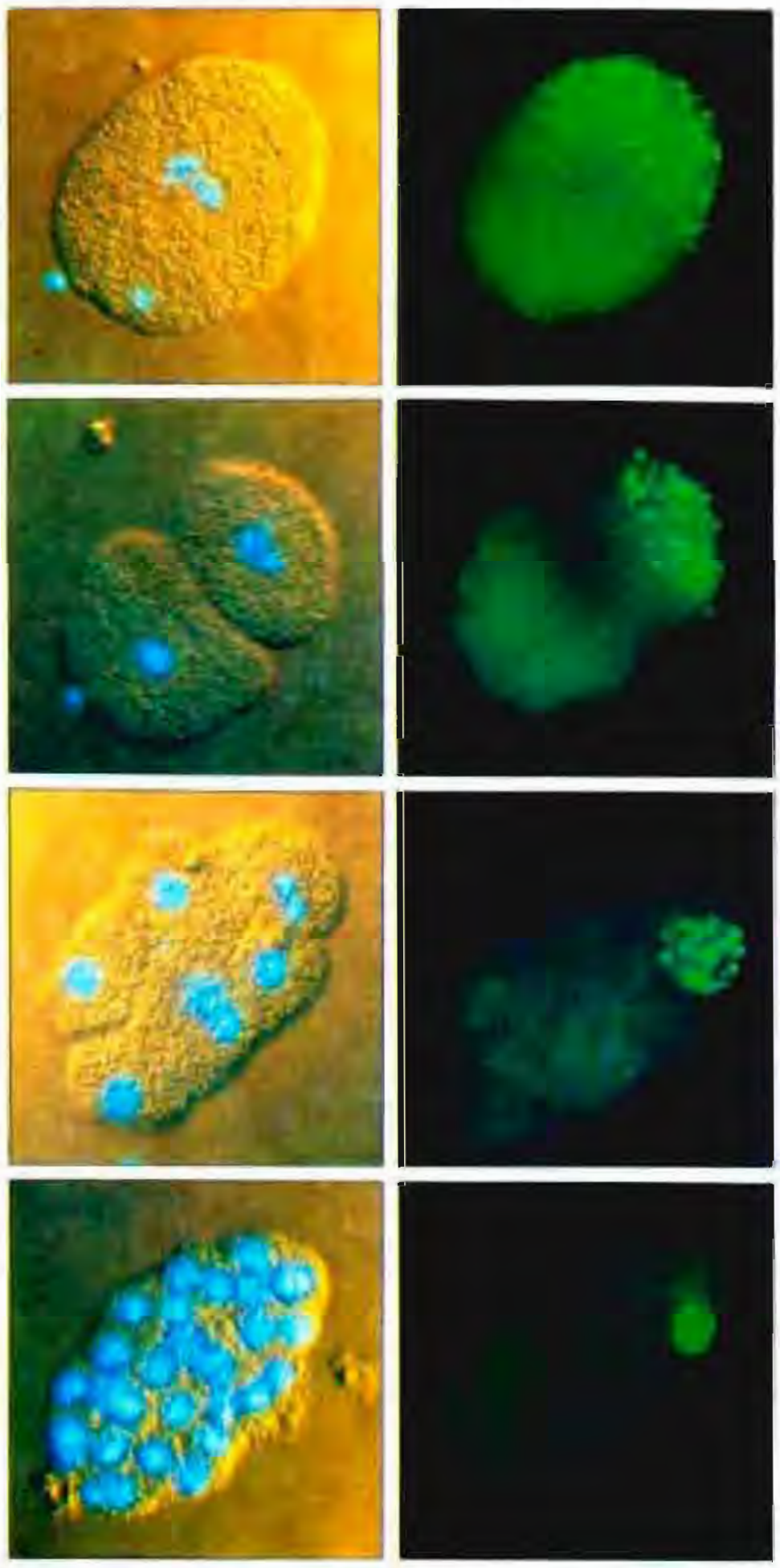
2





Прогрессивная цитоплазматическая локализация

Зигота *Caenorhabditis elegans* содержит особые гранулы (P-гранулы), случайно рассеянные в цитоплазме. Во время миграции пронуклеусов эти гранулы локализуются в заднем отделе зиготы, попадая в результате первого деления дробления только в бластомер P1. При последующих делениях дробления P-гранулы до начала митоза рассеиваются по всей цитоплазме, но во время митоза вновь собираются в заднем отделе клетки. В конце концов P-гранулы оказываются в бластомере P4, который впоследствии даст начало гаметам. *Левая колонка:* клетки окрашены по методике, позволяющей выявлять ядра; *правая колонка:* окрашивание клеток для выявления P-гранул. Глава 7. (Фотографии с любезного разрешения S. Strome.)



†

Цитоплазматическая локализация у зародышей оболочников

В процессе дробления цитоплазма яйца разделяется на отдельные клетки. В области желтого серпа у зародышей *Styela* локализуется небольшая группа клеток, которая даст начало мускулатуре личинки. Главы 3 и 7. (Фотографии 2-, 4-, 16- и 64-клеточных зародышей любезно предоставлены J. R. Whittaker.)

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Developmental Biology

Second Edition

SCOTT F. GILBERT
SWARTHMORE COLLEGE



Sinauer Associates, Inc. • Publishers
Sunderland, Massachusetts

С. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах

Перевод с английского
д-ра биол. наук Г. М. Игнатьевой,
д-ра биол. наук В. С. Михайлова

под редакцией
д-ра биол. наук С. Г. Васецкого,
д-ра биол. наук Т. А. Детлаф

2

«Мир» Москва
1994

ББК 28.0
Г47
УДК 57

Гилберт С.
Г47 Биология развития: В 3-х т. Т. 2: Пер. с англ.– М.: Мир. 1994.– 235 с., ил.

ISBN 5-03-001832-8

Фундаментальное учебное и справочное пособие по относительно новой, быстро развивающейся дисциплине – биологии развития. На русском языке выходит в 3-х томах. Второй том посвящен вопросам клеточной дифференцировки.

Для эмбриологов, молекулярных биологов, генетиков, цитологов и других специалистов-биологов, а также студентов биологических факультетов.

ББК 28.0

Редакция литературы по биологии

Издание выпущено в счет дотации, выделенной комитетом РФ по печати

ISBN 5-03-001832-8 (русск.)
ISBN 5-03-001830-1
ISBN 0-87893-248-8 (англ.)

© 1988 by Sinauer Associates, Inc.
© перевод на русский язык,
Игнатьева Г. М., Михайлов В. С., 1994

Часть II

Механизмы клеточной дифференцировки

Глава 7

Детерминация посредством цитоплазматической спецификации

Я считаю вероятным, что в зародышевых клетках существуют тонкие внутренние различия, которые предопределяют их последующую трансформацию в детерминированные структуры; не различия, которые являются простыми потенциями, присутствующими в зародышевых клетках, а действительные материальные различия, столь тонкие, что мы пока еще не в состоянии выявить их.

ВИРХОВ (1858)

Изучая период дробления, мы приближаемся к источнику, дающему начало прогрессивно разветвляющимся потокам дифференцировок, которые завершаются в конце концов почти тихими заводями – индивидуальными клетками взрослого организма.

ДЖАСТ (1939)

Введение

Каждый многоклеточный организм представляет собой сложный набор специализированных клеточных типов. Например, эритроциты и лейкоциты отличаются не только друг от друга, но и от клеток сердечной мышцы, которая обеспечивает циркуляцию форменных элементов крови по всему телу. Они отличаются также от имеющих отростки нейронов, проводящих нервные импульсы от мозга к сердцу, и от железистых клеток, выделяющих в кровь гормоны. В табл. 7.1 представлен далеко не полный список специализированных клеточных типов с указанием характерных продуктов их жизнедеятельности и основных функций.

Процесс развития специализированных клеточных типов из одного оплодотворенного яйца называется **дифференцировкой**. Этому явному изменению в биохимии и функции клеток предшествует процесс, называемый **детерминацией**, в течение которого определяется судьба клеток. Детерминация может осуществляться двумя разными способами. Первый заключается в **цитоплазматической сегрегации** детерминирующих молекул в период дробления, в результате чего качественно различные области цитоплазмы зиготы попадают в разные дочерние клетки. Второй способ детерминации – **эмбриональная индукция** – заключается во взаимодействии клеток или тканей, определяющем судьбу одного или обоих участников этого взаимодействия. Как будет показано ниже, в развитии любого организма в разной степени участвуют оба механизма. В этой главе основное внимание будет уделено опытам, свидетельствующим о существовании цитоплазматической сегрегации; следующая глава будет посвящена детерминации путем индукции (прогрессивной детерминации).

Преформация и эпигенез

Любая трактовка возникновения разных типов дифференцированных клеток из оплодотворенного яйца должна объяснить 1) постоянство морфологии каждого типа (т. е. почему из куриного яйца всегда вылупляется цыпленок, но не крокодил) и 2) разнообразие частей тела каждого организма. И в самом деле, одной из основных характеристик развития является то, что каждый вид воспроизводит свои специфические черты эмбриогенеза. Развитие включает в себя экспрессию наследственных свойств вида.

В XVII столетии понятия развитие и наследст-

Таблица 7.1. Некоторые типы дифференцированных клеток и их основные продукты

Тип клеток	Продукт дифференцированной клетки	Специализированная функция
Кератиноцит (клетка кожи)	Кератин	Защита от повреждения при трении и от высыхания
Эритроцит (красная кровяная клетка)	Гемоглобин	Транспорт кислорода
Клетка хрусталика	Кристаллины	Проведение света
В-лимфоцит	Иммуноглобулины	Синтез антител
Т-лимфоцит	Поверхностные антигены (лимфокинез)	Разрушение чужеродных клеток; регуляция иммунного ответа
Меланоцит	Меланин	Образование пигмента
Клетки островков Лангерганса	Инсулин	Регуляция углеводного обмена
Клетка Лейдига (у самцов)	Тестостерон	Обеспечивает проявление мужских половых признаков
Хондроцит	Хондроитинсульфат; коллаген типа II	Образование хрящевого матрикса
Остеобласт	Костный матрикс	Образование костной ткани
Миоцит (мышечная клетка)	Актин и миозин мышц	Сокращение
Гепатоцит (печеночная клетка)	Сывороточный альбумин; множество ферментов	Образование сывороточных белков и многочисленные ферментативные функции
Нейроны	Нейромедиаторы (ацетилхолин, адреналин и т. д.)	Передача электрических импульсов
Тубулярная клетка яйцевода курицы	Яичный альбумин	Синтез белков яйца для питания и защиты зародыша
Фолликулярная клетка яйцевода насекомых	Белки хориона	Белки яйцевой оболочки для защиты зародыша

венность были объединены в гипотезе, которая получила название **гипотеза преформации**. В соответствии с этой гипотезой считалось, что все органы взрослого организма в миниатюре представлены в спермии или (гораздо чаще) в яйце. Следовательно, организмы не «развиваются», а, скорее, «развертываются». Эта гипотеза основывалась как на научных данных, так и на философских концепциях (Gould, 1977; Roe, 1981). Во-первых, считалось, что, поскольку все органы предобразованы, зародышевое развитие – это всего лишь рост существующих структур, а не формирование новых. Из этого вытекало, что эмбриональное развитие не нуждалось в действии какой-либо внешней таинственной силы. Во-вторых, точно так же, как взрослый организм был преформирован в первичных половых клетках, другое поколение было преформировано внутри первичных половых клеток первого преформированного поколения. Эта гипотеза, названная **теорией вложения** (инкапсуляции), давала уверенность в том, что вид всегда будет оставаться постоянным. Некоторые микроскописты утверждали, что видят полностью сформированных миниатюрных человечков в спермии или в яйце, однако главные защитники этой гипотезы Альбрехт фон Галлер (Haller) и Шарль Бонне (Bonnet) знали, что системы органов развиваются с разной скоростью и что эмбриональные структуры не обязательно находятся в том же месте, в каком эти структуры находятся у новорожденного.

В распоряжении преформистов еще не было клеточной теории, чтобы они могли предусмотреть нижний предел размеров их преформированных организмов, и они не смотрели на пребывание человечества на Земле как на нечто потенциально бесконечное. Бонне (Bonnet, 1764) говорил: «Природа может создать любую малость», а человеческий род существует лишь ограниченное время, которое отпущено ему между Сотворением мира и днем Страшного суда. Это утверждение не противоречило науке того времени, подтверждая принцип французского математика и философа Рене

Декарта о бесконечной делимости механической природы,– делимости, начатой Богом, в которую он далее не вмешивался.

Теория преформации была консервативна, поскольку из нее вытекало, что каких-либо изменений в последовательных поколениях происходить не может. Принципиальный недостаток этой теории заключался в том, что с ее помощью невозможно было объяснить изменчивость, которая к тому времени была известна из очень небольшого числа генетических данных. Было известно, например, что от белого и черного родителей могут рождаться дети с промежуточным цветом кожи, что невозможно, если наследственность и развитие обусловливаются природой либо спермия, либо яйца. В более строго контролируемых опытах немецкий ботаник Кёльрейтер (Kölreuter, 1766) получил гибриды табака, имеющие признаки обоих видов. Более того, скрещивая гибрид либо с мужским, либо с женским родителем, он смог после нескольких поколений «возвратить» гибрид обратно к одному или к другому родительскому типу. Таким образом, стало ясно, что признаки потомства представляют собой некую смесь родительских признаков. Помимо этого, теория преформизма не могла объяснить случаи рождения уродов и детей с явными отклонениями (например, с шестью пальцами на конечностях) у нормальных родителей.

Нужна была другая гипотеза, и она была предложена – это гипотеза эпигенеза. В соответствии с ней постулировалось, что каждый взрослый организм развивается заново из недифференцированного состояния. Этот взгляд на развитие, имевший философские корни, идущие еще от воззрений Аристотеля, был возрожден немецким эмбриологом, работавшим в Санкт-Петербурге, Каспаром Фридрихом Вольфом (K. F. Wolff). Тщательно наблюдая за развитием куриного зародыша, Вольф показал, что части зародыша развиваются из тканей, не имеющих аналогов во взрослом организме. Так, например, можно было проследить, что сердце и кровеносные сосуды (которые, согласно гипотезе преформизма, должны присутствовать с самого начала, чтобы обеспечивать рост зародыша) у каждого зародыша развиваются заново. Сходным образом можно было видеть, что пищеварительная трубка возникает в результате сворачивания первоначально плоской ткани. Это последнее наблюдение было детально описано Вольфом, заявившим (1767): «Если тщательно взвесить все данные об образовании кишечника таким способом, то, я полагаю, практически не остается сомнений в правильности теории эпигенеза». Однако чтобы объяснить создание организма заново в каждом поколении, Вольф был вынужден постулировать некую неизвестную силу, vis essentialis («жизненную энергию»), которая, действуя подобно силе тяжести или магнетизму, должна была организовывать эмбриональное развитие.

Следовательно, если с позиций преформизма можно было легче объяснить непрерывность поколений, то с позиций эпигенеза легче объяснить изменчивость и результаты прямых наблюдений над формированием органов. Немецкий философ Иммануил Кант (1724–1804) и его коллега биолог Иоганн Фридрих Блуменбах (1752–1840) попытались примирить эти противоположные гипотезы. Стремясь построить научную теорию происхождения рас, Блуменбах постулировал существование механической целенаправленной силы, названной им Bildungstrieb («формообразующее стремление»). Существование этой силы, утверждал он, может быть доказано не только теоретически, но и экспериментально. Например, гидра, будучи разрезанной, регенерирует ампутированные части посредством перераспределения существующих элементов. Следовательно, в данном случае наблюдается действие некоей целесообразной организующей силы и эта сила заключена в самом организме. Блуменбах полагал, что Bildungstrieb наследуется через половые клетки. Таким образом, развитие могло происходить эпигенетически благодаря предетерминированной силе, наследуемой с веществом зародыша (Cassirer, 1950; Lenoir, 1980). Кроме того, эта сила могла изменяться, и в качестве примера такого изменения приводили вариант левозакрученной спирали раковины улитки. От этой гипотезы, согласно которой преформированные инструкции направляют эпигенетическое развитие, не так далеко до взглядов некоторых современных биологов, считающих, что «полное описание организма уже записано в яйце» (Brenner, 1979). Однако вплоть до начала двадцатого столетия, когда вновь были открыты работы Менделя, последовательной генетической теории, в которой нашли бы место такие идеи о наследственной изменчивости, не существовало, и каждый ученый мог свободно строить свои предположения о механизмах наследования признаков в развитии.

Французские тератологи

Попытки найти гипотезу, объясняющую одновременно постоянство вида и эпигенетический характер развития, привели к созданию современной эмбриологии. Поиски такой гипотезы были предприняты в двух различных направлениях. Одно из этих направлений, разрабатываемое во Франции, основывалось на анатомических аспектах тератогенеза. Ученые пытались выявить ошибки в эмбриогенезе, которые приводили к рождению детей с аномалиями развития. Другое направление поисков

такой гипотезы было сосредоточено в Германии, и здесь внимание было сфокусировано на физиологии развития. Обе исследовательские группы начали экспериментировать на зародышах с целью изучить реакции развивающегося организма на различные вмешательства (Churchill, 1973; Fischer, Smith, 1984).

Тератологические опыты французов начались в 20-х годах прошлого века с исследований Этьена Жоффруа Сент-Илера и его сына Исидора. Эти исследователи пытались доказать, что врожденные аномалии являются результатом нарушенного развития плода, а не преформированных отклонений. Поэтому они надеялись искусственно вызвать аномалии развития, изменяя условия инкубации куриных яиц. В большинстве случаев эти попытки были безуспешными (из-за грубой методики зародыши либо продолжали развиваться нормально, либо погибали), но они подготовили почву для проведения более тонкого анализа в работах Дареста (Dareste, 1877). Дарест проделал тысячи опытов и проследил возникшие у кур аномалии, начиная с ранних стадий развития.

Однако куриный зародыш оказался плохим объектом для изучения самых ранних стадий эмбриогенеза. Чтобы выяснить, будут ли нарушения на ранних стадиях развития влиять на структуры взрослого организма, следовало использовать другое животное. В 1886 г. Лоран Шабри (Chabry, 1887) начал изучать тератогенез на более доступном зародыше оболочников. Это был удачный выбор, потому что зародыши оболочников быстро превращаются в личинку с относительно небольшим числом клеточных типов. Шабри собирался вызывать специфические нарушения, отделяя скальпелем определенные бластомеры дробящегося зародыша оболочников. Он обнаружил, что каждый бластомер ответствен за образование специфического набора тканей личинки. Если удалить какие-либо бластомеры, то у личинки будут отсутствовать как раз те структуры, которые в норме из них формируются. Кроме того, он обнаружил, что если изолировать определенные группы клеток зародыша, то из них формируются характерные структуры без связи с другими клетками. Следовательно, каждая из клеток у оболочников развивается, по-видимому, автономно. Такой способ развития часто называют **мозаичным**, потому что зародыш представляет собой как бы мозаику самодифференцирующихся частей.

Цитоплазматическая спецификация у зародышей оболочников

Более поздние исследования показали, что зародыш оболочников почти точно соответствует представлению о нем как о «мозаике самодифференцирующихся частей», конструируемой на основе информации, которая была накоплена в цитоплазме ооцита. По мере того как зародыш делится, в различные клетки включаются разные участки цитоплазмы. Полагают, что эти разные цитоплазматические участки содержат **морфогенетические детерминанты**, контролирующие детерминацию (коммитирование) данной клетки к образованию клеток определенного типа. Изучение детерминации клеток у оболочников в значительной степени облегчалось тем обстоятельством, что у некоторых видов цитоплазма яйца сразу после его оплодотворения сегрегируется на ряд по-разному окрашенных областей. (Это можно видеть на цветной таблице на внутренней стороне обложки книги.) Конклин (Conklin, 1905) описал, как эти окрашенные области распределяются по разным бластомерам. Первое деление дробления разделяет яйцо на правую и левую половины, являющиеся зеркальным отражением одна другой. Каждое последующее клеточное деление на правой и левой стороне происходит синхронно. Проследив судьбу *каждого* бластомера асцидии *Styela partita*, Конклин пришел к поразительному заключению, что каждая окрашенная область имеет свою особую судьбу (рис. 7.1). Желтый серп цитоплазмы дает начало мышечным клеткам; из серого экваториального серпа образуются хорда и нервная трубка; прозрачная анимальная цитоплазма становится эпидермисом личинки; из содержащей желток серой вегетативной области яйца возникает кишка личинки.

Ревербери и Минганти (Reverberi, Minganti, 1946) изучали детерминацию у оболочников в серии экспериментов по изоляции бластомеров; эти авторы также наблюдали самодифференцировку каждого изолированного бластомера и остальной части зародыша. Результаты одного из опытов показаны на рис. 7.2. Если 8-клеточный зародыш разделить на четыре части по два бластомера в каждой (правая и левая стороны эквивалентны), то мозаичная детерминация их является правилом. Задняя анимальная пара бластомеров дает начало эктодерме, задняя вегетативная пара продуцирует энтодерму, мезенхиму и мышечную ткань, как это и следовало ожидать, исходя из карты презумптивных зачатков. Однако развитие нейральных структур является исключением. Клетки, образующие нервную систему, происходят из двух передних квадрантов—анимального и вегетативного, но ни один из них по отдельности не дает начало нервным клеткам. Если эти передние пары вновь соединяют вместе, то возникают ткани мозга и пальпы (прикрепительные сосочки). Другими словами, даже в таком строго детерминированном зародыше, как зародыш оболочников, осуществляются некоторые индукционные взаимодействия между бластомерами. И действительно, Ортолани (Ortolani, 1959) показал, что эта



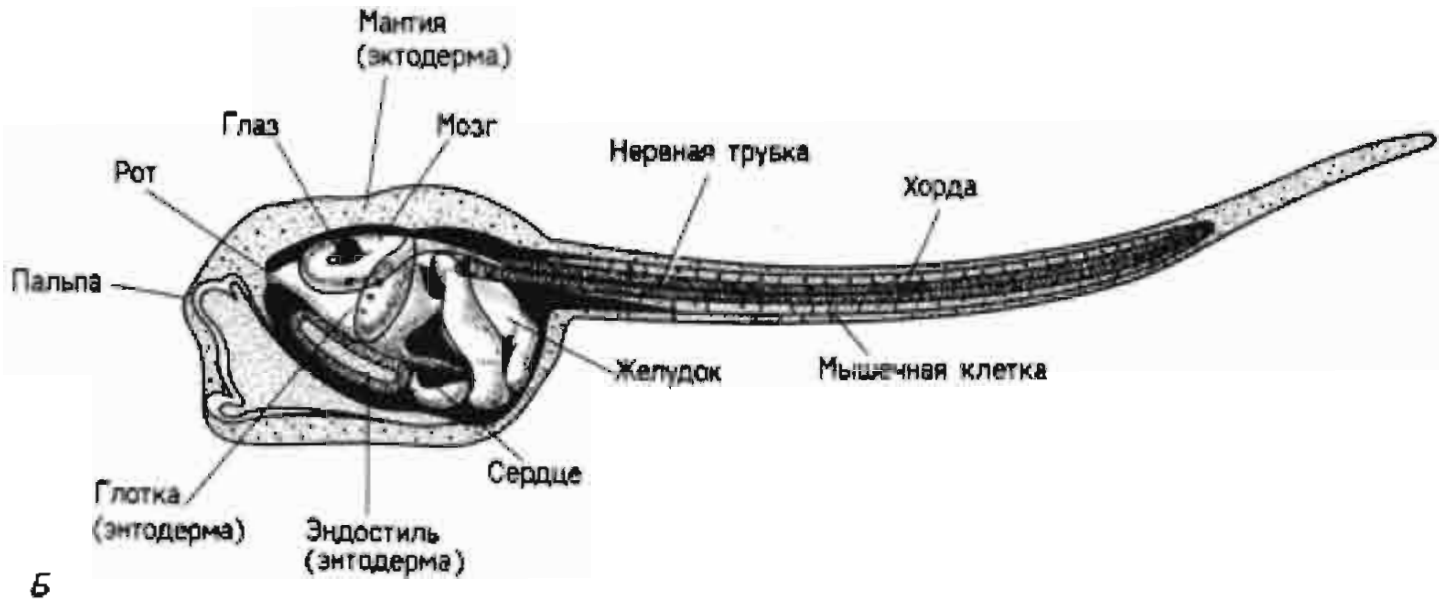


Рис. 7.1. Сегрегация цитоплазматических детерминантов в период оплодотворения. *А*. Различающиеся по окраске цитоплазматические области оплодотворенного яйца асцидии (*Styela partita*) и их проспективное значение. *Б*. Строение личинки оболочников.

область эктодермы не детерминирована к состоянию «нейральности» вплоть до стадии 64 клеток, непосредственно предшествующей началу гаструляции. Таким образом, хотя бо́льшая часть тканей у этих зародышей детерминируется сразу же после оплодотворения, некоторые ткани претерпевают прогрессивную детерминацию.

В 1973 г. Уиттейкер (Whittaker, 1973) получил убедительные биохимические данные, свидетельствующие о цитоплазматической сегрегации тканевых детерминантов у оболочников. Он окрашивал клетки на присутствие или отсутствие в них фермента **ацетилхолинэстеразы**. Этот фермент содержится только в мышечной ткани личинки и участвует в возникновении способности мышц реагировать на повторные нервные импульсы. Результаты исследований Конклина и других авторов, касающиеся судьбы потомства каждого из бластомеров, или клеточных линий (рис. 7.2 и 7.3), показали, что только одна пара бластомеров (задняя вегетативная, B4.1) у 8-клеточного зародыша способна дать начало мышечной ткани. Когда Уиттейкер удалял эти две клетки и культивировал их по отдельности, они образовывали мышечную ткань, которая положительно окрашивалась на ацетилхолинэстеразу. Из остальных 6/8 зародыша возникала личинка, лишенная мышц и не обнаруживавшая сколько-нибудь явной холинэстеразной активности (рис. 7.4)[1].

Помимо этого Уиттейкер останавливал развитие зародышей оболочников на разных стадиях, обра-

[1] Было показано (Deno et al., 1984; Nishida, 1987), что по меньшей мере у некоторых видов оболочников пары бластомеров b4.2 и A4.1 также дают начало мышечным клеткам. Однако это можно увидеть только на целых зародышах, а не на изолированных бластомерах. Эти мышечные клетки, происходящие не из пары бластомеров B4.1, по-видимому, образуются в результате индукции (Whittaker, 1987; Meedel et al., 1987).

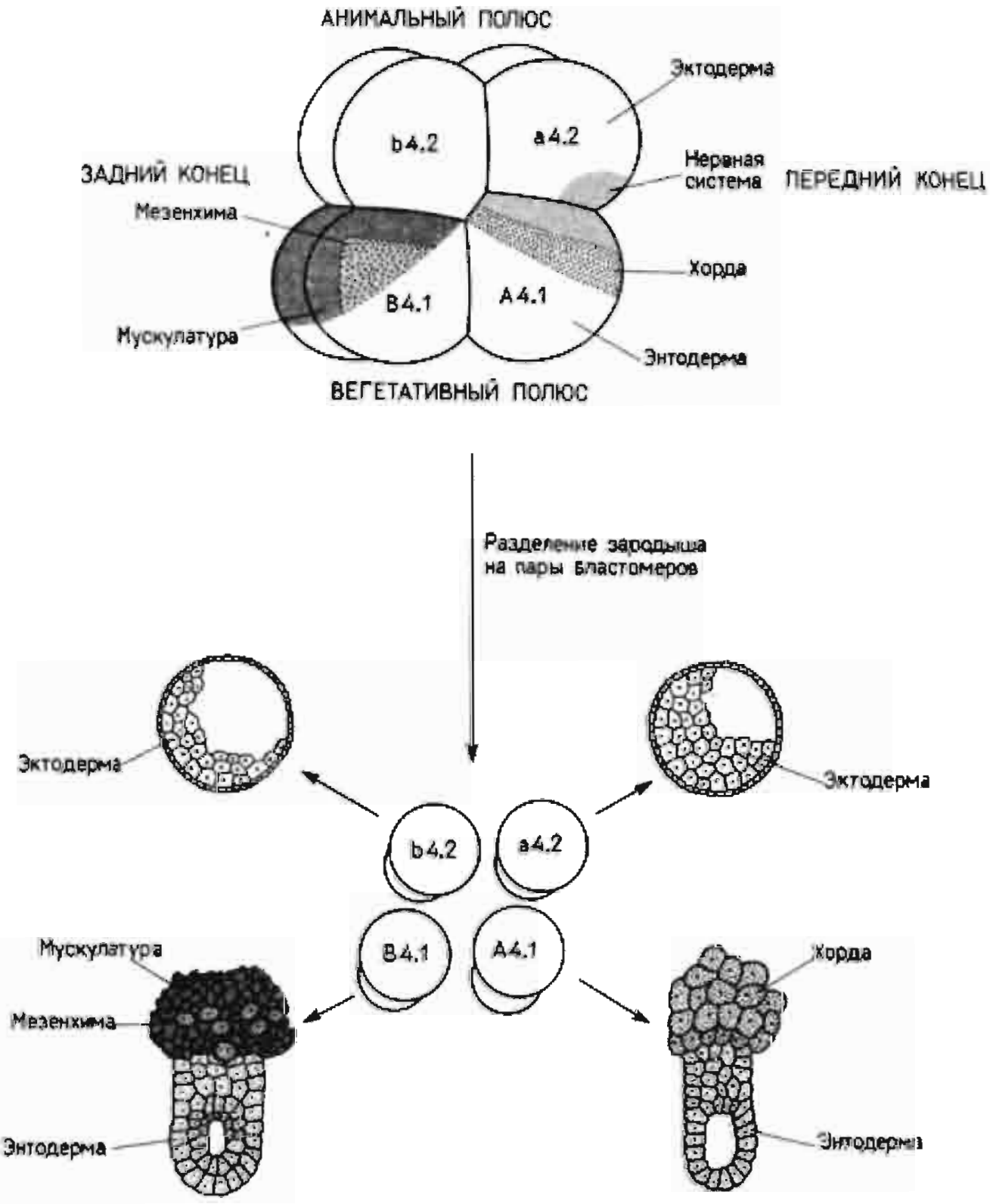


Рис. 7.2. Мозаичная детерминация у оболочников. Если 8-клеточный зародыш оболочника разделить на 4 пары бластомеров, то из каждой пары формируются определенные структуры. (По Reverberi, Minganti, 1946.)

батывая зародышей цитохалазином В. Это вещество связывается с микрофиламентами, предотвращая тем самым цитокинез (деление цитоплазмы клеток), и не влияет на нормальное деление ядер. В результате все дальнейшее развитие происходит в пределах популяции тех клеток, которые имелись к моменту добавления цитохалазина. После того как у зародышей было полностью блокировано дробление, им давали возможность развиваться какое-то время и затем окрашивали на присутствие ацетилхолинэстеразы. Результаты оказались поразительными. Их сравнение (рис. 7.5) с картой клеточных линий (рис. 7.3) показало полное совпадение данных. Способностью к образованию мышечных клеток первоначально обладали оба бластомера. Однако к 4-клеточной стадии способность синтезировать ацетилхолинэстеразу сохранялась только у вегетативных бластомеров. У 8-клеточного зародыша такие клетки формировались только из двух задних вегетативных бластомеров. Как известно, именно эти клетки формируют бо́льшую часть мышцы хвоста у личинки оболочника (Meedel et al., 1987; Nishida, 1987).

Клетки, потомки которых, как было показано, синтезировали ацетилхолинэстеразу, оказались клетками, предназначенными образовывать мышцы. Кроме того, синтез фермента в изолированных клетках происходил точно в то же время, в которое он появился в нормальных зародышах (Satoh, 1979). Когда в 8-клеточном зародыше асцидии цитоплазму из бластомера B4.1 (дающего начало мышцам) переносили в формирующий эктодерму бластомер

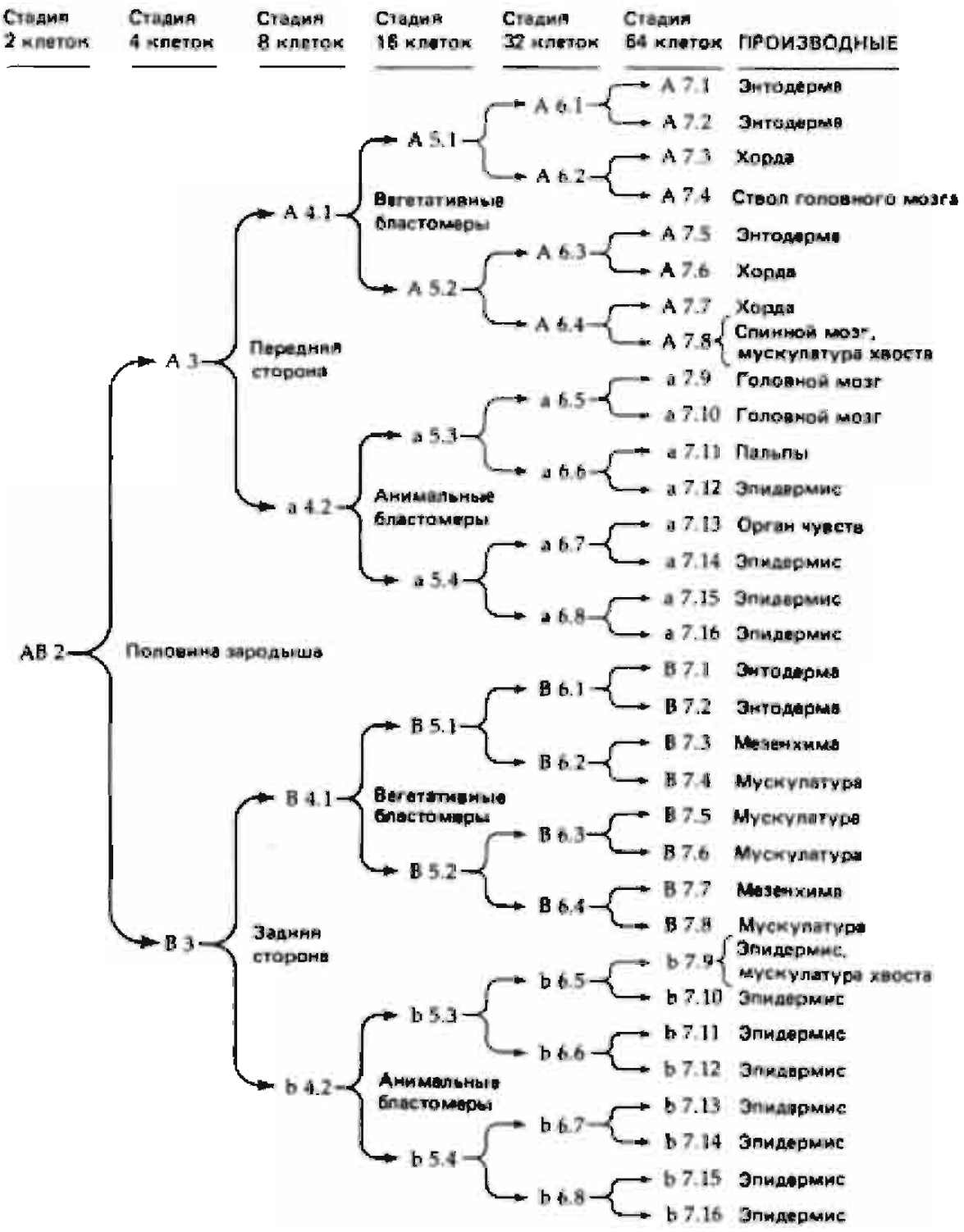


Рис. 7.3. Последовательность клеточных линий и их судьба в эмбриональном развитии оболочников. Поскольку правая и левая половины развиваются идентично, на рисунке представлена только одна половина. (По Whittaker, 1979; Meedel et al., 1987; Nishida, 1987.)

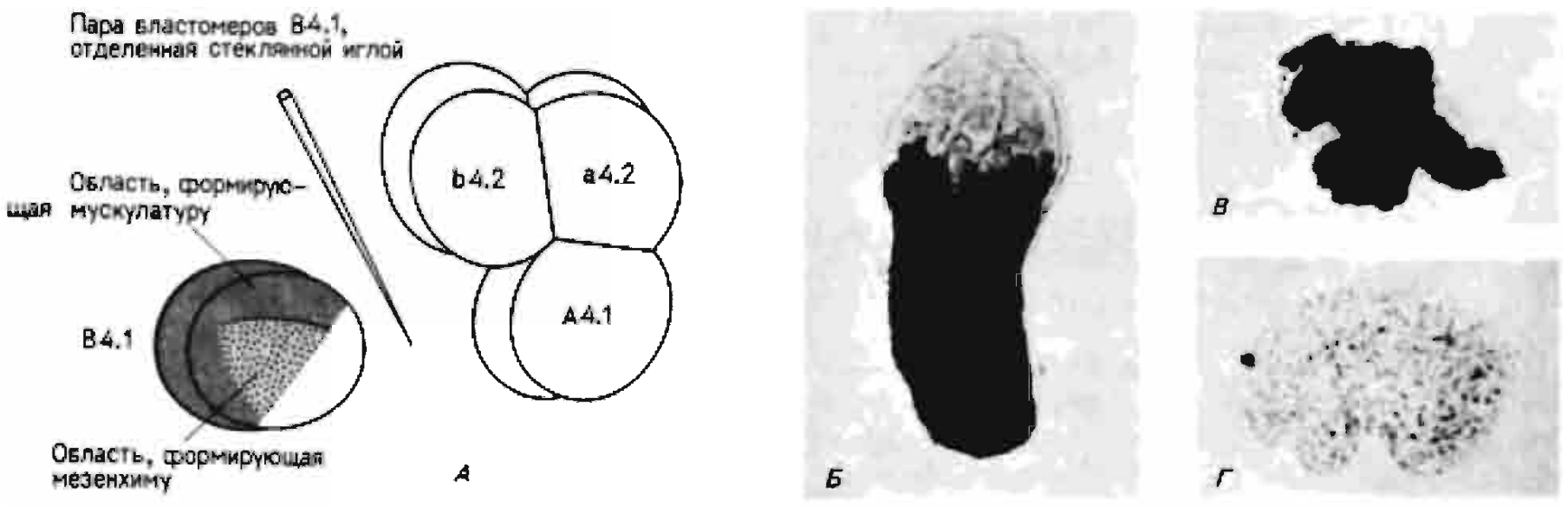


Рис. 7.4. Способность к синтезу ацетилхолинэстеразы в потомстве бластомеров мышечной линии (B4.1), изолированных на 8-клеточной стадии. *А*. Схема процедуры изоляции. *Б*. Локализация ацетилхолинэстеразы в хвостовой мускулатуре интактной личинки оболочника. Фермент обнаружен в потомстве пары бластомеров B4.1 (*В*), но не в потомстве остальных $^{6}/_{8}$ зародыша (*Г*), инкубировавшихся в течение времени, необходимого для достижения стадии личинки. (Из Whittaker et al., 1977; фотографии с любезного разрешения J. R. Whittaker.)

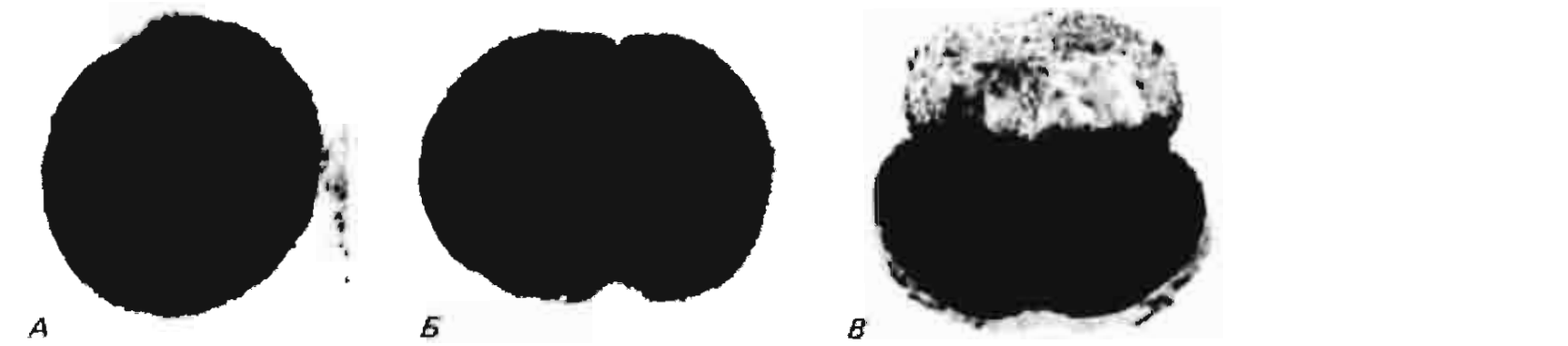


Рис. 7.5. Локализация ацетилхолинэстеразы в зародышах оболочников, развитие которых было остановлено на разных стадиях обработкой цитохалазином В. *А*. 1-клеточная стадия. *Б*. 2-клеточная стадия. *В*. 4-клеточная стадия. *Г*. 8-клеточная стадия. *Д*. 16-клеточная стадия. *Е*. 32-клеточная стадия. *Ж*. 64-клеточная стадия. (Из Whittaker, 1973a; фотографии с любезного разрешения J. R. Wnittaker.)

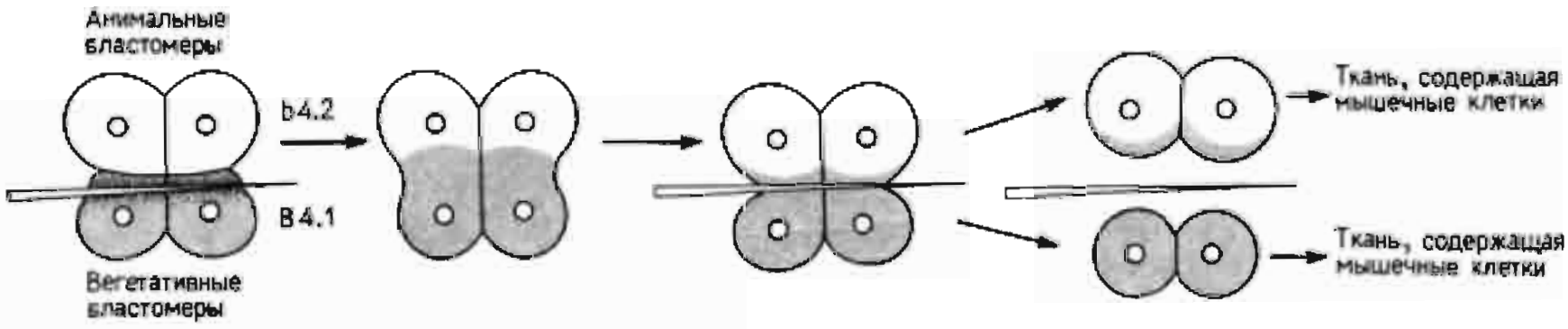


Рис. 7.6. Микрохирургическая процедура, позволяющая некоторому количеству цитоплазмы из области желтого серпа переместиться в анимальные клетки. В опыте использованы яйца оболочников. Надавливание на бластомеры B4.1 стеклянной иглой вызывает регрессию борозды дробления. Борозда может образоваться вновь несколько ближе к вегетативному полюсу, там, где клетки были отрезаны иглой. Эта борозда отделяет пару бластомеров таким образом, что бластомеры анимального полюса (B4.2) получают цитоплазму желтого серпа. Цитоплазма вегетативного полюса на рисунке обозначена серым цветом. (По Whittaker, 1982.)

B4.2, из него помимо нормальных эктодермальных клеток возникали еще и мышечные (рис. 7.6; Whittaker, 1982). Напротив, Тунг и др. (Tung et al., 1977) показали, что если ядра личинки трансплантировать в энуклеированные фрагменты яиц, то вновь образующиеся клетки имеют структуры, типичные для клеток – доноров цитоплазмы, а не для клеток, являющихся донорами ядер. Отсюда мы можем заключить, что определенные детерминанты, содержащиеся в цитоплазме, вызывают образование определенных тканей. Эти морфогенетические детерминанты (или морфогены), по-видимому, действуют посредством избирательной активации (или инактивации) специфических генов. Следовательно, детерминация бластомеров и активация определенных генов контролируются пространственной локализацией морфогенетических детерминантов в цитоплазме яйца.

Природа морфогенетических детерминантов у оболочников

Данные о природе цитоплазматических детерминантов противоречивы. Результаты исследований с применением ингибиторов транскрипции и транс-

ляции свидетельствуют о том, что у зародыша оболочников имеются цитоплазматические факторы двух типов. Факторы первого типа ответственны за активацию транскрипции определенных генов в тех клетках, которые содержат эти факторы. По-видимому, факторы этого типа активируют ген ацетилхолинэстеразы. Когда зародыши оболочников растут в присутствии ингибитора транскрипции актиномицина D, ацетилхолинэстеразная активность у них отсутствует. Следовательно, можно предположить, что гены, ответственные за синтез ацетилхолинэстеразы, в данном случае не активируются. Кроме того, если РНК, выделенную из зародышей *Ciona* на разных стадиях развития, инъецировать в ооциты лягушки, то в этих ооцитах будут транслироваться введенные в них новые мРНК. С помощью этой методики Мидель и Уиттейкер (Meedel, Whittaker, 1983, 1984) обнаружили, что мРНК для ацетилхолинэстеразы не выявляется до стадии гаструлы, когда она обнаруживается только в потомках бластомеров B4.1. Следовательно, для образования этого фермента необходим синтез новой РНК. Было показано (Crowther, Whittaker, 1984), что очень многие специфические клеточные маркеры, по которым можно судить о развитии асцидий, чувствительны к ингибиторам транскрипции, и поэтому морфогенетические детерминанты вообще могут действовать как активаторы специфической транскрипции.

Опыты с ингибиторами также показали, что некоторые детерминанты, как и мРНК, могут накапливаться в определенных областях яйца. С такой ситуацией мы, по-видимому, встречаемся в случае синтеза щелочной фосфатазы в кишечнике зародышей оболочников. Этот фермент синтезируется в энтодерме личинки и сегрегируется в тех клетках, которые формируют кишку (рис. 7.7). Актиномицин D не оказывает влияния на синтез этого фермента, хотя ингибиторы трансляции предотвращают его экспрессию (Whittaker, 1977). Следовательно, мРНК для кишечной щелочной фосфатазы уже должна содержаться в цитоплазме ооцита. Каким-то образом мРНК сама должна попасть в соответствующий бластомер. Результаты недавних исследований позволяют предположить, что этот процесс осуществляется не без помощи цитоскелета (см. ниже разд. «Дополнительные сведения и гипотезы»).

Джеффри и др. (Jeffery et al., 1986) показали, что помимо мРНК в яйце накапливается специфический для мышц актин. Эти авторы обнаружили, однако, что в энуклеированных оплодотворенных яйцах *Styela* щелочная фосфатаза не синтезируется. Если бы синтез щелочной фосфатазы был полностью независим от ядра, то ее можно было бы обнаружить. Такое несоответствие ставит перед нами несколько важных вопросов о том, какие выводы

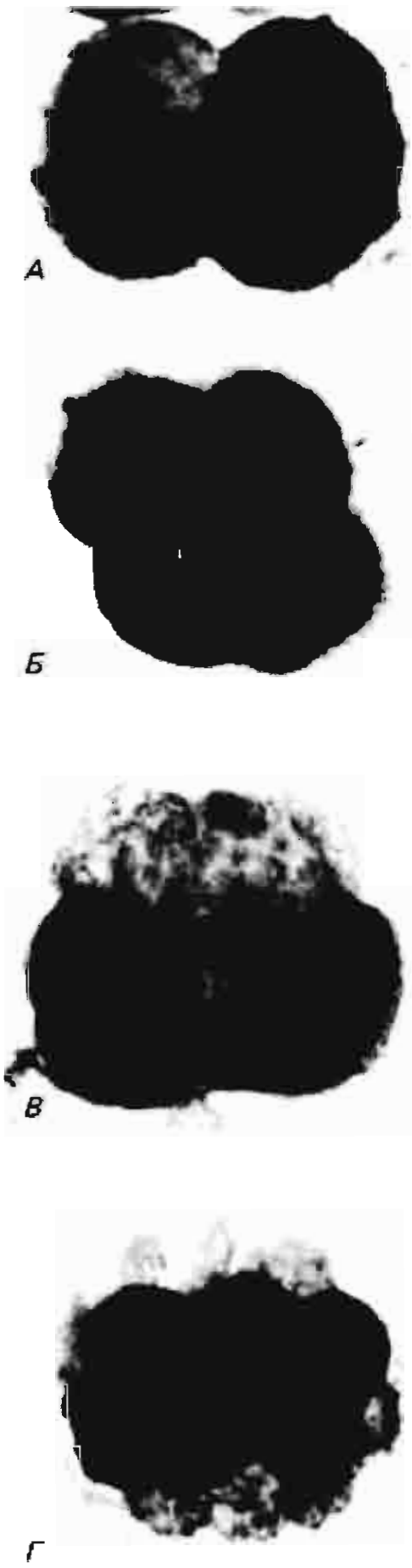


Рис. 7.7. Локализация щелочной фосфатазы у зародышей *Ciona*, развитие которых было остановлено на разных стадиях цитохалазином B. *А*, 2-клеточная стадия. *Б*, 4-клеточная стадия. *В*, 8-клеточная стадия. *Г*, 16-клеточная стадия. Реакции на фермент, проводимые через 14–16 ч после оплодотворения, выявили локализацию детерминантов щелочной фосфатазы. (Из Whittaker, 1977; фотографии с любезного разрешения J. R. Whittaker.)

и из каких данных могут быть сделаны. В лаборатории Уиттейкера измеряли уровень ферментативной активности у зародышей, развивавшихся в среде, в которой содержались ингибиторы. Результаты позволяют предположить, что ингибиторы проникают в каждую клетку одинаковым путем, одинаково действуют на каждый ген и не оказывают никакого другого заметного влияния на развитие (кроме специфического подавления транскрипции или трансляции). В лаборатории Джеффри измеряли активность щелочной фосфатазы в энуклеированных яйцах, принимая, что мРНК для этого фермента (если она существует) не локализована в том компартменте клетки, который остается связанным с женским пронуклеусом. Предполагалось также, что трансляция этой мРНК не зависит от других факторов, которые могут контролироваться на уровне транскрипции. Ни одна из упомянутых выше двух групп исследователей не могла получить прямых данных о событиях, приводящих к детерминации клеток. Они пользовались данными о процессах клеточной дифференцировки для количественного анализа раннего состояния детерминации. А между тем анализ детерминации должен привести к идентификации специфических белков или мРНК, которые определяют (коммитируют) судьбу клетки (а не тех специфических белков или мРНК, которые синтезируются в результате этого коммитирования).

Выделить внутриклеточные морфогены стандартными биохимическими методами оказалось чрезвычайно трудным делом. Вероятно, морфогены лабильны и содержатся в зародышах в низких концентрациях, а специалисты в области биологии развития располагают для работы лишь ограниченным числом зародышей (в отличие от микробиологов, которые могут начинать опыты, имея килограммы *E. coli*). Недавно появились два альтернативных подхода к биохимическому выделению морфогенов. Один из них – генетический подход, состоящий в том, чтобы идентифицировать мутантные гены, ответственные за синтез нефункциональных морфогенов. Затем следует клонировать нормальные аллели (аллели дикого типа) для этих морфогенов. Генетический подход может быть использован только на таких организмах, как дрозофила, геном которой хорошо изучен, а мутанты могут быть легко выявлены. Работа в этом направлении началась, и мы обсудим полученные результаты в настоящей главе позже.

Второй альтернативный подход – иммунологический, предполагающий получение антител, которые специфически связываются с цитоплазматическими молекулами. Этот метод был использован Нисикатой и др. (Nishikata et al., 1987), которые из области желтого серпа пытались выделить в чистом виде детерминанты, определяющие формирование мышц. Эти авторы производили инъекцию цитоплазмы желтого серпа яиц оболочников мыши, у которой в результате инъекции начинали вырабатываться антитела к чужеродному материалу. Некоторые полученные антитела специфически связывались с областью желтого серпа в яйце и были способны подавить образование специфической для мышц ацетилхолинэстеразы. В настоящее время исследования продолжаются с целью идентифицировать молекулы, связывающиеся с этими антителами, и охарактеризовать их активность во время развития.

Цитоплазматическая локализация у зародышей моллюсков

«Мозаичный» тип дифференцировки широко распространен в животном царстве, особенно у таких организмов, как гребневики, кольчатые и круглые черви и моллюски, – т. е. у животных, у которых гаструляция начинается на будущем переднем конце зародыша после небольшого числа делений. Моллюски дают один из наиболее впечатляющих примеров мозаичного развития и феномена **цитоплазматической локализации**, когда морфогенетические детерминанты обнаруживаются в специфической области ооцита.

Дополнительные сведения и гипотезы

Внутриклеточная локализация и движения морфогенетических детерминантов

Различные компоненты оплодотворенного яйца (в том числе желток, пигмент и растворимые белки) можно легко сместить центрифугированием, однако такое смещение обычно не влияет на эмбриогенез (см. обзор Morgan, 1927). Из этого следует, что либо молекулы детерминантов слишком малы, чтобы двигаться под действием центрифугирования, либо они каким-то образом закреплены в яйце («заякорены»). Отсутствие диффузии, о которой свидетельствует цитоплазматическая локализация этих детер-

минантов, опровергает первую возможность. Более вероятно, что детерминанты прикреплены к нерастворимому материалу, возможно к цитоскелету клетки. Эта инфраструктура, состоящая из филаментов и трубочек, распространена по всей клетке, но особенно хорошо выражена в кортикальном слое цитоплазмы ооцита. Было показано (Cervera et al., 1981), что в культивируемых клетках бóльшая часть РНК ассоциирована с цитоскелетом. Следовательно, цитоскелет может являться местом специфической локализации цитоплазматических детерминантов.

Цитоскелет можно выделить из клеток с помощью неионных детергентов, таких, как тритон Х-100. Детергент растворяет липиды, тРНК и монорибосомы. Остающийся цитоскелет содержит микротрубочки, микрофиламенты, промежуточные филаменты и примерно 200 белков, в том числе белок, способный связываться с 5'-концом мРНК (Zumbe et al., 1982; Moon et al., 1983). У оболочников *Styela* и *Boltenia* желтый серп, из материала которого формируются мышцы, характеризуется актинсодержащим цитоскелетным доменом. Этот домен первоначально распределен в неоплодотворенном яйце равномерно. После оплодотворения, однако, актиновые микрофиламенты сокращаются и сегрегируются в бластомерах, предназначенных для формирования мышц, при этом они захватывают с собой желтые пигментные гранулы и ряд мРНК (Jeffery, Meier, 1983; Jeffery, 1984). На рис. 7.8 можно видеть, что цитоскелет содержит желтые пигментные гранулы, которые получили свою внутриклеточную локализацию в результате движений цитоплазмы ооцита в период оплодотворения. Белки этой области желтого серпа значительно отличаются от белков остальной части яйца, тогда как мРНК этой области, по-видимому, не являются специфичными для желтого серпа (Jeffery, 1985). Таким образом, цитоскелет может служить якорем для морфогенетических факторов, детерминирующих судьбу клетки зародыша.

Локализация специфических белков или мРНК в специфических областях яйца не ограничена «мозаичными» зародышами. Было показано (Weeks et al., 1985), что анимальные и вегетативные шапочки яиц амфибий также содержат некоторые уникальные мРНК. Эти исследования начались с выделения мРНК из растущих ооцитов (рис. 7.9). Используя методику, которая будет подробно изложена в гл. 10, исследователи выделили и очистили мРНК из различных областей яйца лягушки. Большая часть мРНК из анимальной и вегетативной шапочек яйца оказались идентичными, однако небольшой процент РНК из анимальной области не был представлен в вегетативной цитоплазме, а некоторые мРНК вегетативной шапочки не были обнаружены в анимальной цитоплазме. Одна из таких уникальных вегетативных мРНК была обнаружена в опытах, в которых развивающиеся яйца лягушки инкубировали с радиоактивной ДНК, комплементарной этой мРНК из вегетативной области. (Эта кДНК была получена путем транскрибирования РНК на другой нити ДНК этого гена). Если комплементарная ДНК находила эту мРНК, то она связывалась с ней и оставалась в клетке. Присутствие радиоактивности выявляли с помощью фотографической эмульсии, на которой после экспозиции и проявления оставался след. Рис. 7.9 показывает, что в ран-

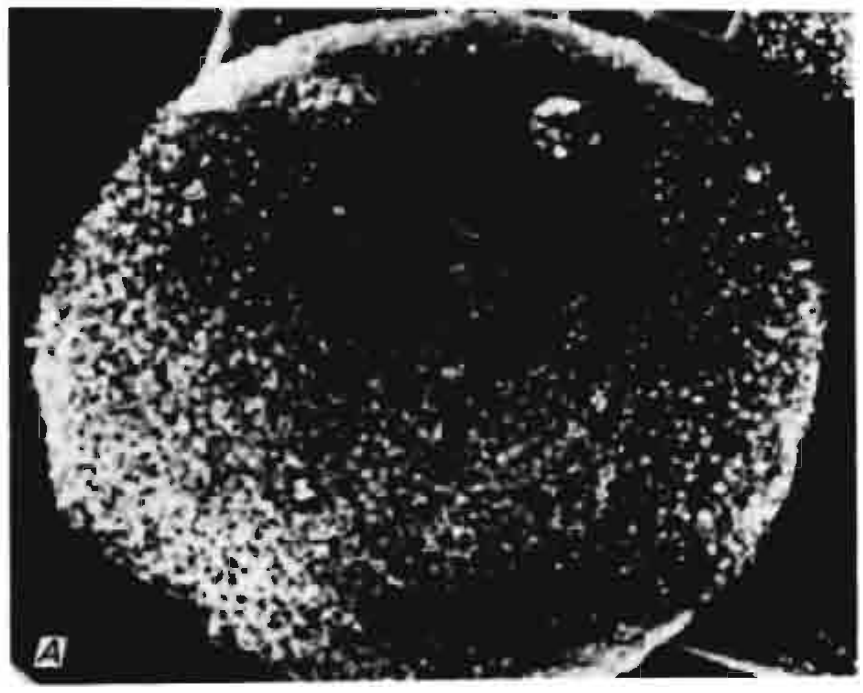
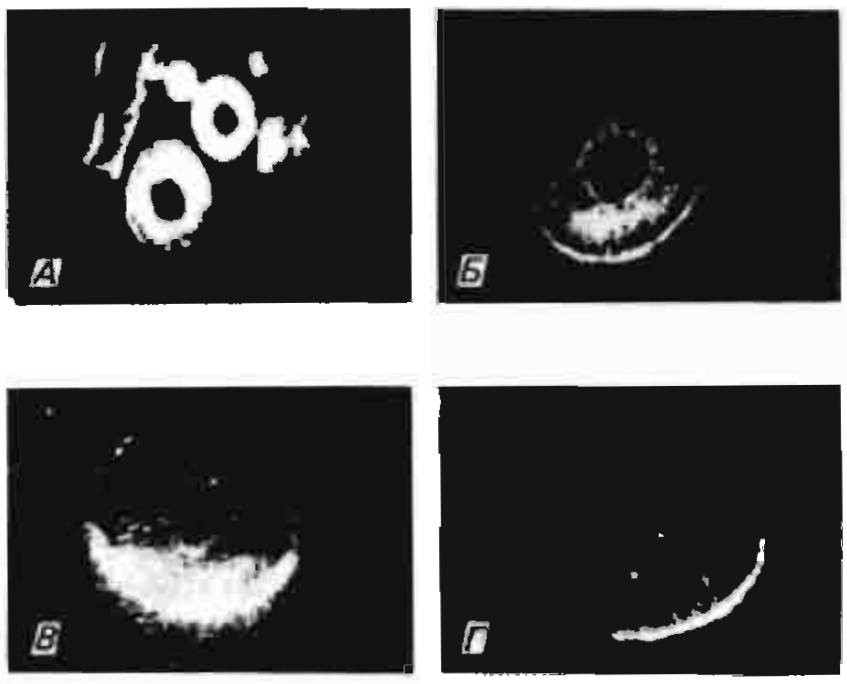




Рис. 7.8. Сегрегация морфогенетических детерминантов в яйцах оболочников. Яйца обрабатывали тритоном Х-100 – детергентом, растворяющим мембрану, что позволяло наблюдать цитоскелетные компоненты. *А*. Неоплодотворенное яйцо *Styela*; желтые пигментные гранулы и цитоскелет видны по всей поверхности. *Б*. Сегрегация желтой цитоплазмы в только что оплодотворенной зиготе *Boltenia*. Область, содержащая желтые пигментные гранулы, приподнята и состоит из собственно плазматической мембраны и лежащего глубже сплетения филаментов. Предполагаемое направление миграции пигмента показано стрелкой. Фотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Jeffery, Meier, 1983; фотографии с любезного разрешения S. Meier.)



них ооцитах эта мРНК из вегетативной области (называемая Brl) обнаруживается во всем ооците. Правда, по мере развития ооцита она становится локализованной в вегетативной области яйца (Melton, 1987). Механизм перемещения Brl в вегетативную область пока неизвестен.

Рис. 7.9. Локализация мРНК в вегетативной шапочке ооцита *Xenopus*. Ооциты на разных стадиях развития инкубировали с радиоактивной РНК, комплементарной Brl мРНК. Присутствие и локализацию Brl можно было обнаружить по наличию радиоактивности в любой области яйца (поскольку радиоактивное излучение выявляется с помощью фотографической эмульсии). В ранних ооцитах (*А*) Brl мРНК распределена равномерно по всей цитоплазме. Однако по мере созревания ооцита (*Б – Г*) Brl мРНК постепенно локализуется в области вегетативного полюса яйца. Темная область вблизи центра ооцитов – зародышевый пузырек. (Из Melton, 1987; фотографии с любезного разрешения D. Melton.)

В начале века выдающийся американский эмбриолог Вильсон опубликовал результаты интереснейших опытов. Он изолировал ранние бластомеры зародышей моллюска *Patella coerulea* и сравнивал их развитие с развитием таких же клеток, оставленных в других зародышах. На рис. 7.10 приведены некоторые результаты опытов, опубликованные Вильсоном в 1904 г. Изолированные бластомеры не только дифференцировались соответственно их проспективному значению (в этом случае формировались ресничатые клетки трохобласта), но и осуществляли то же самое число клеточных делений и точно в то же самое время, как это делали такие же клетки, оставшиеся в интактном контрольном зародыше. Ориентация этих делений дробления была правильной, и в соответствующее время образовавшиеся клетки формировали ресички. На основании результатов своих опытов Вильсон пришел к выводу, что сами клетки содержат факторы, детерминирующие форму и ритм делений дробления, а сложная дифференцировка, которую они претерпевают, не зависит полностью от их связей с остальной частью зародыша.

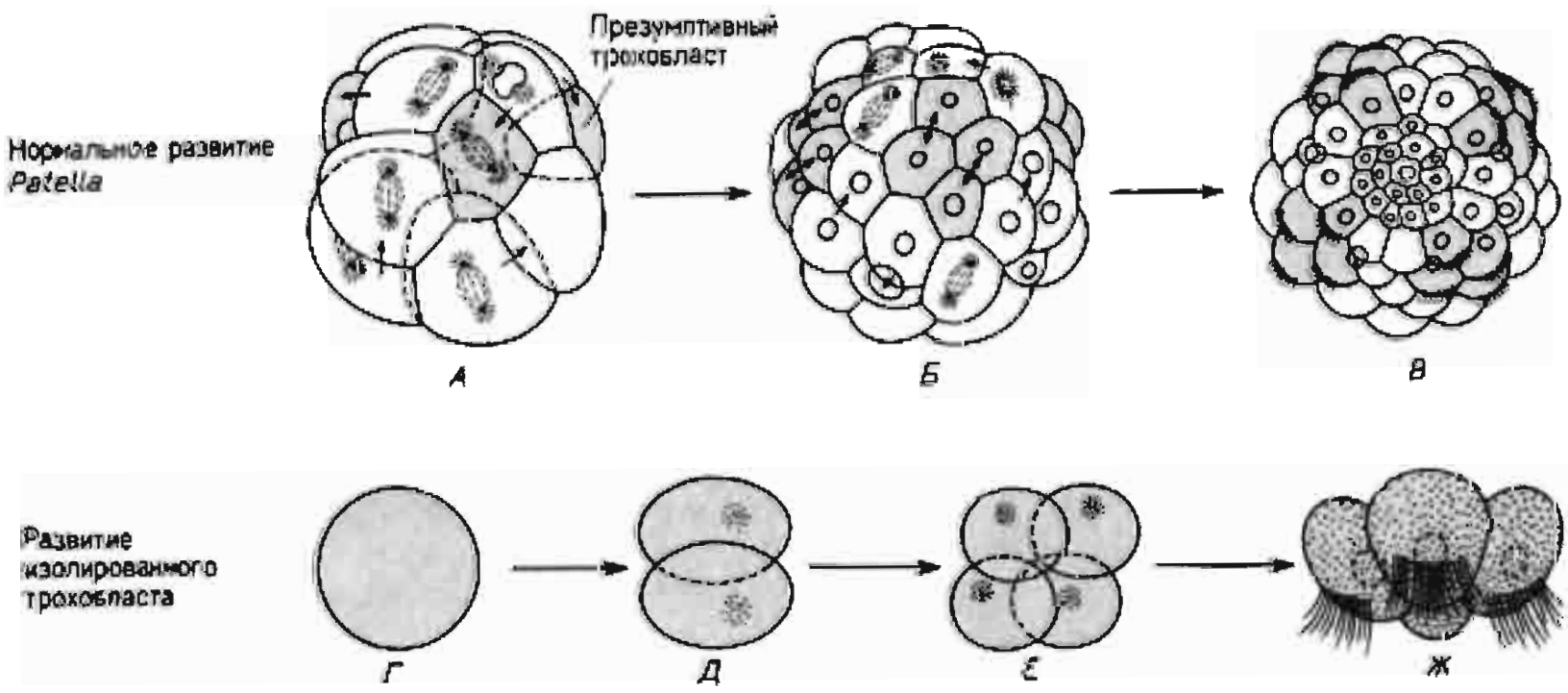


Рис. 7.10. Дифференцировка клеток трохобласта у нормального зародыша моллюска *Patella* (*А – В*) и изолированных клеток трохобласта, культивируемых in vitro (*Г – Ж*). *А*. Стадия 16 клеток, вид сбоку; презумптивные клетки трохобласта выделены серым цветом. *Б*. Стадия 48 клеток. *В*. Личинка, несущая ресички (вид с анимального полюса). Ресички видны в клетках трохобласта. *Г*. Изолированная клетка трохобласта. *Д*, *Е*. Результаты первого и второго делений в культуре клеток. *Ж*. Образование ресничек на поверхности изолированных клеток, показанных на рис. 7.10, *Е*; даже в культуре изолированных клеток появление ресничек по времени точно соответствует их появлению у контрольных зародышей. (По Wilson, 1904.)

Полярная лопасть

В своем следующем опыте Вильсон сумел показать, что такое развитие предопределено сегрегацией (распределением) специфических морфогенетических детерминантов по специфическим бластомерам. У зародышей некоторых животных со спиральным дроблением (главным образом у моллюсков и кольчатых червей) непосредственно перед первым делением дробления образуется вырост цитоплазмы (рис. 7.11). Этот вырост называют **полярной лопастью**. У некоторых видов улиток участок, соединяющий полярную лопасть с яйцом, представляет собой тонкую перемычку. Первое деление дробления делит зиготу асимметрично таким образом, что полярная лопасть соединяется только с бластомером CD. У некоторых видов почти одна треть всего объема цитоплазмы сосредоточена в этой безъядерной лопасти, что придает ей вид отдельной клетки. Стадию двух бластомеров, на которой зародыш имеет такую трехдольную структуру, часто называют **трилистником** (рис. 7.12). Затем полярная лопасть втягивается в бластомер CD, но снова образуется перед вторым делением (рис. 7.11). После этого деления полярная лопасть оказывается прикрепленной только к бластомеру D, в который она и втягивается. В дальнейшем полярная лопасть более не образуется.

Вильсон показал, что если удалить полярную лопасть на стадии трилистника, оставшиеся клетки делятся нормально. Однако вместо образования нормальной трохофоры (личинки улитки) развивается неполная личинка, совершенно лишенная мезодермальных органов – мышц, рта, раковинной железы[1] и ноги. Кроме того, Вильсон обнаружил, что тот же самый тип аномального зародыша может быть получен в результате удаления бластомера D на 4-клеточной стадии. На основе этого он пришел к выводу, что цитоплазма полярной лопасти содержит детерминанты мезодермы, которые и придают бластомеру D его способность формировать мезодерму. Вильсон также показал, что локализация мезодермальных детерминантов устанавливается вскоре после оплодотворения и что специфическая цитоплазматическая область яйца, предназначенная быть включенной в бластомер D, содержит какие-то «факторы», необходимые для установления особого ритма дробления бластомера D и для дифференцировки мезодермы.

Морфогенетические детерминанты, содержащиеся в полярной лопасти, по-видимому, локализованы в цитоскелете или в кортикальном слое, а не в жидкой части цитоплазмы зародыша. Клемент (Clement, 1968) центрифугировал зародышей улитки *Ilyanassa obsoleta* на стадии трилистника, вызывая перетекание жидкой части цитоплазмы обратно в бластомер CD. Однако, когда он затем отрезал полярную лопасть, у сформировавшегося зародыша *опять отсутствовали* производные мезодермы. Ван ден Биттелаар получил сходные результаты, удаляя цитоплазму из полярной лопасти микропипеткой. Жидкая цитоплазма из других областей клетки

[1] Раковинная железа – эктодермальный орган, формирующийся благодаря индукционному влиянию мезодермальных клеток. Без мезодермы в зародыше нет клеток, способных индуцировать компетентную эктодерму. Таким образом, мы снова встречаемся с ограниченной индукцией у мозаичного зародыша.

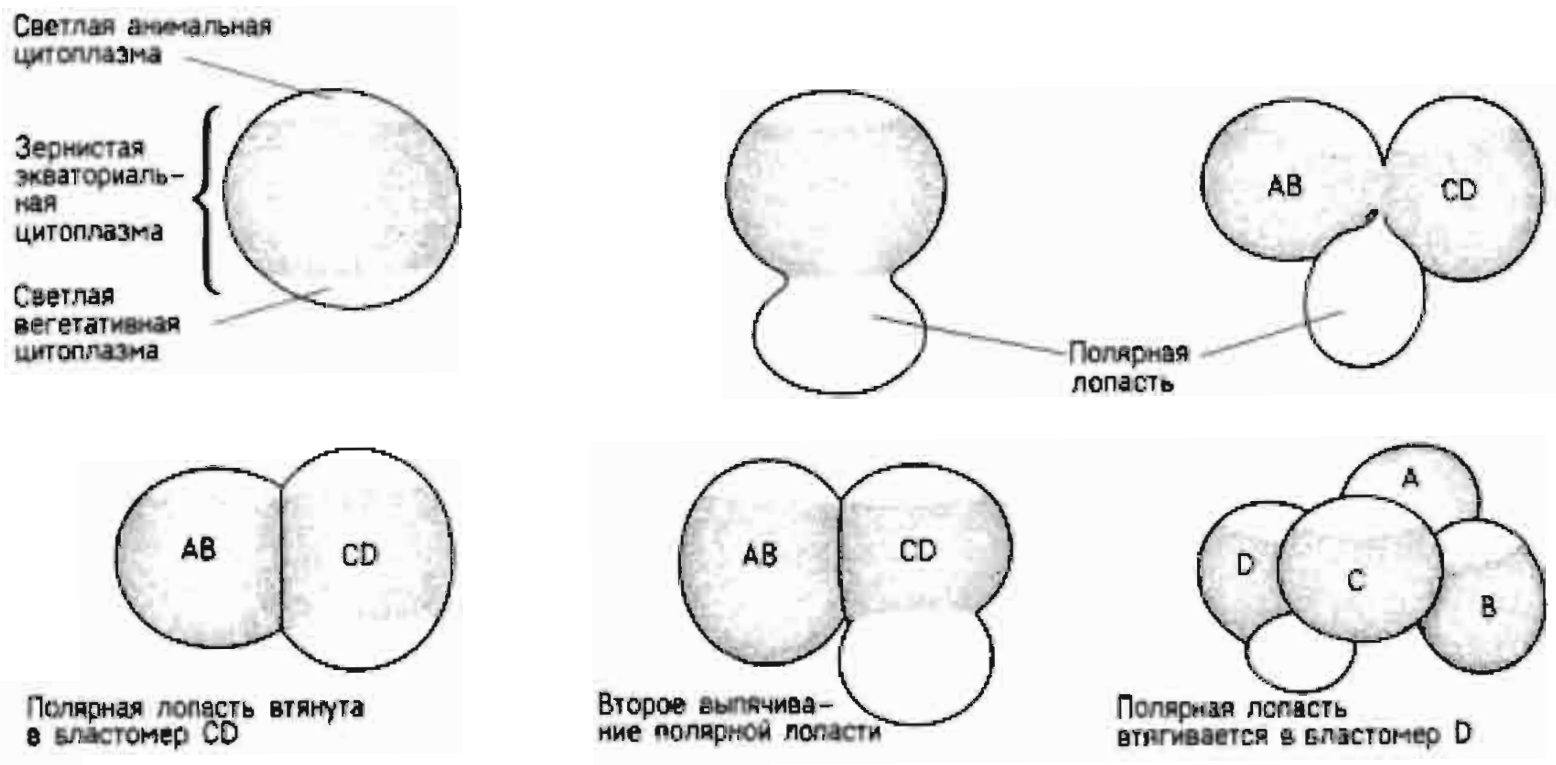


Рис. 7.11. Дробление у моллюска *Dentalium*. Образование полярной лопасти и ее втягивание происходят дважды. (Из Wilson, 1904.)

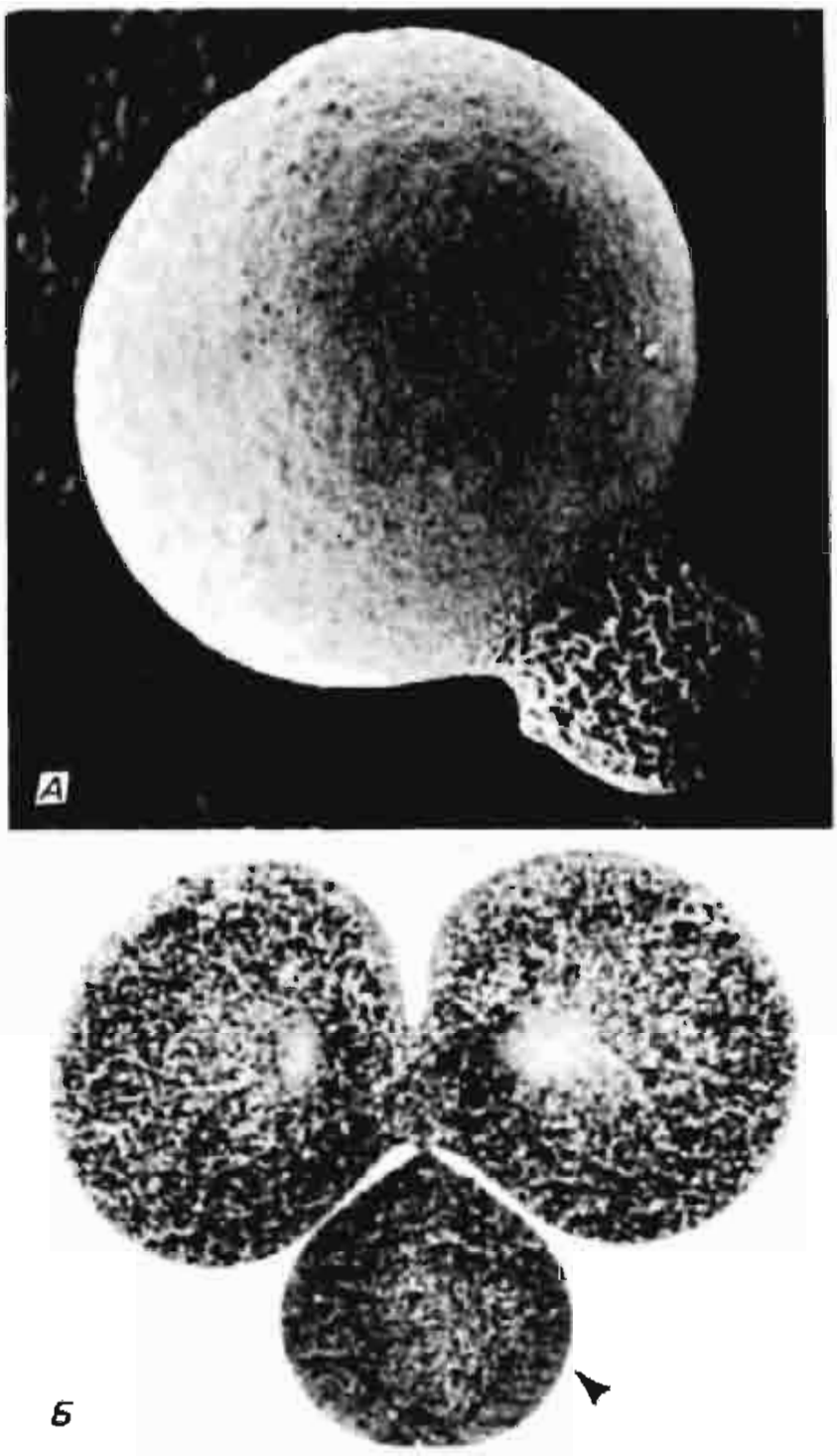


Рис. 7.12. Полярные лопасти у моллюсков. *А*. Выступающая полярная лопасть в недробящемся яйце *Buccinum undatum*. Складки на поверхности наблюдаются только в области полярной лопасти. (Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа.) *Б*. Срез через зародыш *Dentalium* на стадии двух бластомеров. Стрелка указывает на большую полярную лопасть. (Фотографии с любезного разрешения M. R. Dohmen.)

перетекала в полярную лопасть и замещала удаленную порцию; при этом последующее развитие зародышей было нормальным. В дополнение к этому, когда он добавлял жидкую цитоплазму полярной лопасти в бластомер B, удвоения структур не наблюдалось (Verdonk, Cather, 1983). Следовательно, жидкая часть цитоплазмы не содержит этих морфогенетических детерминантов. Они, вероятно, находятся в нерастворимой кортикальной цитоплазме или в цитоскелете.

Клемент изучал также развитие бластомера D с целью проследить дальнейшее распределение этих детерминантов. Развитие бластомера D представлено на рис. 7.13. Этот макромер, получивший содержимое полярной лопасти, крупнее трех других. После удаления бластомера D или его первого или второго производных (1D или 2D) из оставшихся бластомеров развивается неполная личинка, у которой отсутствуют сердце, кишечник, парус (снабженный ресничками край личинки), раковинная железа, глаза и нога. Если удалить бластомер 3D *после* деления бластомера 2D, приводящего к образованию бластомера 3D, то получаются почти нормальные зародыши, имеющие глаза, ногу, парус, а некоторые и раковинную железу, но лишенные сердца или кишечника (рис. 7.14). Следовательно, некоторые из морфогенетических детерминант, первоначально находившиеся в бластомере D, перешли в клетку 3d. После того как образовалась клетка 4d (после деления бластомера 3D), удаление производного бластомера D (клетки 4D) не вызывает качественных изменений в развитии. Все детерминанты, важные для формирования сердца и кишечника, теперь содержатся в бластомере 4d, и удаление *именно этой* клетки приводит к образованию личинки без сердца и кишки (Clement, 1986). Бластомер 4d ответствен за формирование (при его последующем делении) двух мезэнтобластов – клеток, из потомства которых образуются как мезодермальные (сердце), так и эктодермальные (кишечник) органы.

Материал полярной лопасти также ответствен за организацию дорсовентральной (спина–живот) полярности зародыша. Если позволить материалу полярной лопасти перейти в оба бластомера (AB и CD), то образуются личинки-близнецы, соединенные между собой на вентральной поверхности (Guerrier et al., 1978; Henry, Martindale, 1987).

Таким образом, опыты показали, что нерастворимая цитоплазма полярной лопасти чрезвычайно важна для нормального развития моллюсков, потому что она:

1) содержит детерминанты для соответствующего ритма и ориентации делений дробления бластомера D;
2) содержит определенные детерминанты (поступающие в бластомер 4d и приводящие затем к образованию мезэнтобластов), необходимые для дифференцировки мезодермы и кишечника;
3) ответственна за запуск индукционных взаимодействий (через материал, поступающий в бластомер 3d), приводящих к формированию раковинной железы и глаза;
4) содержит детерминанты, необходимые для спецификации дорсовентральной оси зародыша.

Хотя очевидно, что полярная лопасть важна для

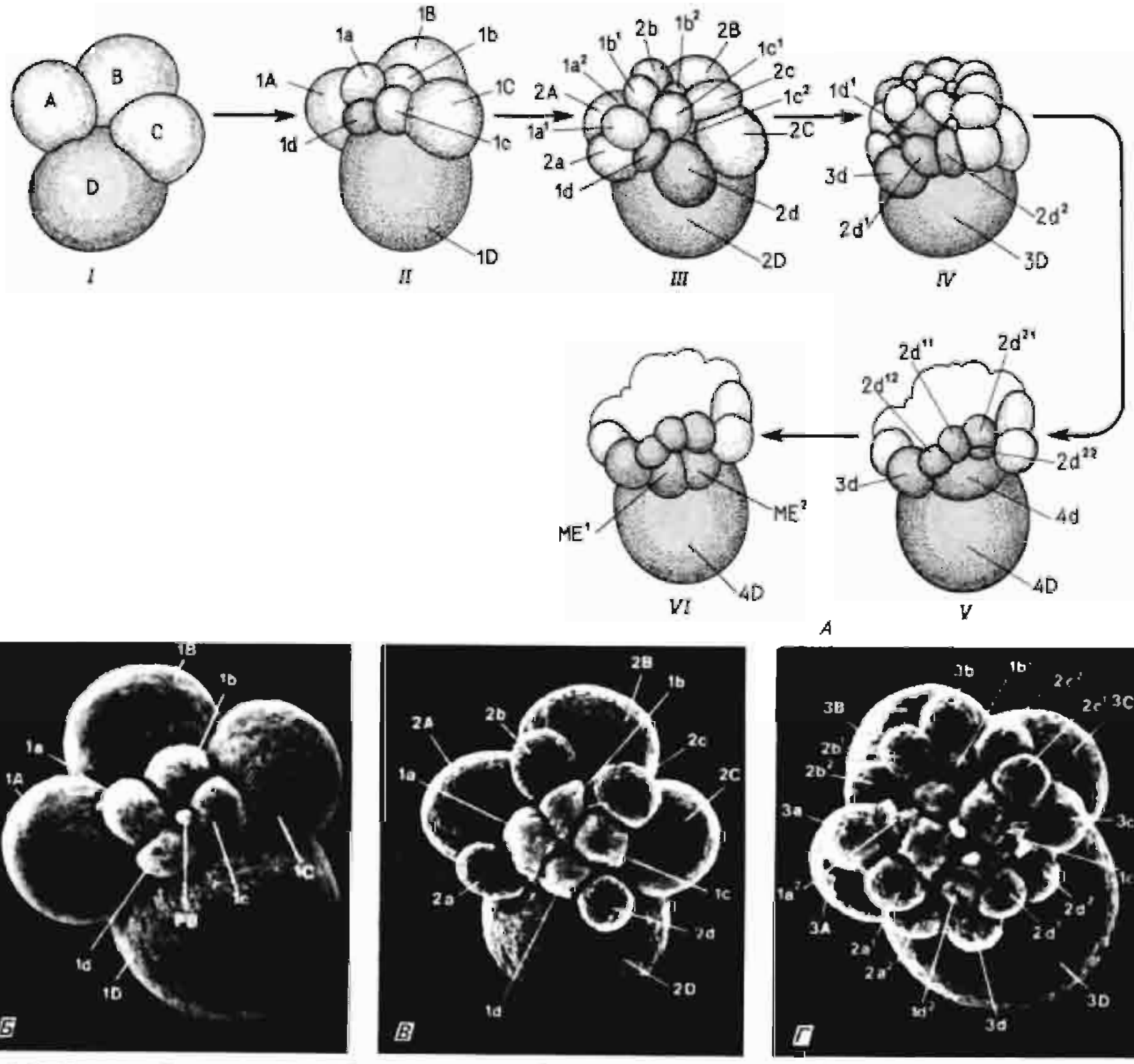


Рис. 7.13. Развитие бластомера D. *А*. Схематическое изображение клеточной линии бластомера D у зародышей *Hyanassa*: *I*. 4-клеточный зародыш. *II*. Бластомеры 1D и 1d на 8-клеточной стадии. *III*. Зародыш на 16-клеточной стадии, содержащий бластомеры 2D и 2d (происходящие от 1D). Клетки, происходящие из D (серые), часто делятся позднее других. *IV*. Деление макромера 2D с образованием клеток 3d и 3D; клетка 2d делится на $2d^1$ и $2d^2$. *V*. Стадия 64 клеток. Из бластомера 3D образуются клетки 4D и 4d. *VI*. Бластомер 4d делится симметрично, в результате чего возникают два мезэнтобласта, ME^1 и ME^2. *Б*. 8-клеточный зародыш. *В*. 12-клеточный зародыш (2a–1d еще не делились). *Г*. 32-клеточный зародыш. (*А* – по Clement, 1962; фотографии из Craig, Morrill, 1986 с любезного разрешения авторов.)

нормального развития улитки, мы все еще не знаем механизма ее действия. По-видимому, существенных различий в синтезе мРНК или белков у зародышей с полярной лопастью и без нее не наблюдается (Brandhorst, Newrock, 1981; Collier, 1983, 1984). Возможный ключ к пониманию этого механизма дали наблюдения (Atkinson, 1987), показавшие наличие дифференцированных клеток паруса, пищеварительной системы и пуповинной железы у зародыша без полярной лопасти. У такого зародыша могут образовываться эти клетки, но они оказываются неспособными организоваться в функциональные ткани и органы. Можно обнаружить в зародыше ткани пищеварительного тракта, но они не соединены между собой в целую систему, а миоциты рассеяны по личинке и также не организованы в функциональную мышечную ткань. Таким образом, функции полярной лопасти в развитии могут быть очень сложными.

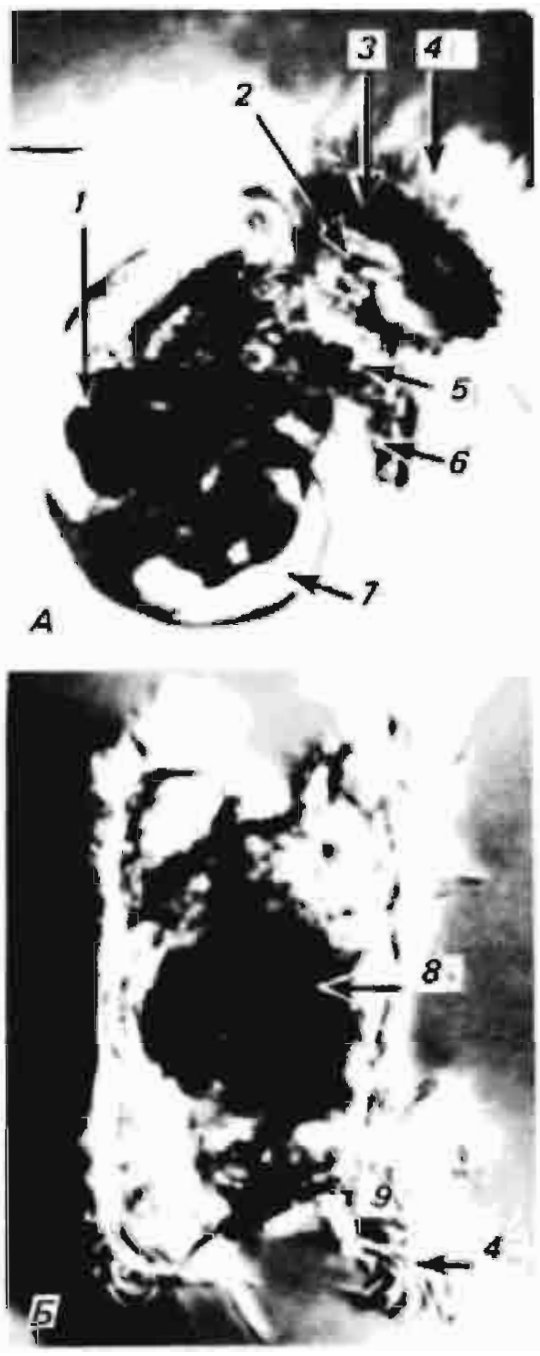


Рис. 7.14. Значение полярной лопасти в развитии *Ilyanassa*. *А*. Нормальная личинка велигер (парусник). *Б*. Аномальная личинка, образующаяся из зародыша, у которого удалена полярная лопасть бластомера D. *1* – остаток желтка; *2* – глаз; *3* – парус; *4* – реснички паруса; *5* – статоцист (орган равновесия); *6* – нога; *7* – раковина; *8* – вывернутый наизнанку стомодеум; *9* – парус с нарушенной структурой. (Из Newrock, Raff, 1975; фотографии с любезного разрешения K. Newrock.)

Детерминация у нематоды *Caenorhabditis elegans*

Для анализа закономерностей развития необходимы подходящие объекты изучения. Долгое время одним из излюбленных объектов эмбриологических исследований служили морские ежи, потому что их гаметы легко получать в больших количествах, их яйца и зародыши прозрачны, а оплодотворение и развитие могут происходить в лабораторных условиях. Но в условиях лаборатории трудно вырастить больше одного поколения морских ежей, а это делает практически невозможными генетические исследования. Генетики же (по меньшей мере те из них, кто работает с многоклеточными эукариотами) предпочитают дрозофилу. Короткий жизненный цикл, легкость разведения и наличие политенных хромосом у личинки мухи (позволяющих изучать локализацию генов) делают это животное в высшей степени подходящим для генетического анализа. Однако эмбриогенез дрозофилы очень сложен и его трудно изучать. Исследовательской группе, возглавляемой Сиднеем Бреннером (Brenner, 1974), удалось найти организм, у которого можно идентифицировать каждый ген, участвующий в развитии, и в то же время проследить судьбу клеток, происходящих от каждой единичной клетки. Это мелкая (1 мм), свободно живущая почвенная нематода *Caenorhabditis elegans* (рис. 7.15). Продолжительность эмбриогенеза у нее невелика (около 16 ч), все развитие может завершиться в чашке Петри, число образующихся типов клеток также невелико. Этот червь является гермафродитом – каждая особь содержит и яйца, и спермии. Размножение происходит путем либо перекрестного оплодотворения, либо самооплодотворения. Тело гермафродитного *C. elegans* содержит точно 959 соматических клеток, происхождение которых может быть полностью картировано с помощью наблюдений через прозрачную кутикулу (рис. 7.16; Sulston, Horvitz, 1977; Kimble, Hirsh, 1979). Кроме того, в отличие от позвоночных клеточные линии *C. elegans* почти не меняются от

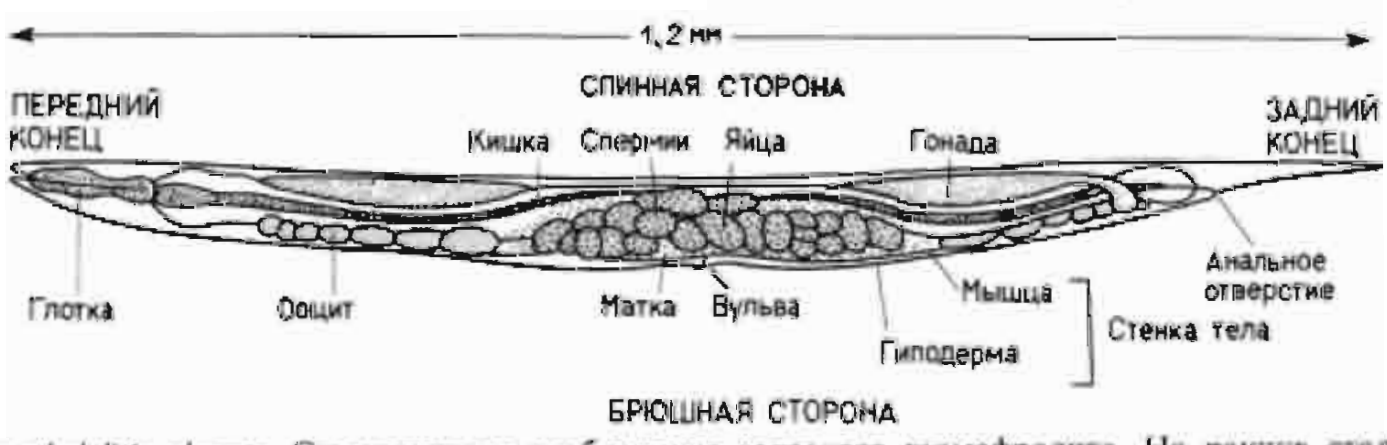


Рис. 7.15. *Caenorhabditis elegans*. Схематическое изображение взрослого гермафродита. На ранних стадиях развития формируются спермии. Эти спермии накапливаются в течение более поздних стадий, так что зрелое яйцо на своем пути к вульве проходит через них. Таким способом у гермафродитной особи собственные яйца оплодотворяются собственными спермиями. (По Sulston, Horvitz, 1977.)

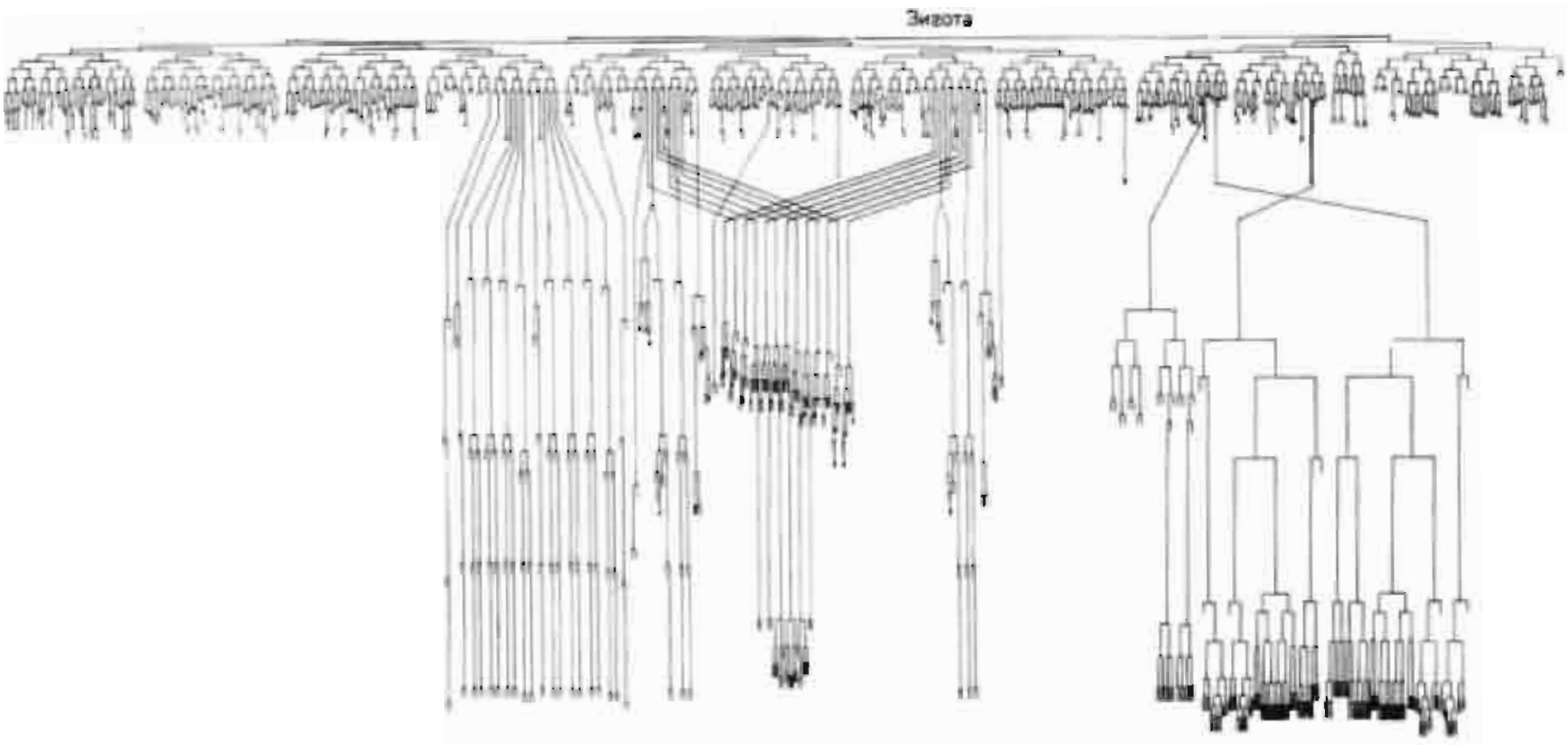


Рис. 7.16. Полная карта клеточных линий для *C. elegans*. Каждая вертикальная линия представляет собой одну клетку, каждая горизонтальная – одно клеточное деление. (Из Sulston et al., 1983.)

одной особи к другой. В их развитии мало места для случайности (Sulston et al., 1983). (Это является следствием пространственной упорядоченности цитоплазматической сегрегации.) *C. elegans* также имеет небольшое для многоклеточного организма число генов – около 3000, что примерно в 35 раз меньше, чем у млекопитающих.

Локализация цитоплазматических веществ у этого вида была продемонстрирована в убедительных и изящных опытах. Одним из таких веществ являются **гранулы первичных половых клеток** и их потомков (**P-гранулы**), которые вскоре после оплодотворения перераспределяются в зиготе и локализуются исключительно в тех клетках, которые спо-

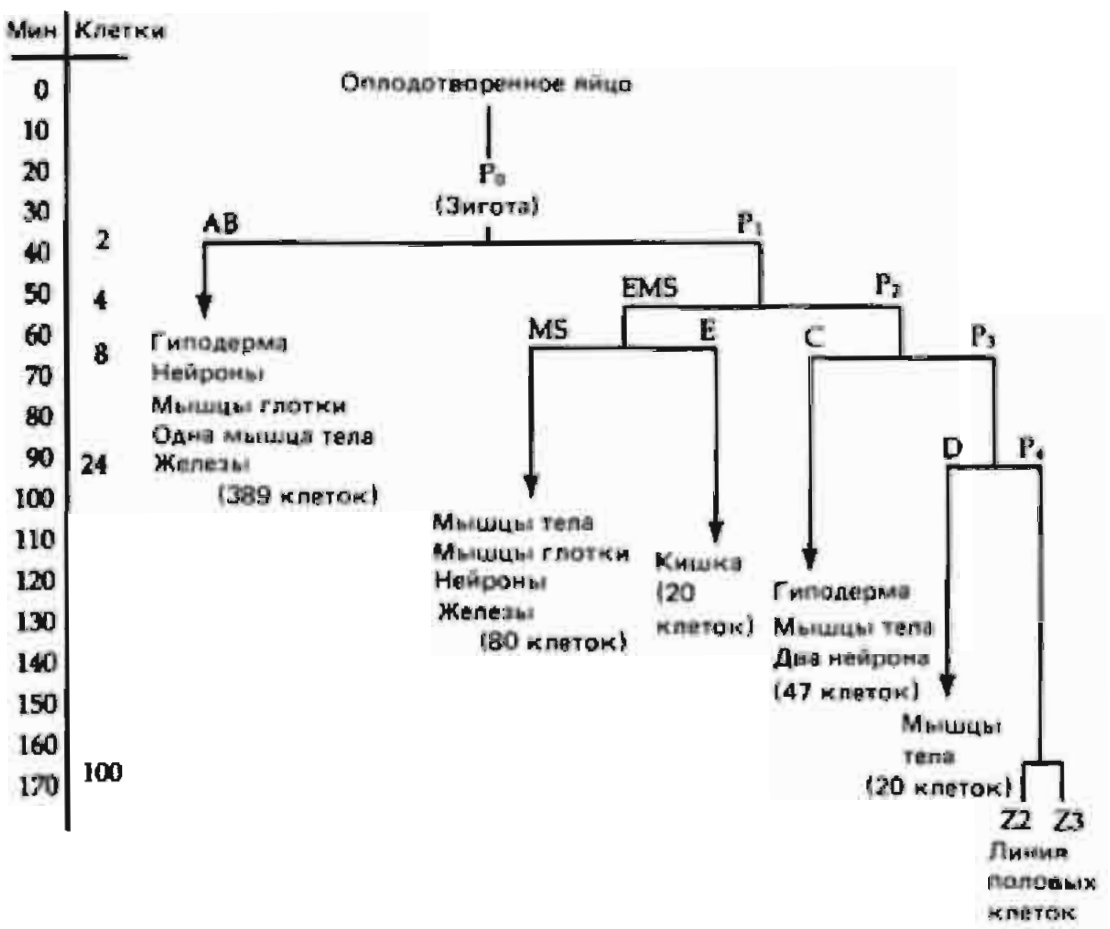


Рис. 7.17. Карта клеточных линий для *C. elegans* в сокращенном виде. Главное внимание уделено линии предшественников половых клеток (P_0–P_4), которые получают P-гранулы. Числа, указанные в скобках, относятся к тем клеткам, которые имеются у только что вылупившейся личинки. Некоторые из этих клеток продолжают делиться, и таким образом формируются 959 соматических клеток взрослого червя. (По Strome, Wood, 1982; с любезного разрешения W. Wood.)

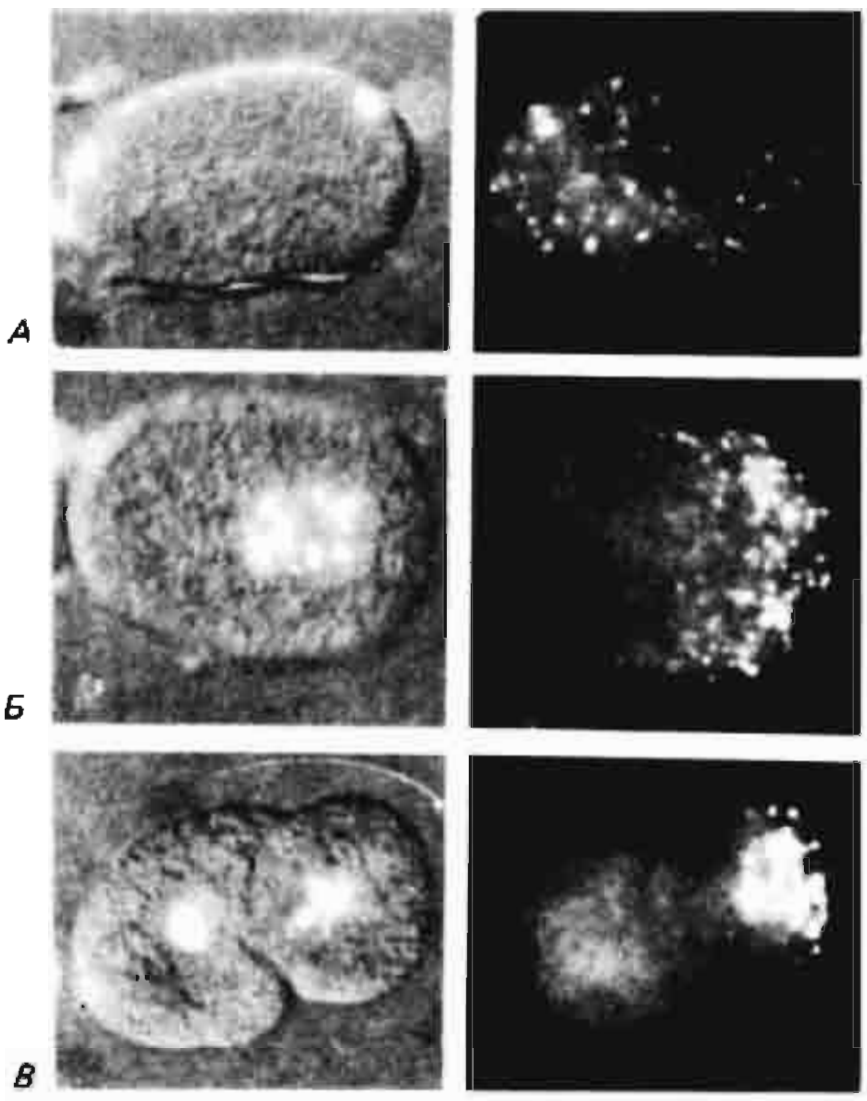


Рис. 7.18. Асимметричная локализация P-гранул в период оплодотворения и первого деления дробления. На рисунках слева представлены яйца, окрашенные на содержание ДНК; на рисунках справа – те же яйца, окрашенные флуоресцирующими антителами к белку P-гранул. *А*. Зигота до начала миграции пронуклеусов; видно, что гранулы более или менее равномерно распределены по всей зиготе. *Б*. По мере сближения пронуклеусов гранулы мигрируют к заднему концу зиготы. *В*. Двухклеточный зародыш, в котором бластомер P_1 вступил в профазу митоза, а P-гранулы перед передачей их в клетку P_2 еще более продвинулись в задний конец клетки. (Из Strome, Wood, 1983; фотографии с любезного разрешения S. Strome.)

собны к формированию гамет (рис. 7.17). Используя связанные флуоресцирующие антитела к компонентам P-гранул, Штром и Вуд (Strome, Wood, 1983) показали, что во время миграции пронуклеусов случайно рассеянные в цитоплазме P-гранулы локализуются в заднем отделе зиготы (двигаясь к месту проникновения спермия) и попадают только в бластомер P1, формирующийся из цитоплазмы, находящейся в этом отделе (рис. 7.18 и цветная таблица на внутренней стороне обложки книги). При последующем делении дробления P-гранулы до начала митоза рассеиваются по всей цитоплазме бластомера P1, но во время митоза снова мигрируют к заднему концу клетки. Здесь они оказываются сосредоточенными в бластомере P2. В конце концов P-гранулы локализуются в бластомере P4, потомки которого станут яйцами и спермиями взрослого животного.

Для движения P-гранул необходимы микрофиламенты, но оно может происходить в отсутствие микротрубочек. Обработка зиготы цитохалазином D (ингибитором образования микрофиламентов) предотвращала сегрегацию этих гранул на заднем конце клетки, тогда как демеколцин (сходный с колхицином ингибитор образования микротрубочек) не останавливал их движения (Strome, Wood, 1983). Достигнув заднего участка зиготы, P-гранулы остаются там, даже если микрофиламенты после этого разрушаются (Hill, Strome, 1987). Механизмы движения P-гранул и их прикрепления к микрофиламентам до сих пор неизвестны.

Характер развития большинства клеток *C. elegans* является типично мозаичным: их судьба строго детерминирована внутренними цитоплазматическими факторами, а не взаимодействиями между соседними клетками. Так, детерминанты для линии клеток, из которых образуется кишка, во время первого деления дробления локализованы в клетке P1, из которой позже образуется клетка-предшественник кишки (клетка E) (рис. 7.19; Laufer et al., 1980; Edgar, McGhee, 1986). Однако, как и у оболочников, у нематод сохраняется некоторая возможность клеточных взаимодействий. Кимбл (Kimble, 1981) использовал пучок лазерных лучей, чтобы избирательно убить специфические клетки, потомки которых формируют вульву (проход, через который происходит откладка яиц). Одна из клеток в этой области становится **якорной клеткой**, соединяющей лежащую над ней гонаду с вульвой. Если эту клетку разрушить, то гиподермальные (кожные) клетки не делятся и не образуют вульву. Однако, пока якорная клетка находится вблизи гиподермы, вульва формируется. Это свидетельствует о том, что якорная клетка индуцирует образование вульвы (рис. 7.20). Кроме того, шесть клеток-предшественников вульвы под влиянием якорной клетки формируют **эквивалентную группу**. В процессе нормального развития три центральные клетки этой группы делятся, образуя вульву, тогда как из трех других клеток образуются шесть гиподермальных клеток. (Если якорная клетка разрушена, то все шесть клеток эквивалентной группы делятся один раз, в результате чего возникают 12 гиподермальных клеток.) Если разрушить три центральные клетки, то три другие клетки, которые в норме образуют гиподерму, дадут начало клеткам вульвы. Таким образом, как мы уже видели на примере оболочников и улиток, явления регуляции и индукции до некоторой степени встречаются и у организмов, эмбриональное развитие которых жестко детерминировано.

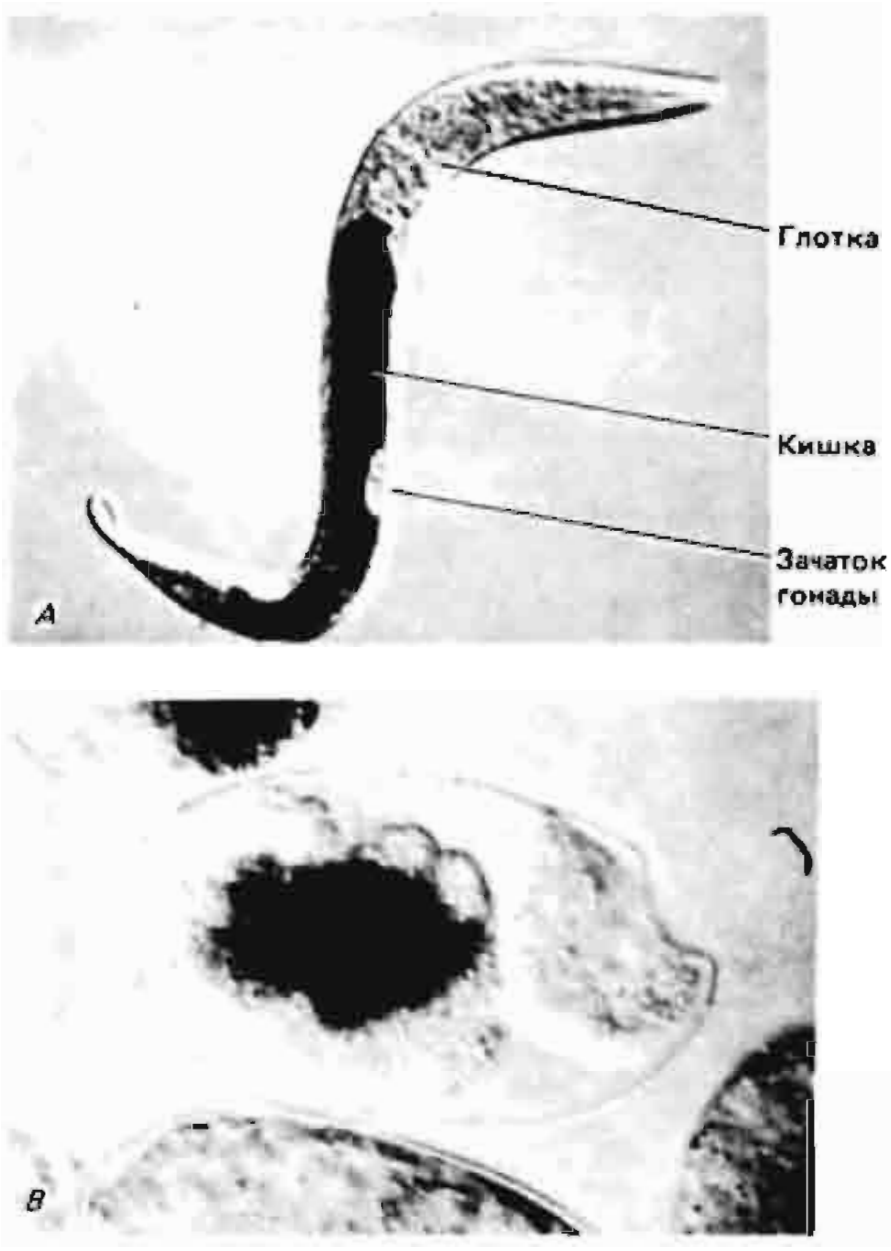


Рис. 7.19. Детерминация кишки у *C. elegans*. *А*. Клетки кишечника у только что вылупившейся личинки окрашены на выявление специфичной для кишки эстеразы. *Б*. «Половинный зародыш», развившийся из клетки AB (не формирующей кишку), которого инкубировали с цитохалазином; специфичная для кишки эстераза не выявляется. *В*. «Половинный зародыш», образовавшийся из потомков бластомера P1; в клетках выявляется специфичная для клеток кишки эстераза. (Из Edgar, McGhee, 1986; фотографии с любезного разрешения L. Edgar.)

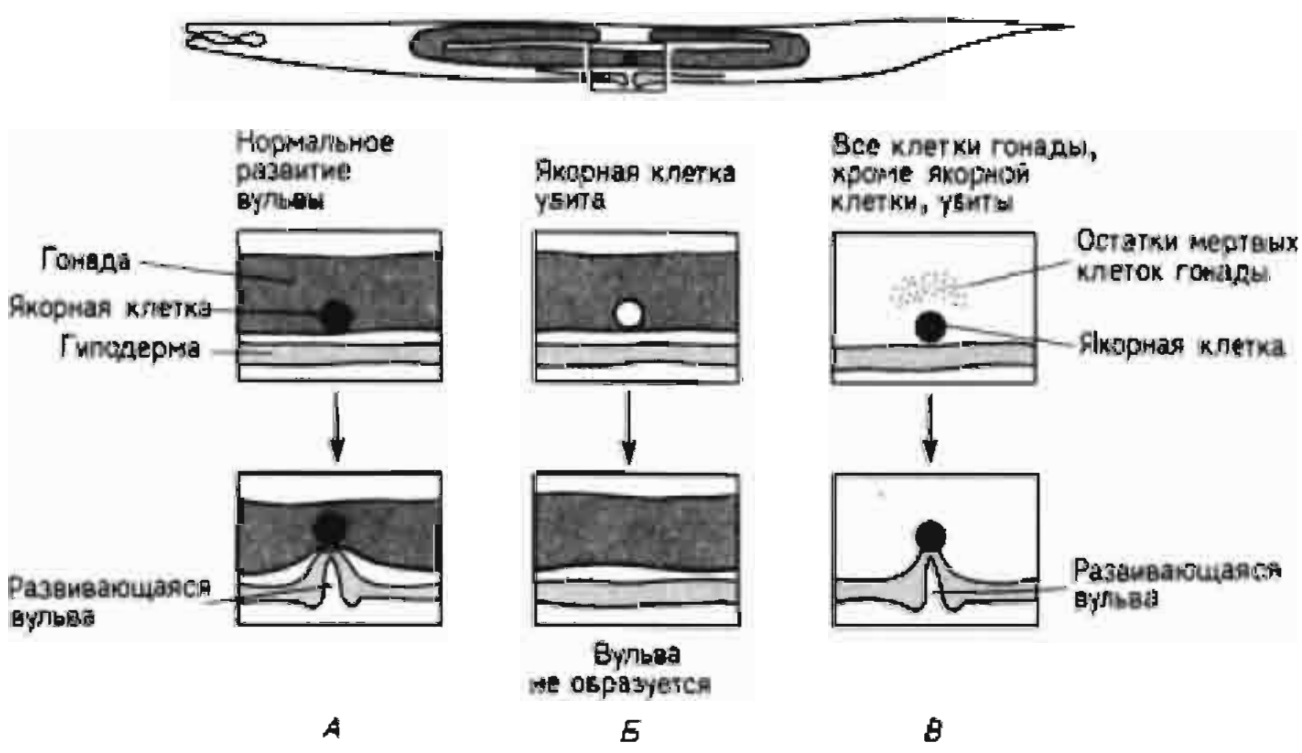


Рис. 7.20. Индукция у *C. elegans*. Схема опытов, демонстрирующих необходимость якорной клетки для формирования вульвы. (По Alberts et al., 1983.)

Цитоплазматическая локализация детерминантов половых клеток

Локализованные в цитоплазме детерминанты обнаружены во всем животном царстве. Наиболее часто встречающиеся детерминанты – это те, которые ответственны за детерминацию предшественников половых клеток, т.е. клеток, потомки которых дают начало гаметам. Даже у многих зародышей, раннее развитие которых является в основном регуляционным, клетки, содержащие определенные участки цитоплазмы, предназначены стать предшественниками половых клеток.

Детерминация половых клеток у нематод

Теодор Бовери (1862–1915) был первым ученым, наблюдавшим поведение хромосом в процессе эмбриогенеза. Изучая развитие аскариды *Parascaris aequorum* (ее прежнее название *Ascaris megalocephala*), он обнаружил любопытные особенности. Эта нематода имеет всего две хромосомы в гаплоидной клетке, что позволяет проводить детальные наблюдения над индивидуальными хромосомами. Плоскость первого деления дробления у этого животного необычна тем, что проходит по экватору, разделяя яйцо на два бластомера – анимальный и вегетативный (рис. 7.21, *А*). Однако еще более странным оказалось поведение хромосом во время последующего деления этих двух первых бластомеров. Непосредственно перед следующим делением анимального бластомера концы его хромосом распадаются на десятки фрагментов. Не все фрагменты включаются затем в хромосомы образующихся ядер. В результате клетки утрачивают огромное число генов (Tobler et al., 1972). Это явление называется **элиминацией хромосом** или **диминуцией** хроматина. Между тем в вегетативном бластомере диминуции хроматина не происходит. Во время второго деления анимальная клетка делится меридионально, тогда как вегетативная клетка – опять экваториально. Обе клетки, происходящие из вегетативного бластомера, имеют нормальные хромосомы. Однако перед третьим делением хромосомы одного из двух вегетативных бластомеров, расположенного более анимально, фрагментируются. Таким образом, на 4-клеточной стадии только одна клетка, занимающая наиболее вегетативное положение, содержит полный набор генов. В течение последующих делений вплоть до 16-клеточной стадии происходит разделение линии соматических клеток, в которых произошла диминуция хроматина, и только в двух клетках хроматин не подвергся диминуции. Один из этих двух бластомеров дает начало первич-

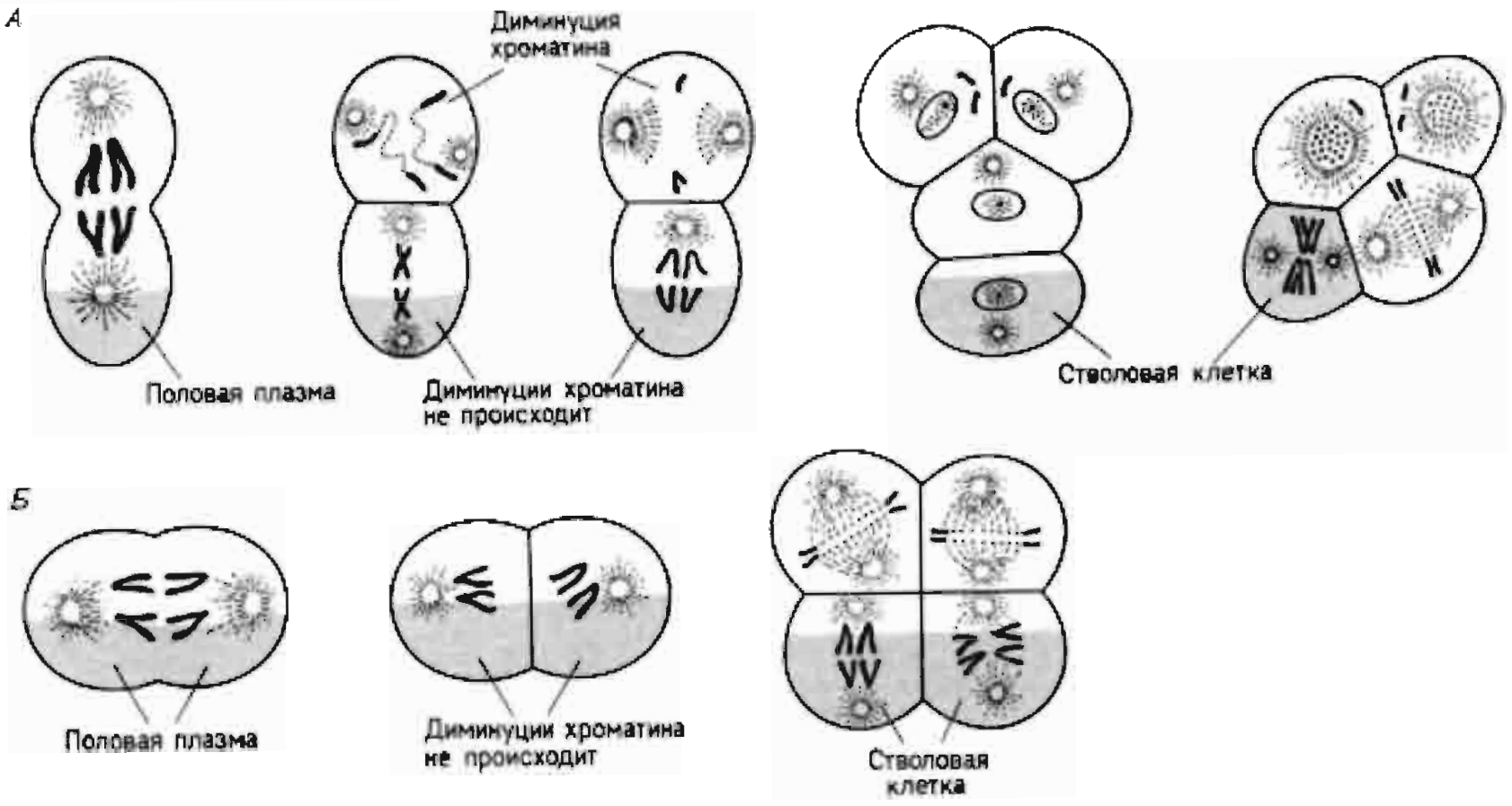


Рис. 7.21. Распределение половой (зародышевой) плазмы (показана серым цветом) в период дробления нормальной (*А*) и центрифугированной (*Б*) зигот *Parascaris*. *А*. Зародышевая плазма в норме сохраняется только в одном, вегетативном бластомере; об этом свидетельствует отсутствие в нем диминуции хроматина. Таким образом, на 4-клеточной стадии зародыш имеет одну стволовую клетку для гамет. *Б*. Если плоскость первого деления дробления смещают с помощью центрифугирования на 90°, то зародышевая плазма оказывается в обеих дочерних клетках и ни у одной из них не происходит диминуции хроматина. После второго деления эти две клетки становятся клетками – предшественниками гамет. (По Waddington, 1966.)

ным половым клеткам; в другом в конечном итоге также происходит диминуция хроматина и из него формируются соматические клетки. Хромосомы сохраняются интактными только в тех клетках, которым предназначено формировать линии половых клеток. В противном случае количество генетической информации должно было бы уменьшаться в каждом последующем поколении. Клетки, в которых происходит диминуция хроматина, дают начало соматическим клеткам.

Бовери называли последним великим наблюдателем в эмбриологии и первым из великих экспериментаторов (Шпеман и Вильсон посвятили ему свои главные книги). Не довольствуясь одним наблюдением того, что полный набор хромосом сохраняется лишь в половых клетках, Бовери решил проверить, не защищает ли хроматин от диминуции цитоплазма этой специфической области. Если такое предположение правильно, то любое ядро, попавшее в эту область, должно оказаться под ее защитой. С целью проверки своей гипотезы Бовери (1910) центрифугировал яйца *Parascaris* незадолго до первого деления дробления. Эта процедура вызывала изменение ориентации митотического веретена. Если веретено формировалось перпендикулярно к его нормальной ориентации, то оба образовавшихся затем бластомера должны были содержать некоторое количество вегетативной цитоплазмы (рис. 7.21, *Б*). И действительно, Бовери обнаружил, что после первого деления ни в одном из ядер не происходило диминуции хроматина. Однако следующее деление было экваториальным – по анимально-вегетативной оси. В двух возникших в результате деления анимальных бластомерах произошла диминуция хроматина, тогда как в двух вегетативных клетках ее не было. Исходя из этого, Бовери пришел к выводу, что вегетативная цитоплазма содержит фактор (или факторы), который защищает ядра от диминуции хроматина и детерминирует судьбу этих клеток, предназначая их для образования половых клеток.

Детерминация половых клеток у насекомых

Яйца некоторых насекомых также содержат зародышевую плазму, функция которой, по-видимому, очень сходна с функцией зародышевой плазмы у *Parascaris*. У галлицы *Wachtiella persicariae* бóльшая часть ядер утрачивает 32 из 40 исходных хромосом! Однако на заднем полюсе яйца находятся два ядра, в которых не происходит диминуции хроматина и которые в течение некоторого времени не делятся (рис. 7.22). Потомки этих двух ядер в конечном счете включаются в первичные половые

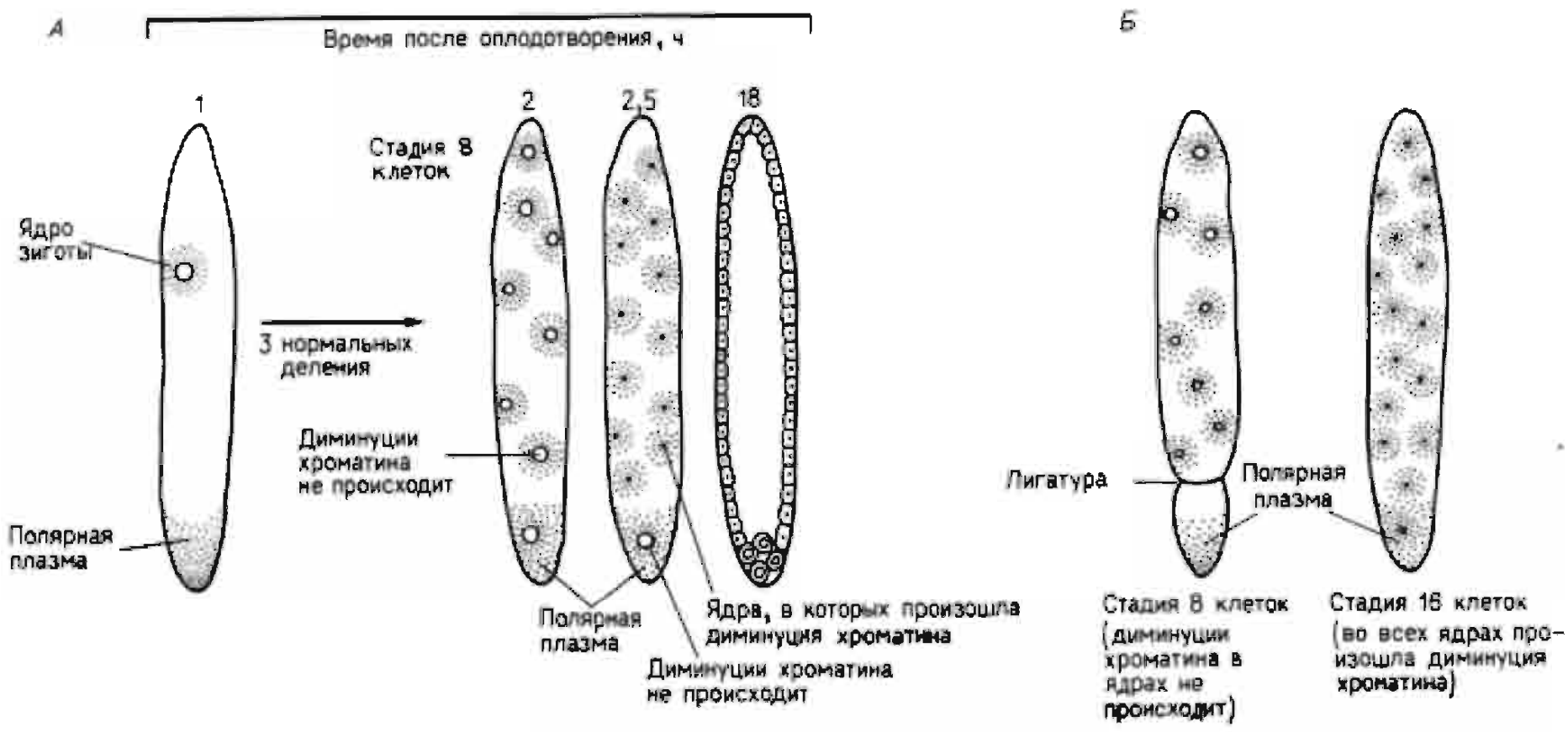


Рис. 7.22. Сегрегация линии половых клеток и диминуция хроматина у *Wachtiella*. *А*. Диминуция хроматина зависит от положения ядер. Первые три деления являются нормальными. После этого все ядра, за исключением одного, лежащего на заднем полюсе яйца, теряют 32 из 40 хромосом. *Б*. Если на стадии 8 клеток в области заднего полюса зародыша наложить лигатуру так, чтобы ни одно ядро не могло войти в эту область, то во всех ядрах на стадии 16 клеток происходит диминуция хроматина, даже если связь с полярной плазмой восстановлена. (По Geyer-Duszynska, 1959.)

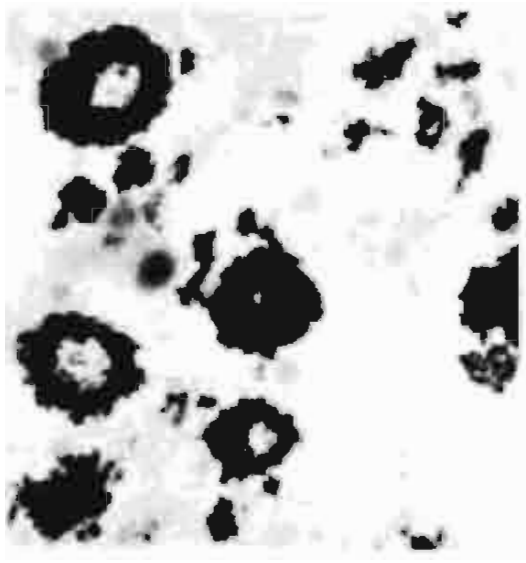


Рис. 7.23. Полярные гранулы из фракционированных полярных клеток дрозофилы. Микрофотография получена с помощью просвечивающего электронного микроскопа. (С любезного разрешения A. P. Mahowald.)

клетки[1]. Если препятствуют миграции этих ядер в область заднего полюса путем наложения лигатуры, то в каждом ядре происходит диминуция хроматина и возникающая из такого яйца галлица оказывается стерильной. Если ослабить лигатуру и позволить таким ядрам переместиться в область заднего полюса, то первичные половые клетки образуются, но они никогда не становятся функциональными гаметами (Geyer-Duszynska, 1959). Было показано (Kunz et al., 1970), что элиминированный хроматин содержит гены, являющиеся активными в период образования первичных половых клеток.

Герминативная цитоплазма насекомых отличается от любой другой цитоплазмы яйца. Хегнер (Hegner, 1911) обнаружил, что при удалении или разрушении этой области до формирования клеток на заднем полюсе яиц некоторых жуков зародыши, развившиеся из таких яиц, не имеют половых клеток и оказываются стерильными. Очень удачно, что эта задняя **полярная плазма** маркирована **полярными гранулами** (рис. 7.23). Роль этих гранул в детерминации половых клеток неизвестна, однако их постоянная связь с полярной плазмой и с происходящими из нее **полярными клетками** делает полярные гранулы удобными маркерами этой области яйца. Данную область полярных клеток легко идентифицировать с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 7.24).

---

[1] Пример галлицы и *Parascaris* выглядит как очень убедительное доказательство в пользу гипотезы Вейсмана о сегрегации ядерных детерминантов (которая обсуждается в гл. 8). Эти случаи диминуции хроматина и элиминации хромосом являются исключениями из общего правила (гл. 9 и 10), поскольку обычно в ядрах дифференцированных клеток сохраняются неиспользуемые гены; мы не располагаем данными о том, что в различных соматических клетках *Wachtiella* или *Parascaris* сохраняются разные части их генома.

Современные исследования полярной цитоплазмы проводятся преимущественно на зародышах дрозофилы. В течение первых двух часов после оплодотворения зародыш дрозофилы развивается как **синцитий**. Иными словами, происходит только деление ядер без соответствующего деления цитоплазмы. В результате формируется **слой неклеточной синцитиальной бластодермы**, содержащий около 3500 ядер. Каждое ядро окружается клеточной мембраной, и бластодермальный слой становится **клеточной бластодермой**. Опыты по трансплантации (Zalokar, 1971; Illmensee, 1968, 1972) показали, что все ядра синцития эквивалентны и тотипотентны. Однако клетки в клеточной бластодерме строго детерминированы. К сходному заключению пришли и другие исследователи (Schubiger, Wood, 1977), которые накладывали лигатуры на яйца дрозофилы, находящиеся на разных стадиях развития. В ядрах дрозофилы диминуции хроматина не происходит и ядро синцитиальной стадии может дать начало либо первичным половым, либо соматическим клет-

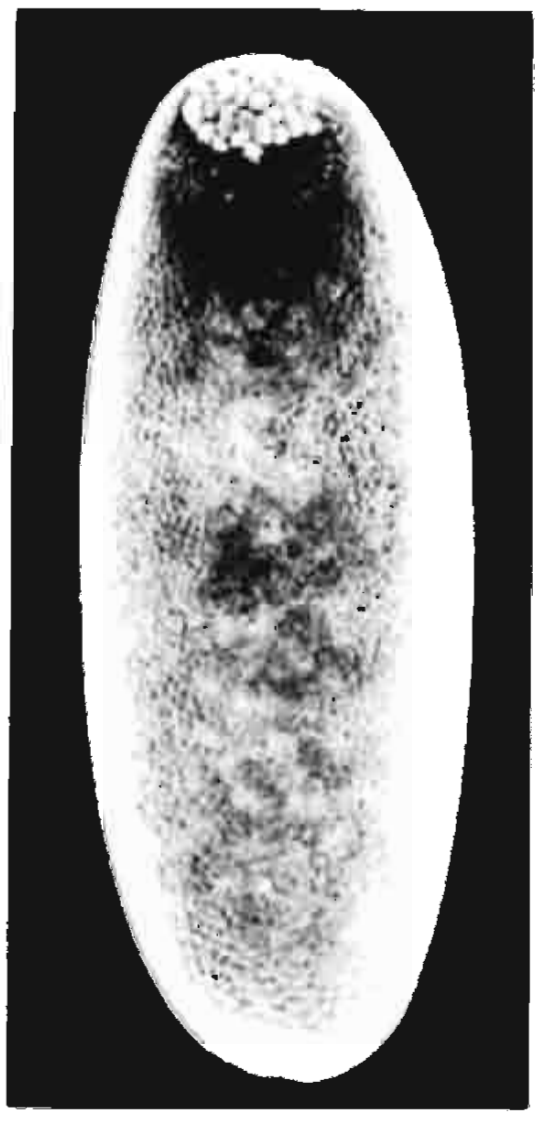


Рис. 7.24. Полярные клетки зародыша дрозофилы непосредственно перед завершением делений дробления. Они видны на верхнем конце зародыша. Фотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения A. P. Mahowald.)

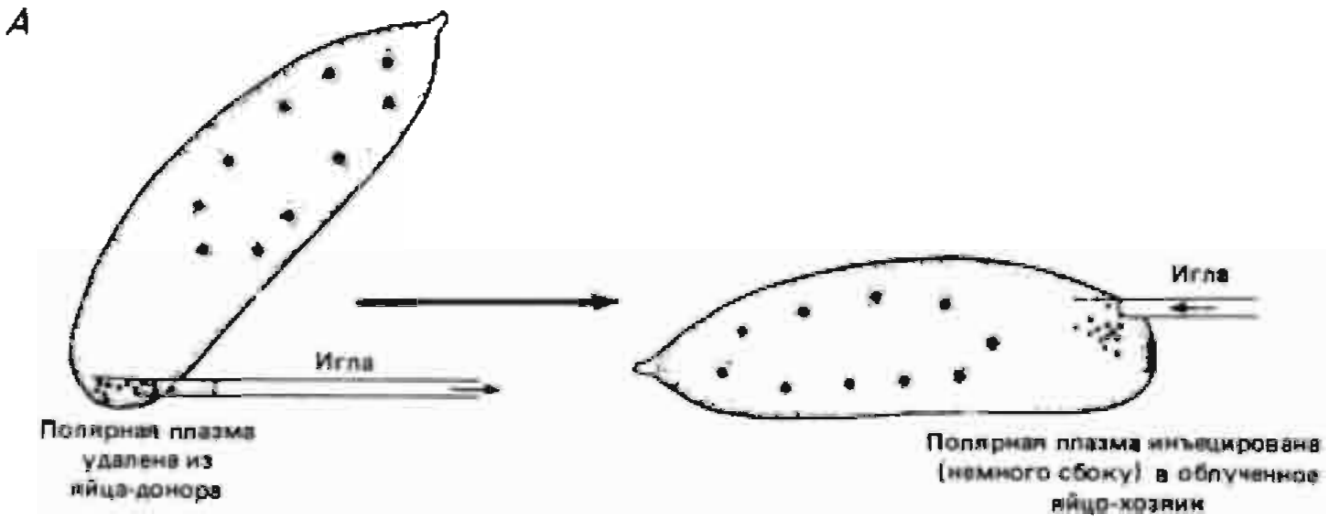


Рис. 7.25. Способность полярной плазмы «излечивать» зародыш от индуцированной облучением стерильности. *А*. Методика трансплантации полярной плазмы от необлученного донора к облученному хозяину. *Б*. Продольные срезы через заднюю область зародыша дрозофилы, фиксированного к моменту завершения периода дробления. *I* – нормальный зародыш с бластодермой и полярными клетками; *II* – зародыш, который был облучен на ранней стадии дробления; бластодерма сформировалась, но полярные клетки отсутствуют; *III* – зародыш, облученный на ранних стадиях дробления, которому затем инъецировали полярную плазму от нормального зародыша. Видны бластодерма и полярные клетки. (Из Okada et al., 1974.)

кам. Их детерминация зависит от области яйца, в которую они мигрируют. Одной из этих областей является задняя полярная плазма. Таким образом, полярная плазма, по-видимому, содержит морфогенетические детерминанты для образования половых клеток.

Было обнаружено (Geigy, 1931), что облучение полярной плазмы ультрафиолетом приводит к стерильности мух, развившихся из облученных яиц, а Окада и др. (Okada et al., 1974), продолжившие эту линию исследований, показали, что введение полярной плазмы из необлученных зародышей-доноров в облученные яйца устраняет их стерильность (рис. 7.25). Введение любой другой части цитоплазмы в их опытах не приводило к такому результату.

В том же, 1974 г. автономность этой цитоплазматической области и ее способность детерминировать любое ядро дрозофилы была доказана остроумными опытами Илмензи и Мэховалда (Illmensee, Mahowald, 1974). В этих опытах (рис. 7.26) неправдоподобно малое количество (5–100 пиколитров) энуклеированной полярной плазмы было перенесено из яиц дрозофилы дикого типа (донор) в область *переднего* полюса генетически маркированных яиц (хозяин) до их целлюляризации. (Эти яйца хозяина несли хромосомные мутации *multiple wing hair* (*mwh*) и *ebony* (*e*).) После формирования клеточной бластодермы клетки переднего полюса зародыша-хозяина напоминали нормальные полярные клетки заднего полюса, содержали включенные в них полярные гранулы и их морфология была типичной для нормальных полярных клеток. Чтобы проверить, станут ли эти клетки предшественниками функциональных половых клеток, Мэховалд и Илменси трансплантировали модифицированные клетки переднего полюса в заднюю область дробящихся зародышей, содержащих свои собственные генети-

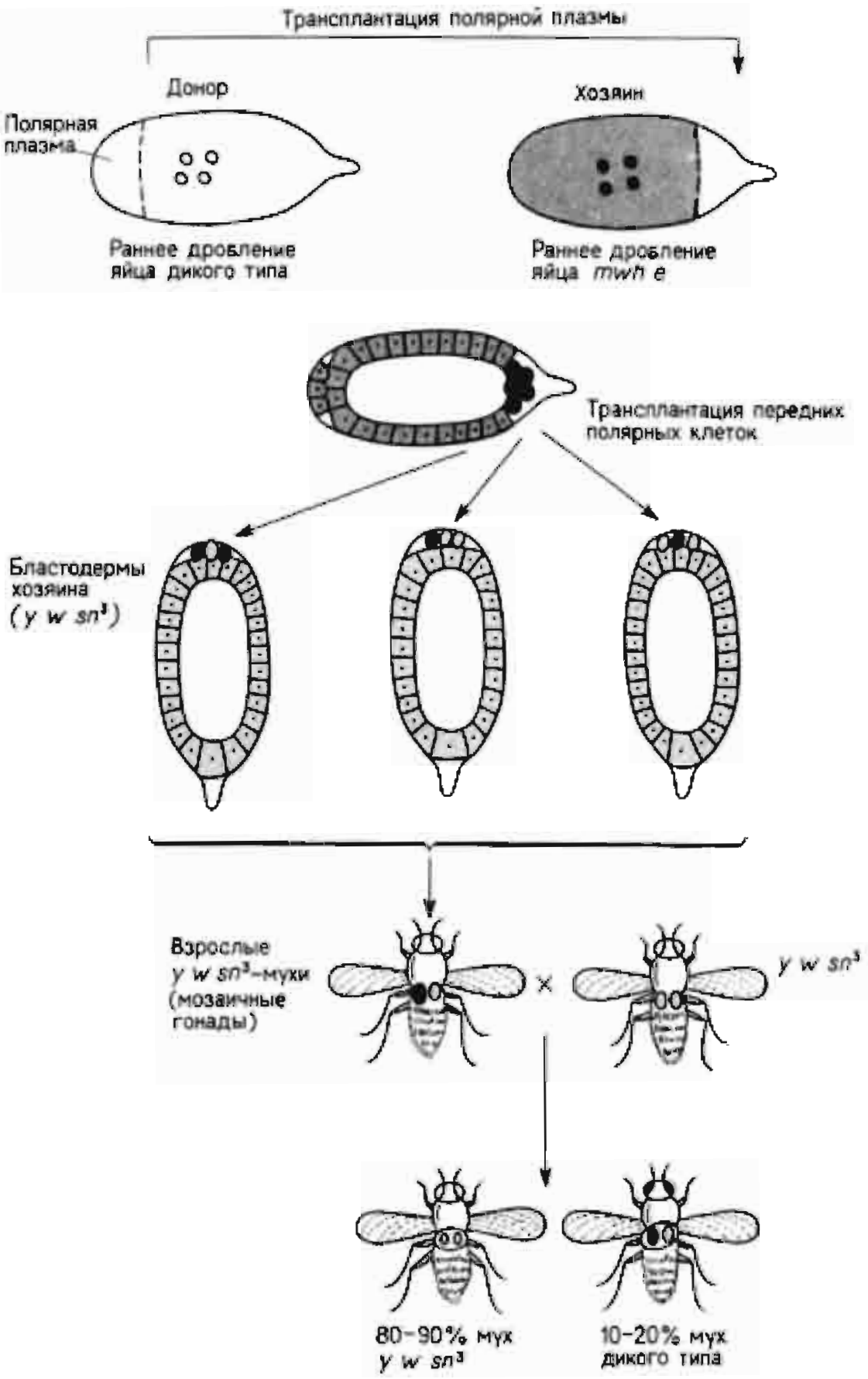


Рис. 7.26. Способность зародышевой (полярной) плазмы детерминировать судьбу клеток, которые ее содержат. Полярную плазму яйца дрозофилы дикого типа (белое) инъецировали в передний (но не в задний) полюс генетически маркированных (мутантных) зародышей (обозначен темно-серым цветом). Образовавшиеся на переднем полюсе клетки напоминали нормальные клетки – предшественники половых клеток, которые видны на заднем полюсе. Эти передние полярные клетки затем трансплантировали в область заднего полюса зародыша-хозяина (обозначен светло-серым цветом), маркированного другими мутациями так, что потомки этих клеток могли мигрировать в гонады. Когда этих мух спаривали с мухами, несущими ту же вторую группу маркеров (но не имевшими трансплантированных клеток), часть потомства оказывалась дикого типа. Следовательно, половые клетки такого потомства произошли не от родительской линии мух. (По Illmensee, Mahowald, 1974.)

чески маркированные полярные клетки[1]. Эти новые зародыши-хозяева были маркированы по другим мутациям – рецессивным *yellow* (*y*), *white* (*w*) и *singed* (*sn*³). Все мухи, развившиеся из таких зародышей, несли мутации *yellow*, *white* и *singed*. Этих мух скрестили с другими мухами, несущими такие же мутации. В большинстве случаев (88 из 92 скрещиваний) в потомстве появились особи, идентичные обоим родителям. Однако в четырех случаях возникли потомки дикого типа. Их появление указывало на то, что некоторые половые клетки у этих мух произошли из трансплантированных клеток, следовательно, половая плазма одного зародыша была способна побудить ядра клеток в области переднего полюса другого зародыша детерминировать развитие функциональных половых клеток! Использован-

[1] Это было сделано для того, чтобы дать им возможность включиться в развивающуюся гонаду. Имеются данные, полученные на других организмах, о том, что полярная плазма содержит также детерминанты для соответствующей *миграции* половых клеток в гонады (Züst, Dixon, 1977; Ikenishi, Kotani, 1979).

ная методика оказалась также полезной для установления времени локализации этого детерминанта. Илменси и др. (Illmensee et al., 1976) обнаружили, что детерминант первичных половых клеток способен функционировать до оплодотворения и локализуется в развивающемся ооците примерно в то же самое время, когда желток достигает его заднего конца.

Сама природа предоставляет в наше распоряжение свидетельства о значении полярной плазмы и полярных гранул для развития половых клеток. Самка дрозофилы, гомозиготная по мутации *grandchildless*, продуцирует фенотипически нормальное, но стерильное потомство [*GG* (самец) × *gg* (самка) → *Gg* (стерильны)]. Мэховалд и др. (Mahowald et al., 1979) показали, что если таких самок спарить с нормальными самцами, то ядра зародышей, получившихся в результате скрещивания, никогда не мигрируют в полярную плазму яйца. У этих зародышей полярные клетки не образуются, а у получившихся взрослых особей нет первичных половых клеток, из которых развиваются гаметы. Другая мутация с материнским эффектом – *agametic* – вызывает отсутствие первичных половых клеток примерно у половины потомков, полученных от гомозиготных самок. В этом случае у потомков формируется нормальное число полярных клеток, но полярные гранулы разрушаются вскоре после оплодотворения (Engstrom et al., 1982). Опыты по трансплантации показали, что дефект заключается в самой полярной плазме, а не в яичнике. Таким образом, теперь получены очень четкие доказательства того, что полярные гранулы имеют прямое отношение к образованию половых клеток.

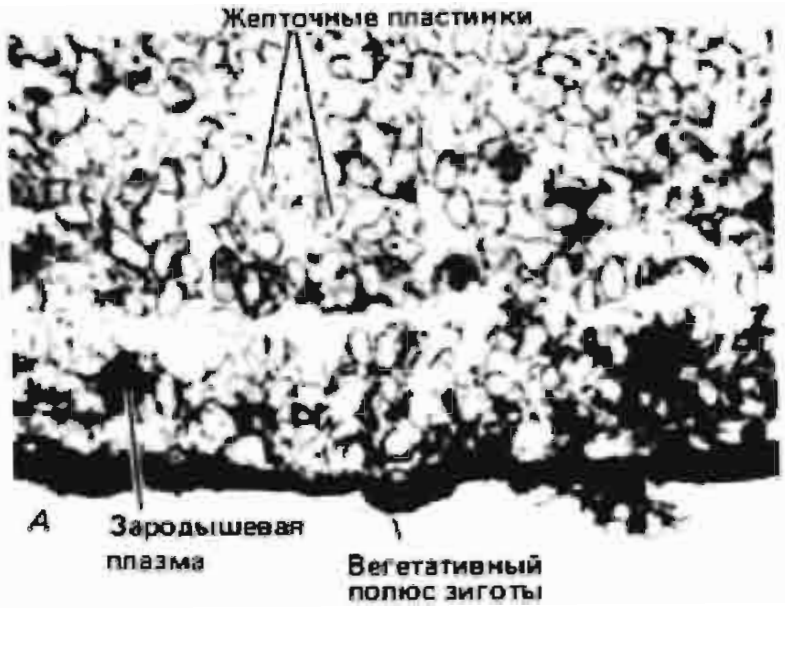
Эти полярные гранулы были выделены из зародышей дрозофилы (Waring et al., 1978); оказалось, что они содержат белок и РНК. Молекулярная масса этого белка (в гранулах, по-видимому, преобладает один белок) равна 95 000; он обладает основными свойствами и синтезируется заново в период оогенеза, так что полярные гранулы не наследуются непосредственно через цитоплазму яйца. РНК присутствует в полярных гранулах ооцита, но не обнаруживается после того, как сформировались полярные клетки (Mahowald, 1971a, b). Возможно, что эта РНК чрезвычайно важна для формирования половых клеток. Окада и Кобаяси (Okada, Kobayashi, 1987) инъецировали РНК из яиц и ранних дробящихся зародышей дрозофилы зародышам, у которых полярные клетки были убиты ультрафиолетом. Эти зародыши-хозяева формировали полярные клетки и развивались в мух, имевших половые клетки.

Полярные гранулы изменяются в процессе развития. До оплодотворения плотные гранулы, содержащие мембраны, группируются вокруг митохондрий, а затем диспергируются, прежде чем ядра достигнут полюса. Впоследствии полярные клетки включают в себя эти гранулы. Когда полярные клетки мигрируют в половой валик, полярные гранулы деконденсируются на филаменты, называемые nuage. Этот материал скапливается около оболочки ядра. Такое поведение полярных гранул обнаружено у всех изученных представителей животного царства (Eddy, 1975) и, вероятно, имеет важное значение для гаметогенеза.

Детерминация половых клеток у амфибий

Цитоплазматическая локализация детерминантов половых клеток установлена также у зародышей позвоночных животных. Бунур (Bounoure, 1934) показал, что вегетативная область оплодотворенного яйца лягушки содержит материал, окрашивающийся так же, как полярная плазма у дрозофилы (рис. 7.27). Этот автор проследил судьбу кортикальной цитоплазмы до тех немногих клеток в презумптивной энтодерме, которые в норме будут мигрировать в половую складку. Блэклер (Blackler, 1962) получил убедительные данные о том, что эти клетки являются предшественниками первичных половых клеток. Он удалял определенную область энтодермы у зародыша лягушки на стадии нейрулы и пересаживал ее в такую же область другому зародышу лягушки, находящемуся на той же стадии развития (рис. 7.28). Зародышей-доноров было легко отличить от хозяев, так как их клетки содержали только одно ядрышко вместо обычных двух. Лягушки-хозяева относились к дикому типу (т. е. имели по два ядрышка в одном ядре). После операции из нейрул доноров развивались стерильные лягушки. Отсюда следовало, что зародыш на стадии нейрулы неспособен к регуляции дефекта и что удаленная область была выбрана правильно. Однако из нейрул-хозяев развивались фертильные особи. Более того, если этих лягушек спаривали с нормальными самцами, то потомство было смешанным – получались лягушки, в клетках которых содержалось по одному или по два ядрышка. Таким образом, некоторые из гамет хозяина происходили из энтодермальной области *зародыша-донора*. Если бы ни одна гамета не развивалась из ткани донора, то у 100% лягушек в клетках содержалось бы по два ядрышка. Если бы каждая половая клетка вела свое происхождение от тканей донора, то соотношение одно- и двуядрышковых особей в потомстве составляло бы 1 : 1, как это показано на рис. 7.28. В некоторых опытах именно последний результат и был получен.

Бунур и др. (Bounoure et al., 1939) показали, что если вегетативный полюс оплодотворенных яиц лягушки облучить ультрафиолетовым светом, то из



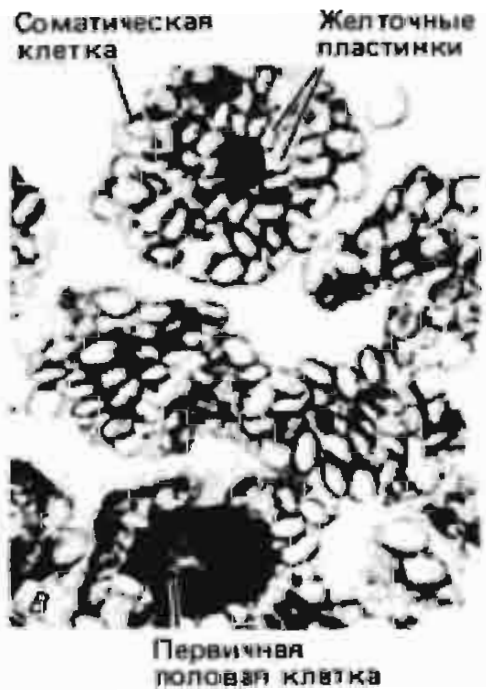


Рис. 7.27. Зародышевая плазма в зародышах лягушки. *А.* Зародышевая плазма (темные участки) вблизи вентрального (вегетативного) полюса только что оплодотворенного яйца. *Б.* Содержащая зародышевую плазму клетка из энтодермальной области бластулы лягушки; ядро клетки находится на стадии анафазы. Следует подчеркнуть, что зародышевая плазма попадает только в одну из двух богатых желтком дочерних клеток. *В.* Первичная половая клетка и соматические клетки вблизи дна бластоцеля у зародыша на стадии ранней гаструлы. (Фотографии с любезного разрешения A. Blackler.)

таких яиц развивались стерильные взрослые лягушки, хотя во всех других отношениях они были нормальными. В 1966 г. Л. Деннис Смит (Smith, 1966) продолжил эти исследования, облучая ультрафиолетом разные области зародыша лягушки. Он обнаружил, что облучение анимального полушария не влияет на нормальное развитие, тогда как облучение вегетативного полюса приводит к образованию головастиков, в половой складке которых не было видно крупных первичных половых клеток. Смит выявил значение этой области цитоплазмы путем инъекции цитоплазмы из разных областей нормальных зигот в вегетативную (презумптивную вентральную) область облученным зиготам. Если вводили цитоплазму из области анимального полюса, то эффекта не обнаруживалось и у головастиков, развившихся из таких яиц, отсутствовали половые клетки. Если же инъецировали цитоплазму из области вегетативного полюса, то у головастиков в половой складке были видны первичные половые клетки. Позже было показано (Züst, Dixon, 1977), что первичные половые клетки действительно достигают половой складки у головастиков, зародышевая плазма которых была облучена на стадии 2 или 4 бластомеров. Однако в гонаде содержалось значительно меньше клеток, чем в норме, и по размерам они были не больше 1/10 величины нормальных первичных половых клеток. Их ядра были неправильной формы, и клетки достигали гонад значительно позже, чем их двойники из необлученных яиц. Итак, подобно полярной плазме у дрозофилы, цитоплазма вентральной области зиготы у лягушки содержит детерминанту, которая определяет образование половых клеток и их миграцию, чувствительна к облучению ультрафиолетом и может быть перенесена в другую область вместе с частью жидкой цитоплазмы.

Генетика цитоплазматических детерминантов у дрозофилы

В 1936 г. эмбриолог Джаст (Just, 1936) критиковал тех генетиков, которые полагали, что объяснить процессы развития можно, изучая мутации, влияющие на окраску глаза, число щетинок и форму крыла. Он говорил, что не интересуется развитием щетинок на спине мухи, а хочет знать, как у зародыша мухи образуется сама спина. Спустя 50 лет эмбриологи и генетики, наконец, ответили на этот вопрос.

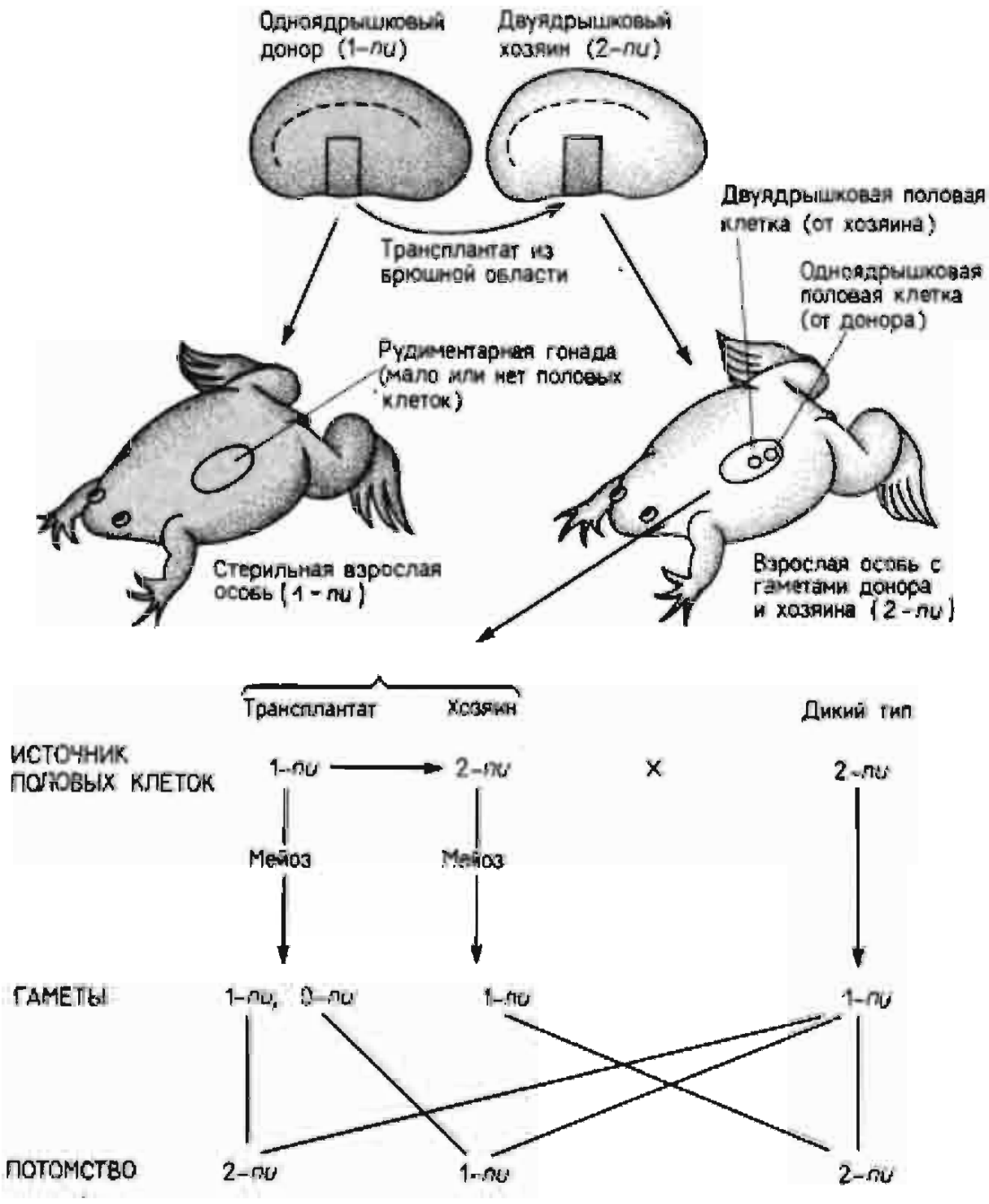


Рис. 7.28. Обнаружение первичных половых клеток в эктодерме нейрулы лягушки. Участок ткани из вентральной области зародыша-донора *из* линии лягушек, в клетках которых имеется только по одному ядрышку (1-*nu*), пересаживали в аналогичную область зародыша-хозяина из линии лягушек, клетки которых содержат по два ядрышка (2-*nu*). Взрослое животное, развивавшееся из зародыша-донора, оказывалось стерильным, тогда как зародыш-хозяин развивался в лягушку, у которой имелись гаметы двух типов – 1-*nu* и 2-*nu*. Этот факт был подтвержден в опытах по скрещиванию лягушки-хозяина с нормальной (двуядрышковой) особью; результаты такого скрещивания показаны в графической форме в нижней части рисунка. Некоторые из потомков имели только по одному ядрышку в клетках; это свидетельствовало о том, что они получили одно ядрышко от одного из родителей (двуядрышковой линии) и не получили ни одного ядрышка от другого родителя (лягушка двуядрышковой линии с некоторым количеством одноядрышковых половых клеток). (По Blackler, 1966.)

В настоящее время мы располагаем данными о существовании в яйцах двукрылых насекомых трех групп детерминантов. Одну группу составляют факторы, детерминирующие образование полярных и первичных половых клеток, которые уже обсуждались в этой главе. Вторая группа цитоплазматических детерминантов контролирует дорсовентральную полярность, разграничивающую спинную и брюшную области у личинки мухи. Третья группа детерминантов устанавливает переднезаднюю полярность (голова–хвост) развивающегося насекомого.

Дорсовентральная полярность. Дорсовентральная полярность у дрозофилы определяется (специфицируется) по меньшей мере 11 продуктами деятельности генома матери, накапливающимися в ооците по мере его развития. Андерсон и Нюсслейн-Вольгард (Anderson, Nüsslein-Volhard, 1984) изолировали 10 генов с материнским эффектом, отсутствие каждого из которых связано с отсутствием вентральных

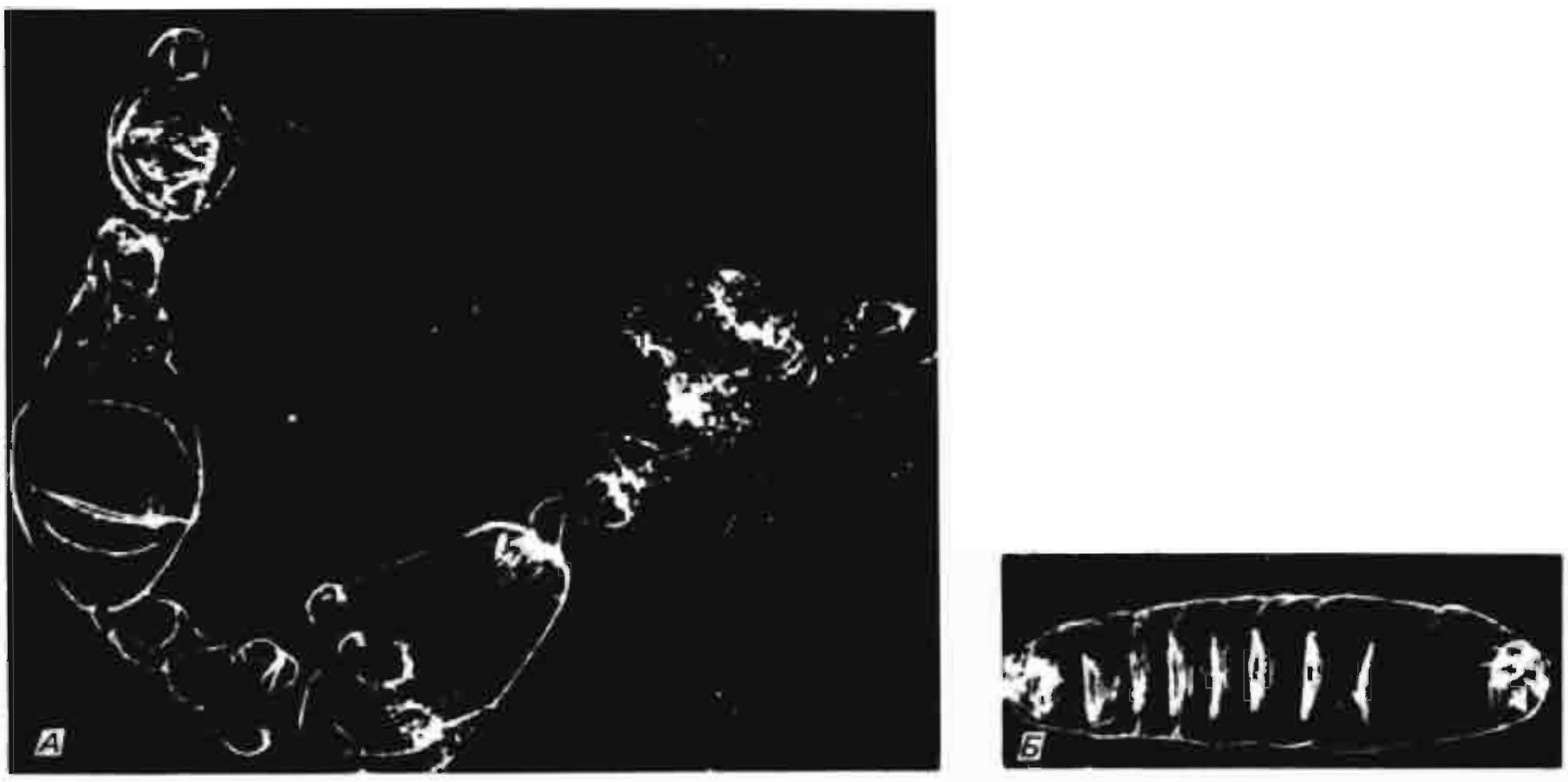


Рис. 7.29. Предотвращение развития дефектов у личинки путем инъекции мРНК из яиц дикого типа в яйца, предназначенные иметь фенотип *snake*. *А*. Деформированная личинка, состоящая исключительно из дорсальных клеток. Такие личинки развиваются из яиц самок, гомозиготных по аллелю *snake*. *Б*. Фенотип дикого типа у личинки, развившейся из яйца самки *snake*, в которое была инъецирована мРНК из яиц дикого типа. (Из Anderson, Nüsslein-Volhard, 1984; фотографии с любезного разрешения C. Nüsslein-Volhard.)

структур. В некоторых случаях материнским продуктом является, по-видимому, белок, тогда как в других случаях самка мухи снабжает яйцо специфической мРНК. Одна из мутаций, связанных с материнским эффектом, называется *snake*. Самки, гомозиготные по этой мутации, продуцируют яйца, которые развиваются в полностью дорсализованных зародышей. У них отсутствуют кутикула и структуры, типичные для брюшка личинки. Такие зародыши могут быть «исправлены» инъекцией небольшого количества цитоплазмы из яиц дикого типа. Показано, что активный компонент цитоплазмы яйца дикого типа представляет собой накопленную в оогенезе мРНК, поскольку если мРНК экстрагировали из яиц дикого типа и затем инъецировали мутантным зародышам на стадиях раннего дробления, то вентральные структуры и кутикула развивались нормально (рис. 7.29). Таким образом, здесь мы встречаемся с ситуацией, когда в материнском гене закодирована мРНК, необходимая для дорсовентральной спецификации. В отсутствие этого продукта все клетки развиваются в дорсальные структуры, но когда этой мРНК снабжают дефектных зародышей, их нормальное развитие восстанавливается.

Рецессивная мутация *Toll* имеет сходный дорсализованный фенотип, и инъекция мРНК из яиц дикого типа восстанавливает дорсовентральную полярность яиц, отложенных матерями *Toll*$^-$/*Toll*$^-$. Но в отличие от случая *snake* в данной ситуации имеет значение место инъекции. В какую бы часть яйца ни инъецировали мРНК, эта часть становится вентральной областью «излеченного» зародыша (Anderson et al., 1985). Это позволяет предположить, что в яйцах *Toll*$^-$/*Toll*$^-$ отсутствует дорсовентральная полярность (тогда как в случае мутации *snake* при инъекции мРНК дикого типа вентральная область занимает свое нормальное место). Поэтому представляется вероятным, что продукт дикого типа *Toll* участвует в установлении этой полярности и действует раньше продукта гена *snake* (рис. 7.30).

При клонировании аллеля дикого типа *snake* (DeLotto, Spierer, 1986) было обнаружено, что он кодирует аминокислотную последовательность, сходную с последовательностью протеаз трипсина и фактора свертывания крови. Такие ферменты часто принимают участие в активации неактивных предшественников посредством отщепления аминокислотной последовательности, подавляющей их активность. Этот факт поддерживает предположение Андерсона и Нюсслейн-Вольгард о том, что продукт гена *Toll* является неактивным белком, который активируется продуктами нормальных аллелей гена *snake* и других локусов.

По крайней мере один продукт гена, необходимый для установления и поддержания дорсовен-

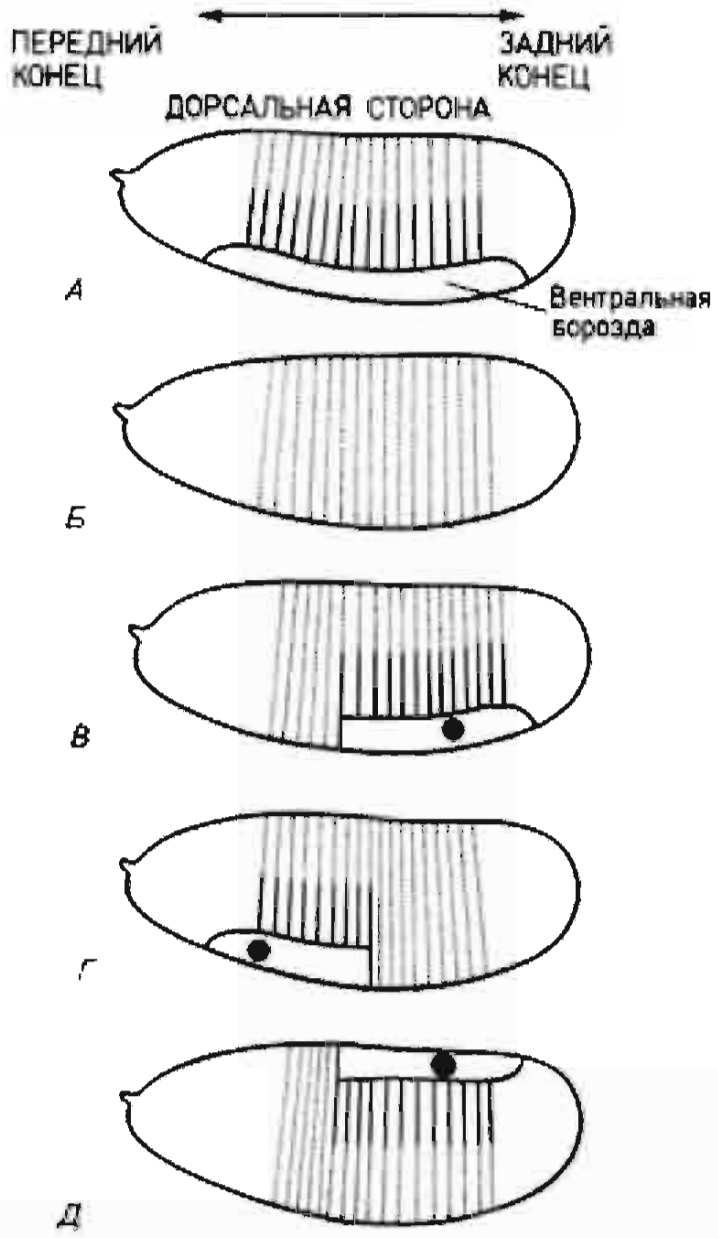


Рис. 7.30. Связь между местом инъекции мРНК и положением дорсовентральной оси у зародышей *Toll*$^-$, получивших мРНК из яиц дикого типа. *А*. Личинка с нормальным положением дорсовентральной оси; у личинки имеются вентральная борозда и связанные с ней структуры. *Б*. Клетки зародыша *Toll*$^-$ дифференцируются с образованием только дорсального эпидермиса. *В–Д*. Локализация инъецированной цитоплазмы дикого типа (обозначена черным пятном) определяет положение дорсовентральной оси. (Обратите внимание, однако, что эти структуры никогда не распространяются по всей переднезадней оси.) (По Anderson et al., 1985.)

тральной полярности, должен быть белком. Инъекция цитоплазмы яйца дикого типа корректирует (исправляет) в яйцах дефект, обусловленный материнскими генами, но изолированная из нее мРНК не восстанавливает дорсовентральную полярность.

Что же контролируют эти продукты генов с материнским эффектом? Полагают, что они участвуют в образовании репрессора, который подавляет активацию единичного гена в геноме дрозофилы. Этот ген *zerknullt* (*zen*) обычно экспрессируется только в дорсальных структурах, составляющих 40% зародыша, и не бывает активным в вентральных областях. У тех 10 мутантов с материнским эффектом, которые характеризуются дорсализацией зародыша, ген *zen* экспрессируется и в дорсальных, и в вентральных областях зародыша. У одного мутанта с материнским эффектом (*cactus*), характеризующегося вентрализацией зародыша, ген *zen* репрессируется во всем зародыше (рис. 7.31; Rushlow et al., 1987). Возможно, что нормальные аллели десяти мутантов с материнским эффектом вентрализации включены в процесс образования ингибитора гена *zen*, тогда как нормальный аллель гена *cactus* продуцирует репрессор этого ингибитора, способствуя активации гена *zen* в этой части зародыша.

ПЕРЕДНЕЗАДНЯЯ ПОЛЯРНОСТЬ. Другая группа мутаций с материнским эффектом ответственна за спецификацию переднезадней полярности у личинок насекомых. Один такой аллель носит название *bicoid* (*bcd*). У зародышей, происходящих от самок, гомозиготных по гену *bicoid*, отсутствуют голова и грудные сегменты. Цитоплазма яиц дикого типа (примерно 3% всего объема яйца) может излечить этих дефектных зародышей, *но только при том условии, что цитоплазма взята из передней четверти яйца*. Более того, место, в которое инъецировали эту цитоплазму, станет затем передним участком тела. Фенотип мутанта *bicoid* можно получить (**феноко**пировать), проколов передний конец раннего зародыша дикого типа и позволив вытечь около 5% цитоплазмы (Frohnhöfer, Nüsslein-Volhard, 1986).

Аналогом мутации *bicoid* в заднем конце, по-видимому, является мутация *oskar*. У зародышей, развившихся из яиц, отложенных гомозиготными самками *oskar*, не образуются структуры брюшка или полярные клетки. Результаты опытов по трансплантации (Lehmann, Nüsslein-Volhard, 1986), сходных с теми, которые проведены на мутантах *bicoid*, показали, что детерминант для *oskar* находится только в заднем конце яйца дрозофилы дикого типа. Если цитоплазму, взятую из заднего конца зародыша, инъецировать в переднюю область зародыша дикого типа, то формируется вторая задняя область.

Мутации с материнским эффектом *caudal* (*cad*) и *bicaudal* (*bic*), по-видимому, отвечают на сигналы переднезадней полярности, даваемые мутациями *oskar* и *bicoid*. У зародышей, имеющих фенотип *caudal*, отсутствуют задние абдоминальные структуры, тогда как зародыши *bicaudal* имеют фенотип «двойного брюшка», выражающийся в том, что два задних зеркально отраженных отдела соединяются по средней линии (рис. 7.32). Таким образом, у зародышей *bicaudal* бóльшая часть передних сегментов утрачена и замещена дубликатами задних сегментов. У дикого типа *caudal* мРНК в зародыше на стадии синцитиальной бластодермы распределена по заднепереднему градиенту концентрации. Она транслируется в ядерный белок со сходным градиентом концентрации (рис. 7.33, *А*). По мере цел-

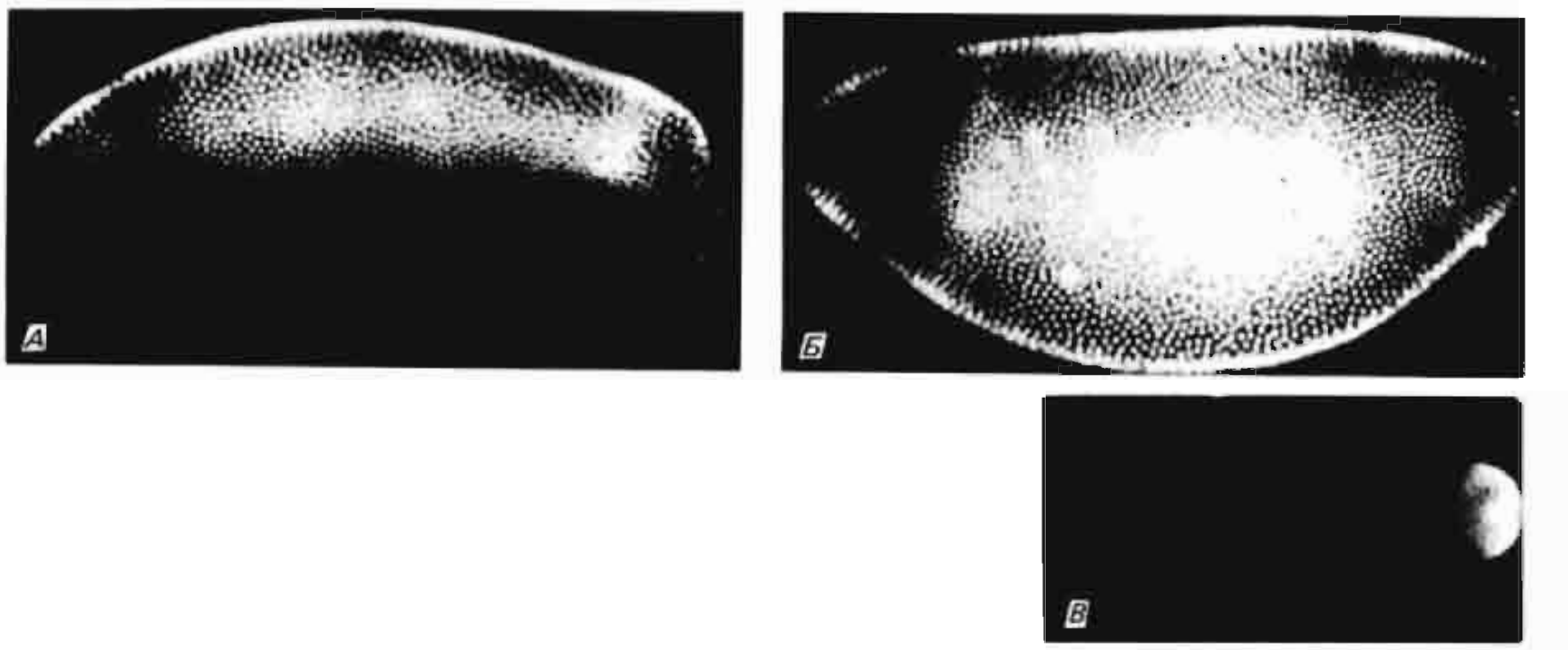


Рис. 7.31. Экспрессия гена *zen*. *А*. Экспрессия нормального аллеля *zen*, обнаруживаемая методом гибридизации in situ с одноцепочечной радиоактивной *zen*-ДНК на препарате среза через зародыш дикого типа и последующим выявлением радиоактивной метки с использованием фотографической эмульсии. Темные пятна представляют области, в которых радиоактивность ДНК, связанной с мРНК, восстанавливает зерна серебра в фотографической эмульсии. *Zen* мРНК обнаруживается в дорсальной области зародыша дикого типа. *Б*. Экспрессия гена *zen* во всем зародыше у дорсализованного мутанта. *В*. Отсутствие экспрессии гена *zen* у вентрализованного мутанта *cactus*. (Из Rushlow et al., 1987; фотографии с любезного разрешения M. Levine.)

люляризации бластодермы градиент поляризуется, т.е. белок обнаруживается в виде единичного кольца шириной в 3–4 клетки и в полярных клетках (рис. 7.33, *Б*). Следовательно, характер распределения белка в зародыше меняется от градиентного до локализованного в определенной области. Однако эффект мутации *bicaudal* предшествует действию гена *caudal*. При окрашивании на присутствие белка *caudal* в зародышах *bicaudal* обнаруживаются два феномена. Во-первых, отсутствует градиентное распределение этого белка в синцитиальной бластодерме (рис. 7.33, *В*), и, во-вторых, локализация белка *caudal* происходит в двух областях – вблизи переднего полюса и вблизи заднего полюса (рис. 7.33, *Г*). По-видимому, вещество *bicaudal* ответственно за считывание информации о переднезадней полярности и необходимо для правильного размещения продуктов гена *caudal*. Продукты этого

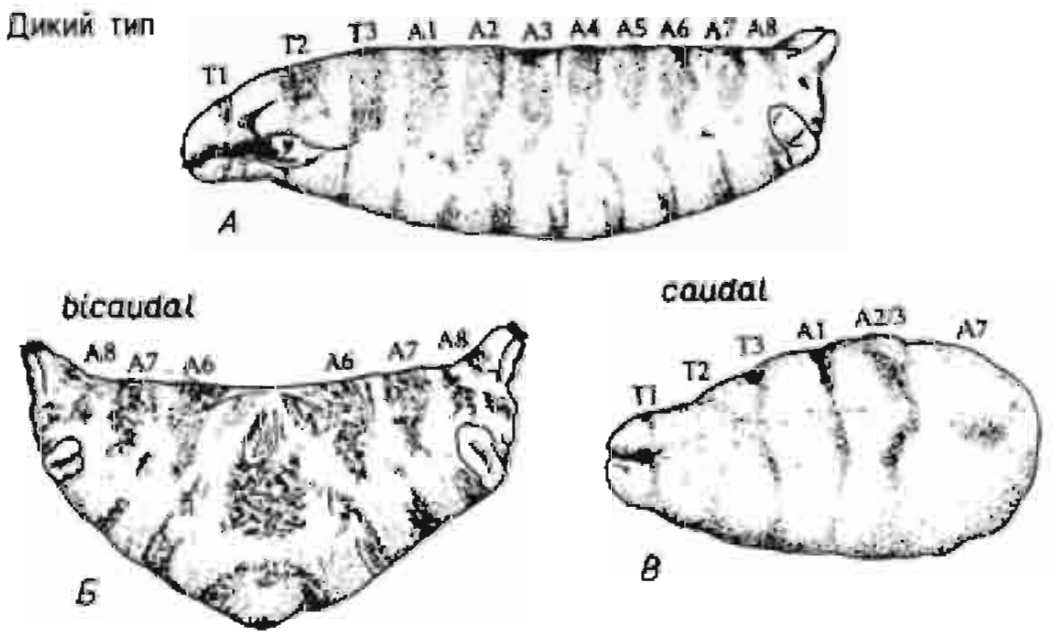


Рис. 7.32. Мутанты с нарушением переднезадней полярности. *А*. Кутикула личинки дикого типа; видны голова, три грудных сегмента (T1 – T3) и 8 брюшных сегментов (A1 – A8). *Б*. Симметричное двойное брюшко, характерное для зародыша, происходящего от самки, гомозиготной по мутации *bicaudal*. *В*. Редуцированное брюшко, характерное для зародышей, продуцируемых самками, гомозиготными по мутации *caudal*. (По Gergen et al., 1986; Macdonald, Struhl, 1986.)

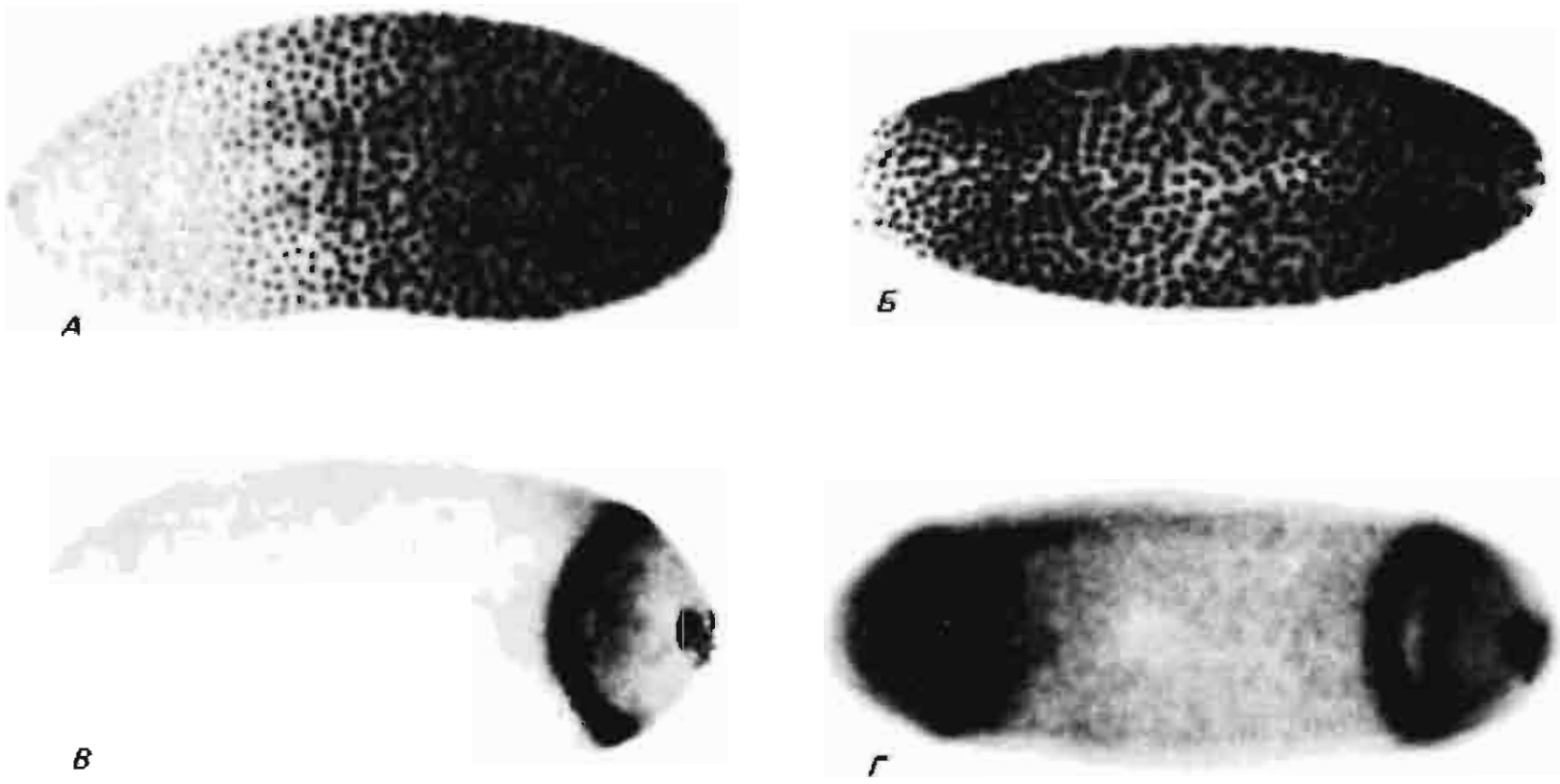


Рис. 7.33. Экспрессия нормального аллеля белка *caudal* в зародышах дрозофилы дикого типа и *bicaudal*. Зародышей фиксировали и окрашивали с помощью иммунологической методики, используя антитела к белку *caudal*. *А*. Виден градиент белка *caudal* в ядрах синцитиальной бластодермы зародыша дикого типа. *Б*. Градиент белка *caudal* дикого типа, экспрессированного в ядрах синцитиальной бластодермы зародыша *bicaudal*, отсутствует. *В*. Стадия клеточной бластодермы зародыша дикого типа. Видно заднее кольцо белка *caudal*. *Г*. В клеточной бластодерме мутанта *bicaudal* видны два кольца белка *caudal* (по одному на каждом конце зародыша). Каждый конец становится задней областью. (Из Macdonald, Struhl, 1986.)

гена, по всей вероятности, необходимы для активации генов, специфичных для задних сегментов (Macdonald, Struhl, 1986; Mlodzik, Gehring, 1987).

Сходные мутации были обнаружены у других видов мух (таких, как *Smittia*), а фенокопии этих мутантов могут быть получены облучением передней области яйца лазерным микролучом или микроинъекцией рибонуклеазы в переднюю область яйца (рис. 7.34; Kandler-Singer, Kalthoff, 1976). Такие облученные яйца можно «излечивать» микроинъекцией мРНК из зародышей дикого типа (Kalthoff, Elbetiehn, 1986).

Спецификация дорсовентральной и переднезадней полярности осуществляется двумя действующими независимо одна от другой группами детерминантов. Эти морфогенетические детерминанты представляют собой мРНК и белки, запасенные в ооците, а установление и поддержание каждой из осей зародыша осуществляются в результате взаимодействия этих факторов в цитоплазме яйца. Эти факторы распределяются по специфическим клеткам и влияют на транскрипцию генов в их ядрах. Процессы, благодаря которым разные сегменты приобретают свою специфику (например, то, что на грудных сегментах образуются ноги, а на брюшных — нет) в соответствии с локализацией их клеток по этим осям, будут подробно рассмотрены в гл. 18. Изучение генетики формирования признаков у дрозофилы может стать «Золотым копьем» генетики развития. В течение десятилетий существовали два больших пробела, препятствующие попыткам объединить генетику и развитие. Первый — отсутствие

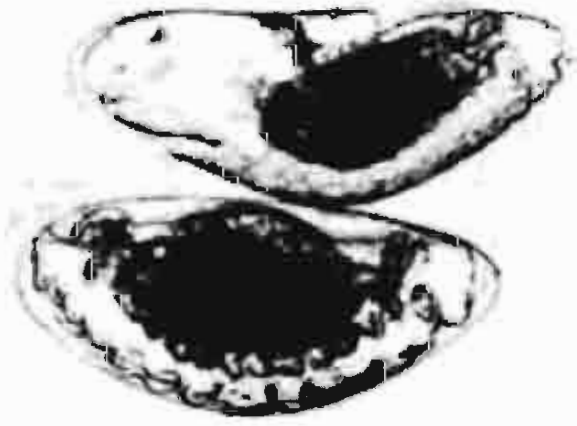


Рис. 7.34. Нормальный и облученный зародыши галлицы *Smittia*. У нормального зародыша (*вверху*) видны голова слева и брюшные сегменты справа. У облученного зародыша нет области головы, а на обоих концах имеются только брюшные сегменты. (Из Kalthoff, 1969; фотография с любезного разрешения K. Kalthoff.)

знаний о молекулах, которые участвуют в спецификации первичных эмбриональных осей. Каким образом задняя часть зародыша становится отличной от его передней части? Второй пробел в наших знаниях касается взаимодействия цитоплазматических детерминантов с ядрами клеток, содержащих эти детерминанты. Гены, ответственные за эти процессы, теперь известны, а некоторые из генных продуктов идентифицированы. В течение короткого времени мы сумеем объяснить, каким образом цитоплазматические детерминанты определяют судьбу клеток зародыша.

РЕЗЮМЕ

В настоящее время мы располагаем данными о том, что у некоторых организмов судьба любой клетки определяется той частью цитоплазмы, которую она приобретает в процессе дробления. Такая клетка дифференцируется независимо от других клеток, а организмы, использующие этот механизм, имеют тенденцию идти по пути мозаичного, или детерминированного, развития. Этот тип развития характерен для зародышей моллюсков, оболочников и нематод. Локализация морфогенов в цитоплазме яйца, их перераспределение в процессе развития яйца и оплодотворения, а также характер дробления имеют важное значение для детерминации судьбы каждой клетки. Любое из этих событий является функцией яйца. Развитие этих организмов в основном протекает по мозаичному типу, однако у них обнаруживаются и некоторые детерминирующие взаимодействия. У оболочников нервная система и некоторые из мышц формируются в результате индукционных взаимодействий между бластомерами; таким же способом образуются некоторые органы у улиток и нематод. В следующей главе мы рассмотрим развитие организмов, у которых индукционные взаимодействия составляют основной механизм детерминации судьбы клеток.

ЛИТЕРАТУРА

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1983). Molecular Biology of the Cell. Garland, New York.

Anderson K., Bokla L., Nüsslein-Volhard C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: The induction of polarity by the *Toll* gene product. Cell **42**, 791–798.

Anderson K. V., Nüsslein-Volhard C. (1984). Information for the dorsal–ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. Nature **311**, 223–227.

Atkinson J. W. (1987). An atlas of light micrographs of normal and lobeless larvae of the marine gastropod *Ilyanassa obsoleta*. Int. J. Invert. Reprod. Devel. **9**, 169–178.

Blackler A. W. (1962). Transfer of primordial germ cells between two subspecies of *Xenopus laevis*. J. Embryol. Exp. Morphol. **10**, 641–651.

Blackler A. W. (1966). The role of a "germinal plasm" in the formation of primordial germ cells in *Rana pipiens*. Dev. Biol. **14**, 330–347.

Bonnet C. (1764). Contemplation de la Nature. Marc-Michel Ray, Amsterdam.

Bounoure L. (1934). Recherches sur la lignée germinale chez la grenouille rousse aux premiers stades du développement. Ann. Sci. Natl. 10e ser. **17**, 67–248.

Bounoure L. (1939). L'origine des Cellules Reproductries et le Probleme de la Lignee Germinale. Gauthier-Villars, Paris.

Boveri T. (1910). Über die Teilung centrifugierter Eier von *Ascaris megalocephala*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **30**, 101–125.

Brandhorst B. P., Newrock K. M. (1981). Post-transcriptional regulation of protein synthesis in *Ilyanassa* embryos and isolated polar lobes. Dev. Biol. **83**, 250–254.

Brenner S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics **77**, 71–94.

Brenner S. (1979). Cited in H. F. Judson (1979), The Eight Day of Creation. Simon and Schuster, New York, p. 219.

Cassirer E. (1950). Developmental mechanics and the problem of cause in biology. In: E. Cassirer (ed.), The Problem of Knowledge. Yale University Press, New Haven.

Cervera M., Dreyfuss G., Penman S. (1981). Messenger RNA is translated when associated with the cytoskeletal framework in normal and VSV-infected HeLa cells. Cell **23**, 113–120.

Chabry L. M. (1887). Contribution a l'embryologie normale tératologique des ascidies simples. J. Anat. Phys. Norm. Pathol. **23**, 167–321.

Churchill F. B. (1973). Chabry, Roux, and the experimental method in nineteenth century embryology. In: R. N. Giere and R. S. Westfall (eds.), Foundations of Scientific Method: The Nineteenth Century. Indiana University Press, Bloomington, pp. 161–205.

Clement A. C. (1962). Development of *Ilyanassa* following removal of the D macromere at successive cleavage stages. J. Exp. Zool. **149**, 193–215.

Clement A. C. (1968). Development of the vegetal half of the *Ilyanassa* egg after removal of most of the yolk by centrifugal force, compared with the development of animal halves of similar visible composition. Dev. Biol. **17**, 165–186.

Clement A. C. (1986). The embryonic value of the micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. III. The third quartet cells and the mesentoblast cell, 4d. Int. J. Invert. Reprod. Dev. **9**, 155–168.

Collier J. R. (1983). The biochemistry of molluscan development. In: N. H. Verdonk, J. A. M. van den Biggelaar and A. S. Tompa (eds.), The Mollusca, Vol. 3. Academic, New York, pp. 215–252.

Collier J. R. (1984). Protein synthesis in normal and lobeless gastrulae of *Ilyanassa obsoleta*. Biol. Bull. **167**, 371–377.

Conklin E. G. (1905a). The organization and cell lineage of the ascidian egg. J. Acad. Nat. Sci. Phila. **13**, 1–119.

Conklin E. G. (1905b). Organ-forming substances in the eggs of ascidians. Biol. Bull. **8**, 205–230.

Conklin E. G. (1905c). Mosaic development in ascidian eggs. J. Exp. Zool. **2**, 145–223.

Craig M. M., Morrill J. B. (1986). Cellular arrangements and surface topology during early development in embryos of *Ilyanassa obsoleta*. Int. J. Invert. Reprod. Dev. **9**, 209–228.

Crowther R. J., Whittaker J. R. (1984). Differentiation of histotypic ultrastructural features in cells of cleavage-arrested early ascidian embryos. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **194**, 87–98.

Dareste C. (1877). Recherches sur la Production Artificielle des Monstruosités ou Essais de Teratogenie Experimentale. Reinwald, Paris.

DeLotto R., Spierer P. (1986). A gene required for the specification of dorsal–ventral pattern in *Drosophila* appears to encode a serine protease. Nature **323**, 688–692.

Deno T., Nishida H., Satoh N. (1984). Autonomous muscle cell differentiation in partial ascidian embryos according to the newly verified cell lineages. Dev. Biol. **104**, 322–328.

Eddy E.M. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ line. Int. Rev. Cytol. **43**, 229–280.

Edgar L.G., McGhee J.D. (1986). Embryonic expression of a gut-specific esterase in *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. **114**, 109–118.

Engstrom L., Caulton J.H., Underwood E.M., Mahowald A.P. (1982). Developmental lesions in the agametic mutant of *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol. **91**, 163–170.

Fischer J.-L., Smith J. (1984). French embryology and the "mechanics of development" from 1887 to 1910: L. Chabry, Y. Delage and E. Bataillon. Hist. Phil. Life Sci. **6**, 25–39.

Frohnhofer H.G., Nüsslein-Volhard C. (1986). Organization of anterior pattern in the *Drosophila* embryo by the maternal gene *bicoid*. Nature **324**, 120–125.

Geigy R. (1931). Action de l'ultra-violet sur le pôle germinal dans l'oeuf de *Drosophila melanogaster* (castration et mutabilite). Rev. Suisse Zool. **38**, 187–288.

Gergen J.P., Coulter D., Wieschaus E. (1986). Segmental pattern and blastoderm cell identities. In: J.G. Gall (ed.), Gametogenesis and the Early Embryo. Alan R. Liss, New York, pp. 195–220.

Geyer-Duszynska I. (1959). Experimental research on chromosome diminution in Cecidomiidae (Diptera). J. Exp. Zool. **141**, 381–441.

Gould S.J. (1977). Ontogeny and Phylogeny. Belknap Press, Cambridge, MA.

Guerrier P., van den Biggelaar J.A.M., van Dongen C.A.M., Verdonk N.H. (1978). Significance of the polar lobe for the determination of dorsoventral polarity in *Dentalium vulgare* (da Costa). Dev. Biol. **63**, 233–242.

Haller A. von (1758). Sur la Formation du Coeur dans le Poulet, Mem. II. M.M. Bousquet and Co., Lausanne.

Hegner R.W. (1911). Experiments with chrysomelid beetles. III. The effects of killing parts of the eggs of *Leptinotarsa decemlineata*. Biol. Bull. **20**, 237–251.

Henry J.J., Martindale M.Q. (1987). The organizing role of the D quadrant as revealed through the phenomenon of twinning in the polychaete *Chaetopterus variopedatus*. Roux's Arch. Dev. Biol. **196**, 449–510.

Hill D.P., Strome S. (1987). An analysis of the role of microfilaments in the establishment and maintenance of asymmetry in *Caenorhabditis elegans* zygotes. Dev. Biol. **125**, 75–84.

Ikenishi K., Kotani M. (1979). Ultraviolet effects on presumptive primordial germ cells (pPGCs) in *Xenopus laevis* after the cleavage stage. Dev. Biol. **69**, 237–246.

Illmensee K. (1968). Transplantation of embryonic nuclei into unfertilized eggs of *Drosophila melanogaster*. Nature **219**, 1268–1269.

Illmensee K. (1972). Developmental potencies of nuclei from cleavage, preblastoderm, and syncytial blastoderm transplanted into unfertilized eggs of *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **170**, 267–298.

Illmensee K., Mahowald A.P. (1974). Transplantation of posterior polar plasm in Drosophila. Iduction of germ cells at the anterior pole of the egg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 1016–1020.

Illmensee K., Mahowald A.P., Loomis M.R. (1976). The ontogeny of germ plasm during oogenesis in *Drosophila*. Dev. Biol. **49**, 40–65.

Jeffery W.R. (1984). Spatial distribution of messenger RNA in the cytoskeletal framework of ascidian eggs. Dev. Biol. **103**, 482–492.

Jeffery W.R. (1985). Identification of proteins and mRNAs in isolated yellow crescents of ascidian eggs. J. Embryol. Exp. Morphol. **89**, 275–287.

Jeffery W.R., Bates W.R., Beach R.L., Tomlinson C.R. (1986). Is maternal mRNA a determinant of tissue-specific proteins in ascidian embryos? J. Embryol. Exp. Morphol. **97** [Suppl.], 1–14.

Jeffery W.R., Meier S. (1983). A yellow crescent cytoskeletal domain in ascidian eggs and its role in early development. Dev. Biol. **96**, 125–143.

Just E.E. (1936). Quoted in Harrison R.G. (1937). Embryology and its relations. Science **85**, 369–374.

Kalthoff K. (1969). Der Einfluss verscheiedener Versuchsparameter auf die Häufigkeit der Missbildung "Dop pelabdomen" in UV-bestrahlten Eiern von *Smittia* sp. (Diptera, Chironomidae). Zool. Anz. Suppl. **33**, 59–65.

Kalthoff K., Elbetieha A. (1986). Transplantation of localized anterior determinants in *Chironomus* eggs by microinjection. J. Embryol. Exp. Morphol. **97** [Suppl.], 181–196.

Kandler-Singer I., Kalthoff K. (1976). RNase sensitivity of an anterior morphogenetics determinant in an insect egg (*Smittia* sp.; Chironomidae, Diptera). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 3739–3743.

Kimble J. (1981). Lineage alterations after ablation of cells on the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. **87**, 286–300.

Kimble J., Hirsch D. (1979). The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. **70**, 396–417.

Kölreuter J.G. (1761–1766). Vorläufige Narchricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen beteffenden Versuchen und Beobachtungen, nebst Fortsetzugen 1, 2 und 3. Leipzig.

Kunz W., Trepte H.H., Bier K. (1970). On the function of the germ line chromosomes in the oogenesis of *Wachtiella persiariae* (Cecidomyiidae). Chromosoma **30**, 180–192.

Laufer J.S., Bazzicalupo P., Wood W.B. (1980). Segregation of developmental potential in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. Cell **19**, 569–577.

Lehmann R., Nüsslein-Volhard C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of *oskar*, a maternal gene in *Drosophila*. Cell **47**, 141–152.

Lenoir T. (1980). Kant, Blumenbach, and vital materialism in German biology. Isis **71**, 77–108.

Macdonald P.M., Struhl G. (1986). A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying body pattern. Nature **324**, 537–545.

Mahowald A.P. (1971a). Polar granules of *Drosophila*. III. The continuity of polar granules during the life cycle of *Drosophila*. J. Exp. Zool. **176**, 329–343.

Mahowald A.P. (1971b). Polar granules of *Drosophila*. IV. Cytochemical studies showing loss of RNA from polar granules during early stages of embryogenesis. J. Exp. Zool. **176**, 329–343.

Mahowald A.P., Caulton J.H., Gehring W.J. (1979). Ultrastructural studies of oocytes and embryos derived from female flies carrying the *grandchildless* mutation of *Drosophila subobscura*. Dev. Biol. **69**, 118–132.

Meedel T.H., Crowther R.J., Whittaker J.R. (1987). Determinative properties of muscle lineages in ascidian embryos. Development **100**, 245–260.

Meedel T.H., Whittaker J.R. (1983). Development of transcriptionally active mRNA for larval muscle acetylcholinesterase during ascidian embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 4761–4765.

Meedel T.H., Whittaker J.R. (1984). Lineage segregation and developmental autonomy in expression of functional muscle acetylcholinesterase in the ascidian embryo. Dev. Biol. **105**, 479–487.

Melton D. (1987). Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of *Xenopus* oocytes. Nature **328**, 80–82.

Mlodzik M., Gehring W.J. (1987). Expression of the *caudal* gene in the germ line of *Drosophila*: Formation of an RNA and

protein gradient during early embryogenesis. Cell **48**, 465–478.

Moon R. T., Nicosia R. F., Olsen C., Hille M., Jeffery W. R. (1983). The cytoskeletal framework of sea urchin eggs and embryos: Developmental changes in the association of messenger RNA. Dev. Biol. **95**, 447–458.

Morgan T. H. (1927). Experimental Embryology. Columbia University Press, New York.

Newrock K. M., Raff R. A. (1975). Polar lobe specific regulation of translation in embryos of *Illyanassa obsoleta*. Dev. Biol. **42**, 242–261.

Nishida H. (1987). Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. Dev. Biol. **121**, 526–541.

Nishikata T., Mita-Miyazawa I., Deno T., Satoh N. (1987). Monoclonal antibodies against components of the myoplasm of the ascidian *Ciona intestinalis* partially block the development of muscle-specific acetylcholinesterase. Development **100**, 577–586.

Okada M., Kleinman I. A., Schneiderman H. A. (1974). Restoration of fertility in sterilized *Drosophila* eggs by transplantation of polar cytoplasm. Dev. Biol. **37**, 43–54.

Okada M., Kobayashi S. (1987). Maternal messenger RNA as a determinant of pole cell formation in *Drosophila* embryos. Dev. Growth Diff. **29**, 185–192.

Ortolani G. (1959). Richerche sulla induzione del sistema nervoso nelle larve delle Ascidie. Boll. Zool. **26**, 341–348.

Reverberi G., Minganti A. (1946). Fenomeni di evocazione nello sviluppo dell'uovo di Ascidie. Risultati dell'indagine sperimentale sull'ouvo di *Ascidiella aspersa* e di *Ascida malaca* allo stadio di 8 blastomeri. Pubbl. Staz. Zool. Napoli **20**, 199–252. (Quoted in Reverberi, 1971, p. 537).

Roe S. (1981). Matter, Life, and Generation: Eighteenth-Century Embryology and the Halle–wolff Debate. Cambridge University Press, Cambridge.

Rushlow C., Frasch M., Doyle H., Levine M. (1987). Maternal regulation of zerknüllt: A homeobox gene controlling differentiation of dorsal tissues in *Drosophila*. Nature **330**, 583–586.

Satoh N. (1979). On the "clock" mechanism determining the time of tissue-specific development during ascidian embryogenesis. I. Acetylcholinesterase development in cleavage-arrested embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. **54**, 131–139.

Schubiger G., Wood W. J. (1977). Determination during early embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. Am. Zool. **17**, 565–576.

Smith L. D. (1966). The role of a "germinal plasm" in the formation of primordial germ cells in *Rana pipiens*. Dev. Biol. **14**, 330–347.

Strome S., Wood W. B. (1983). Generation of asymmetry and segregation of germ-like granules in early *Caenorhabditis elegans* embryos. Cell **35**, 15–25.

Sulston J., Horvitz H. R. (1977). Postembryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. **56**, 110–156.

Sulston J. E., Schierenberg J., White J., Thomson N. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. **100**, 64–119.

Tobler H., Smith K. D., Ursprung H. (1972). Molecular aspects of chromatin elimination in *Ascaris lumbricoides*. Dev. Biol. **27**, 190–203.

Tung T. C., Wu S. C., Yel Y. F., Li K. S., Hsu M. C. (1977). Cell differentiation in ascidians studied by nuclear transplantation. Scientia Sinica **20**, 222–233.

Verdonk N. H., Cather J. N. (1983). Morphogenic determination and differentiation. In: N. H. Verdonk, J. A. M. van der Biggelaar and A. S. Tompa (eds.), The Mollusca. Academic, New York, pp. 215–252.

Waddington C. H. (1966). Principles of Development and Differentiation. Macmillan, New York.

Waring G. L., Allis C. D., Mahowald A. P. (1978). Isolation of polar granules and the identification of polar granule–specific protein. Dev. Biol. **66**, 197–206.

Weeks D. L., Rebagliati M. R., Harvey R. P., Melton D. A. (1985). Localized maternal mRNAs in *Xenopus laevis* eggs. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **50**, 21–30.

Whittaker J. R. (1973a). Segregation during ascidian embryogenesis of egg cytoplasmic information for tissue–specific enzyme development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2096–2100.

Whittaker J. R. (1973b). Evidence for the localization of an RNA template for endodermal alkaline phosphatase in an ascidian egg. Biol. Bull. **145**, 459–460.

Whittaker J. R. (1977). Segregation during cleavage of a factor determining endodermal alkaline phosphatase development in ascidian embryos. J. Exp. Zool. **202**, 139–153.

Whittaker J. R. (1979). Cytoplasmic determinants of tissue differentiation in the ascidian egg. In: S. Subtelny and I. R. Konigsberg (eds.), Determinants of Spatial Organization. Academic, New York, pp. 29–51.

Whittaker J. R. (1982). Muscle cell lineage can change the developmental expression in epidermal lineage cells of ascidian embryos. Dev. Biol. **93**, 463–470.

Whittaker J. R. (1987). Cell lineages and determinants of cell fate in development. Am. Zool. **27**, 607–622.

Whittaker J. R., Ortolani G., Farinella-Ferruzza N. (1977). Autonomy of acetylcholinesterase differentiation in muscle lineage cells in ascidian embryos. Dev. Biol. **55**, 196–200.

Wilson E. B. (1904). Experimental studies on germinal localization. I. The germ regions in the egg of *Dentalium*. II. Experiments on the cleavage-mosaic in *Patella* and *Dentalium*. J. Exp. Zool. **1**, 1–72.

Wolff K. F. (1767). De formatione intestinorum praecipue. Novi Commentarii Academiae Scientarum Imperialis Petropolitanae.

Zalokar M. (1971). Transplantation of nuclei in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**, 1539–1541.

Zumbe A., Stahli C., Trachsel H. (1982). Association of a M_r 50,000 cap-binding protein with the cytoskeleton in baby hamster kidney cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 2927–2931.

Züst B., Dixon K. E. (1977). Events in the germ cell lineage after entry of the primordial germ cells into the genital ridges in normal and UV-irradiated *Xenopus laevis*. J. Embryol. Exp. Morphol. **41**, 33–46.

Глава 8
Прогрессивная детерминация

Том теперь – великий муж науки... и знает обо всем, кроме того, почему из куриного яйца не вылупляется крокодил.

ЧАРЛЗ КИНГСЛИ (1863)

Мы стоим на ногах и ходим с помощью ног, но если бы эти части нашего тела развивались в другой области зародыша, то они не без успеха могли бы быть использованы нами для того, чтобы мыслить.

ГАНС ШПЕМАН (1943)

Введение

Из предыдущей главы мы узнали, что детерминацию обусловливает распределение специфических цитоплазматических веществ между бластомерами в период дробления. Мы узнали также, что действием цитоплазматических детерминантов невозможно объяснить все детерминационные события в эмбриогенезе. В некоторых случаях для формирования определенного типа ткани необходимо взаимодействие между двумя бластомерами. Из этой главы мы узнаем о том, что способ детерминации посредством взаимодействий между частями зародыша имеет чрезвычайно важное значение, особенно для развития вторичноротых, таких, как морские ежи и позвоночные. Открытие этого типа детерминации уходит своими корнями в недостатки мозаичных теорий развития, сформулированных в Германии в конце прошлого столетия.

Август Вейсман: теория зародышевой плазмы

В 1883 г. Август Вейсман начал разрабатывать теорию, которая должна была интегрировать такие различные биологические явления, как наследственность, развитие, регенерация, половое размножение и эволюция путем естественного отбора. Вейсман был блестящим химиком и врачом, обратившим свое внимание на проблемы развития и метаморфоза. В 1863 г., когда тяжелая болезнь глаз лишила его возможности пользоваться микроскопом, он стал задумываться над тем, каким образом из половых клеток возникают дифференцированные потомки. В поисках ответа на этот вопрос Вейсман освободился от прямых объяснений дарвиновского типа (т.е. от использования эмбриологии как аргумента для обоснования эволюционной родословной) и поставил эмбриологию на путь физиологических исследований, отдававших предпочтение экспериментальному вмешательству в развитие перед описательными наблюдениями.

Цитологические исследования семидесятых годов прошлого века дали Вейсману новую важную информацию, касающуюся полового размножения. Герман Фоль и Ричард Гертвиг независимо друг от друга наблюдали соединение яйца и спермия и их пронуклеусов. Такие исследователи, как ван Бенеден и Штрасбургер, показали, что каждое соматическое ядро содержит определенное число хромосом, зависящее от вида животного, а также что это число уменьшается вдвое в процессе созревания половых клеток и снова восстанавливается во время оплодотворения. Используя эти ограниченные данные, Вейсман предложил механическую модель клеточной дифференцировки – **теорию зародышевой плазмы.**

Суть этой теории сводилась к следующему. Во-первых, хромосомы яйца и спермия количественно и качественно на равных основаниях участвуют в образовании нового организма. Во-вторых, хро-

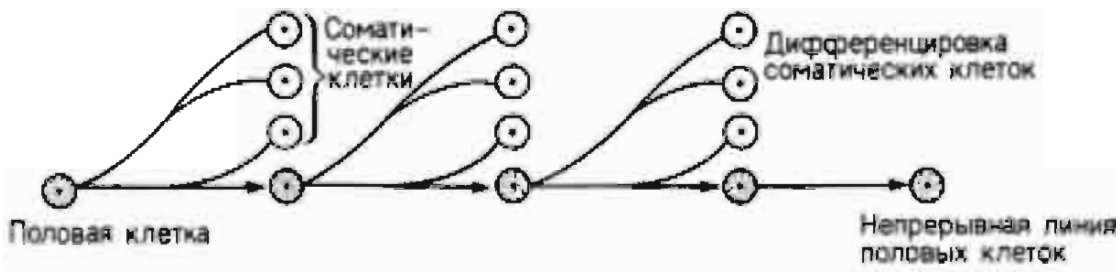


Рис. 8.1. Схема, иллюстрирующая вейсмановскую теорию наследственности. Половая клетка дает начало дифференцирующимся соматическим клеткам тела (белые кружки) и половым клеткам (кружки с точками). (По Wilson, 1896.)

мосомы несут наследственные потенции этого нового организма и являются основой преемственности между поколениями. (Эмбриологи думали об этом еще за 15 лет до того, как вновь были открыты работы Менделя. Вейсман [Weismann, 1892, 1893] также выдвинул гипотезу, что эти ядерные детерминанты наследственности функционируют путем выработки веществ, которые становятся активными в цитоплазме!) Однако не все детерминанты хромосом попадают в каждую клетку зародыша, поскольку хромосомы делятся не поровну, а так, что в разные клетки попадают различные ядерные детерминанты. Вейсман, в прошлом военный врач, уподоблял эти детерминанты армейским бригадам. Если оплодотворенное яйцо должно нести полный набор детерминантов, то определенные клетки будут сохранять «образующие кровь» бригады, а другие клетки – «образующие мышцы» детерминанты. Только в ядрах тех клеток, которые предназначены стать гаметами (половыми клетками), будут оставаться все типы детерминантов. Ядра всех других клеток содержат только часть первоначальных типов детерминантов.

Таким образом, гипотеза Вейсмана предполагала непрерывность половой (зародышевой) плазмы и разнообразие соматических линий. Дифференцировка была обусловлена «сегрегацией ядерных детерминантов» в разных типах клеток и завершалась «архитектурой зародышевой плазмы», т.е. ядром половой клетки. Хромосомы, кажущиеся одинаковыми во всех клетках, должны были быть неравными по своим качествам. Линия половых клеток была полностью *независимой* от соматических клеток. Следовательно, признаки, приобретенные соматическими клетками, не могли наследоваться. Вейсман пытался экспериментально подтвердить эту модель, отрезая хвосты у новорожденных мышей на протяжении 19 поколений и в каждом новом поколении вновь получая мышей с хвостами. Эти данные были использованы им как аргумент в пользу того, что линия половых клеток изолирована от «нападения» (воздействия на нее) соматической ткани [1].

[1] К этому времени основной альтернативой была гипотеза пангенеза. Согласно этой гипотезе, которую сам Дарвин считал временной, каждая соматическая клетка содержит частички (пангены), которые мигрируют обратно в половые клетки, снабжая их признаками этой клетки, чтобы передать их потомству. По этой теории Вейсман должен был получить мышей с короткими хвостами. Наиболее убедительным доказательством теории пангенеза было сообщение физиолога Броун-Секара и Уэстфала о том, что экспериментально вызванная эпилепсия у морских свинок может передаваться следующему поколению. Другие анекдотические «доказательства» наследования приобретенных признаков изобиловали ошибками (Thomson, 1907). Опыты Вейсмана с калечением мышей были подтверждены Босом (15 поколений), Копе (11 поколений) и Мантецци и Розенталем (13 поколений). Недавно Томас Джакс, комментируя эти результаты, процитировал слова, которые произносит Гамлет: «Есть, стало быть, на свете божество,/Устраивающее наши судьбы/По-своему.» (В. Шекспир. Трагедии.– Перев. с англ. Б. Пастернака.– М.: РИПОЛ, 1993). Во всяком случае, теория пангенеза была сильно подорвана. Вейсман писал, что дарвиновская гипотеза – это «один из тех непрямых путей, которыми вынуждена идти наука, чтобы достичь истины».

Вейсмановская теория зародышевой плазмы в графической форме изображена на рис. 8.1. Он показывает непрерывность и бессмертие линии половых клеток в противоположность временному существованию взрослого организма; показывает, как отметил физиолог Майкл Фостер, что «тело животного есть по сути лишь носитель яйца». Вильсон (Wilson, 1896), подчеркивавший, что его замечательный учебник «Клетка в развитии и наследственности» выросла из гипотезы Вейсмана, говорил об историческом значении вейсмановской схемы:

«Смерть индивидуума не означает прекращения непрерывности серии делений клеток, благодаря которой продолжается жизнь расы. Индивидуум умирает, это верно, но половые клетки продолжают жить, как бы неся в себе традиции расы, от которой они произошли, и передавая их своим потомкам».

Вильгельм Ру: мозаичное развитие

Вейсман интуитивно чувствовал, что хромосомы являются носителями наследственности. Однако более важным было то, что он предложил гипотезу, которую можно было проверить очень быстро. Он считал, что первое деление дробления, разделяющее зародыш на будущие правую и левую половины, разделяет также «правые» и «левые» детерминанты

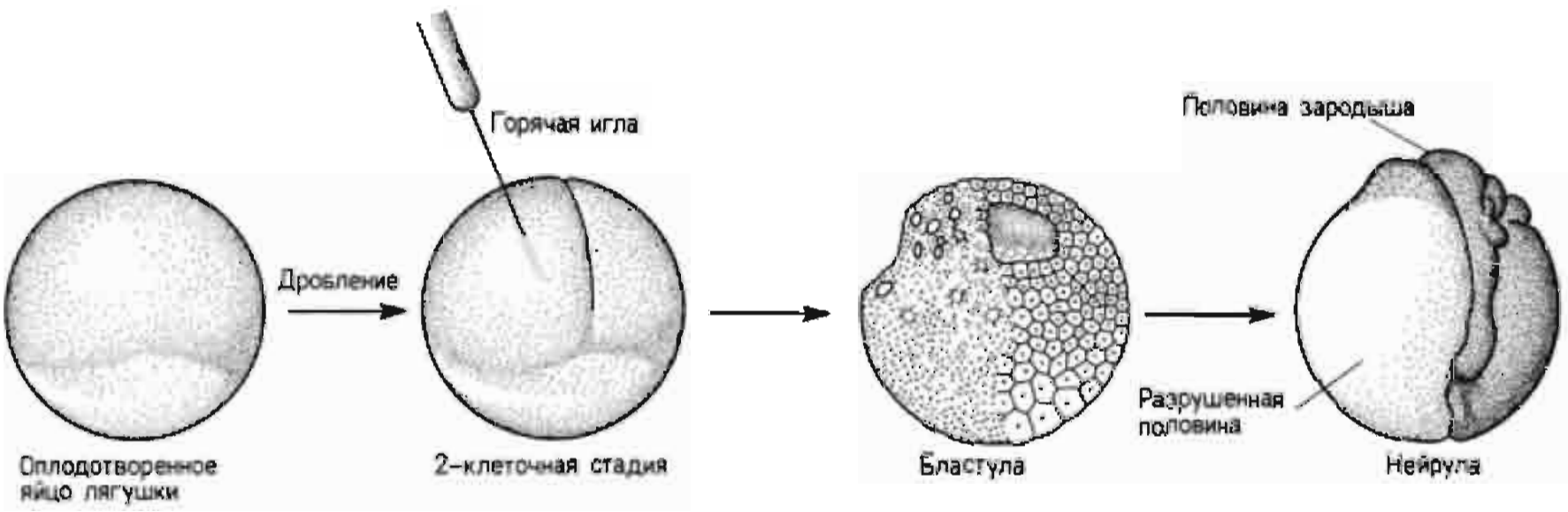


Рис. 8.2. Попытка Ру показать мозаичное развитие. Разрушение одной клетки у 2-клеточного зародыша приводит к развитию только одной половины зародыша.

между двумя бластомерами. Это утверждение было проверено Вильгельмом Ру (W. Roux), молодым немецким эмбриологом, в прошлом учеником Эриста Геккеля. Ру также был ревностным дарвинистом (в своей первой крупной работе по эмбриологии он высказал предположение о конкуренции между эмбриональными клетками), но, подобно Вейсману, чувствовал, что развитие должно изучаться с помощью аналитических методов. В 1888 г. Ру опубликовал результаты серии опытов, в которых он брал 2- и 4-клеточных зародышей лягушки и разрушал некоторые из клеток каждого зародыша горячей иглой. Из гипотезы Вейсмана следовало, что в этом случае образуется либо правая, либо левая половина зародыша. Ру и в самом деле получал половинные морулы, как то и предсказывал Вейсман (рис. 8.2). Развившиеся из них полунейрулы имели полный набор правой или левой стороны с одним нервным валиком, одной слуховой ямкой (плакодой) и т. д. На основе этих данных Ру пришел к выводу, что зародыш лягушки представляет собой мозаику самодифференцирующихся частей и очень вероятно, что каждая клетка получает свой набор детерминантов и соответственно этому дифференцируется. Этой серией опытов Ру начал свою программу по изучению механики развития (Entwicklungsmechanik), обосновывавшую физиологический подход к эмбриологии. Эмбриология, считал Ру, больше не должна быть просто служанкой эволюционных учений. Она должна выполнять свою роль независимой экспериментальной науки.

Ганс Дриш: регуляционное развитие

Никто не приветствовал этот экспериментальный подход к эмбриологии больше, чем другой ученик Геккеля – Ганс Дриш (H. Driesch). Дриш поставил перед собой цель объяснить развитие с позиций законов физики и математики. Первые его исследования были сходны с исследованиями Ру. Методически опыты Ру были опытами с нанесением *дефектов*; они отвечали на вопрос, как будут развиваться оставшиеся бластомеры, когда часть их разрушена. Дриш (1892) задумал расширить эти исследования, проделав опыты с *изолацией* бластомеров. Он отделял друг от друга бластомеры морского ежа энергичным встряхиванием (или позже помещением их в бескальциевую морскую воду). К удивлению Дриша, каждый из бластомеров двуклеточного зародыша развивался в полную личинку. Точно также, если Дриш разделял бластомеры 4- и 8-клеточных зародышей, то некоторые из клеток образовывали целые личинки, называемые плутеусами (рис. 8.3). Этот результат поразительно отличался от того, что предсказывали Вейсман или Ру. Вместо самодифференцировки в будущую часть зародыша каждый бластомер мог регулировать свое развитие и давать начало целому организму. Это явление было названо **регуляционным развитием.**

Регуляционное развитие было продемонстрировано Дришем и в других опытах. У морских ежей плоскости двух первых делений дробления являются меридиональными, тогда как третье деление проходит по экватору яйца, разделяя зародыш на четыре верхние и четыре нижние клетки (см. рис. 3.3). Дриш (1893) изменял направление третьего деления, слегка сжимая ранний зародыш между двумя стеклянными пластинками; в результате третье деление также проходило в меридиональной плоскости, как и первые два. Если затем давление ослабляли, то четвертое деление дробления было экваториальным. Эта процедура вызывала перегруппировку ядер, так что ядро, которое в норме должно было оказаться в области, предназначенной формировать энтодерму, теперь попадало в область презумптивной эктодермы. Ядра, которые должны были обра-

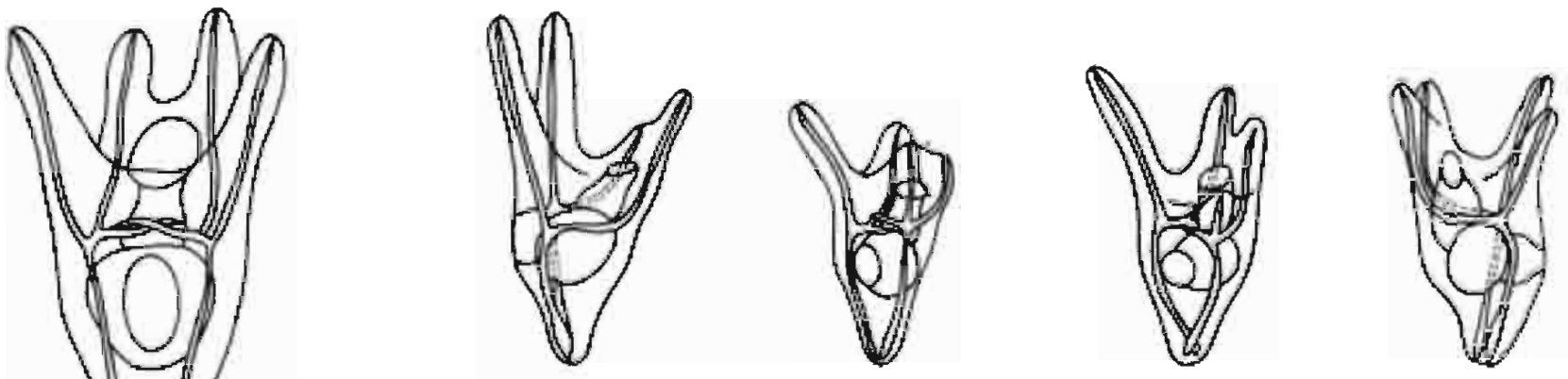


Рис. 8.3. Опыты Дриша, доказавшие существование развития по регуляционному типу. *А*. Нормальная личинка морского ежа - плутеус. *Б*. Более мелкие, но нормальные плутеусы; каждый из них развился из одного бластомера, полученного путем разделения 4-клеточного зародыша на отдельные бластомеры. (Все личинки зарисованы в одном масштабе.) Обратите внимание на то, что все 4 личинки, происшедшие из этих бластомеров (*Б*), не идентичны, несмотря на их способность образовывать все необходимые типы клеток. (По Hörstadius, Wolsky, 1936.)

зовывать дорсальные структуры, обнаруживались в вентральных клетках (рис. 8.4). Если бы в данном случае происходила сегрегация ядерных детерминантов, то у развившегося из этих клеток зародыша все структуры должны были располагаться в причудливом беспорядке. Однако Дриш получил из этих зародышей нормальных личинок.

Результаты этих опытов оказались очень важными как для эмбриологии, так и лично для Дриша. Во-первых, Дриш показал, что «проспективная потенция» изолированного бластомера (т.е. тот тип клеток, который мог из него произойти) шире, чем его «проспективная судьба» (т.е. те типы клеток, которые должны формироваться из этого бластомера при неизменном ходе его развития). Согласно же Вейсману и Ру, проспективная потенция и проспективная судьба бластомера должны быть идентичными. Во-вторых, Дриш пришел к выводу, что зародыш морского ежа представляет собой «гармоничную эквипотенциальную систему». Система эта гармонична потому, что все ее потенциально независимые части функционируют вместе, формируя единый организм. В-третьих, судьба ядра зависела исключительно от его положения в зародыше. Дриш (1894) выдвинул гипотезу о серии событий, продвигающих развитие вперед посредством взаимодействия ядра и цитоплазмы:

«Поскольку каждая клетка содержит ядро, она на протяжении онтогенеза несет в себе всю сумму зачатков; поскольку она содержит специфическое

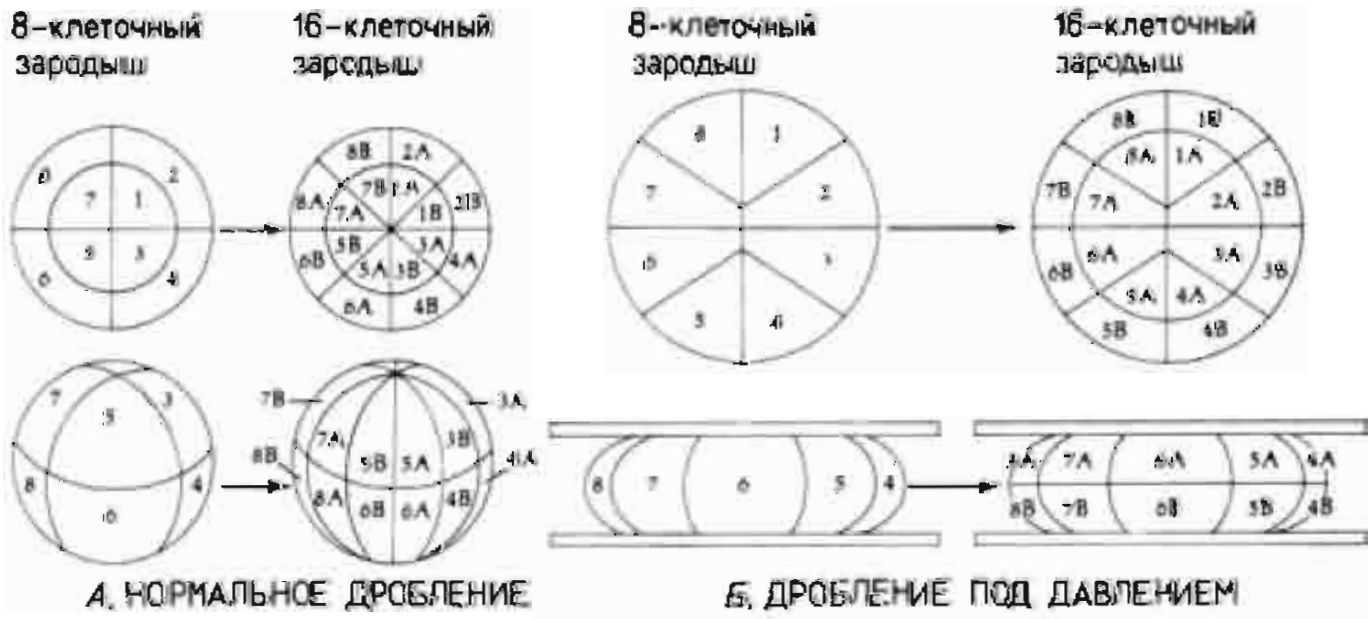


Рис. 8.4. Схема, иллюстрирующая результаты опыта Дриша со сдавливанием дробящихся зародышей для изменения распределения ядер. *А*. Нормальное дробление у зародыша морского ежа в возрасте от 8 до 16 клеток; вид с анимального полюса (*вверху*) и сбоку (*внизу*). *Б*. Аномальное положение плоскостей деления бластомеров, формирующееся под давлением; вид с анимального полюса и сбоку. (По Huxley, de Beer, 1934.)

Таблица 8.1. Экспериментальные методики и результаты Ру и Дриша

Исследователь	Организм	Тип опыта	Заключение	Соотношение между потенцией и судьбой клеток
Ру (1888)	Лягушки (*Rana temporaria [fusca]* и *Rana esculenta*)	Повреждение	Мозаичное развитие (самодифференцировка)	Проспективная потенция равна проспективному значению
Дриш (1892)	Морской еж (*Echinus microtuberculatus*)	Изоляция	Регуляционное развитие	Проспективная потенция шире, чем проспективное значение
Дриш (1893)	Морские ежи (*Echinus* и *Paracentrotus*)	Рекомбинация	Регуляционное развитие	Проспективная потенция шире, чем проспективное значение

цитоплазматическое клеточное тело, это позволяет ей реагировать только на специфические воздействия... Когда в какой-либо клетке активируется ядерный материал, цитоплазма этой клетки, которая влияла на ядро, сама в свою очередь оказывается под влиянием ядра и изменяется; таким образом, устанавливается основа для нового элементарного процесса, который является не только результатом, но также и причиной изменений».

Эта удивительно современная концепция ядерно-плазменного взаимодействия и равноценности ядер оказалась не по силам Дришу. Рассматривать зародыш как физическую машину было уже невозможно, ведь зародыш можно было разделить на части, каждая из которых была способна воссоздать целый организм. Другими словами, Дриш пришел к убеждению, что развитие не может быть объяснено физическими силами. И чтобы объяснить, каким образом происходит развитие, он был вынужден призвать на помощь жизненную силу – *энтелехию* («внутреннюю силу, направляющую к цели»). В сущности, зародыш *должен* быть наполненным внутренним духом и мудростью, чтобы осуществить свои цели, несмотря на препятствия, которые ставят на его пути эмбриологи. Неспособный объяснить свои результаты с позиций физики его времени, Дриш отказался от изучения физиологии развития, стал профессором философии и продолжал провозглашать витализм вплоть до своей смерти в 1941 г.

Различия в опытах Ру и Дриша суммированы в табл. 8.1. Различия между опытами по нанесению дефектов и изоляции, а также важность взаимодействий, обеспечиваемых разрушенными бластомерами, были выяснены в опытах Мак-Клендона (McClendon, 1910), показавших, что изолированные бластомеры лягушки ведут себя точно так же, как изолированные бластомеры морского ежа. Следовательно, мозаичное развитие бластомеров лягушки в исследованиях Ру было артефактом, полученным в опытах с нанесением дефекта. Что-то в мертвом бластомере или на нем все еще информировало живые клетки о его существовании. Мы видели также, что ранние бластомеры млекопитающих обладают регуляционным типом развития. Как уже обсуждалось в гл. 3, каждый изолированный бластомер внутренней клеточной массы у мыши способен генерировать целую фертильную мышь. Такие факты, как слияние двух и более ранних зародышей мыши в один нормальный зародыш (см. рис. 3.3) или рождение идентичных близнецов, также свидетельствуют о том, что ранние бластомеры млекопитающих способны к регуляции. Поэтому, хотя Вейсман и Ру были пионерами исследований в области физиологии развития, их предположение о том, что причиной дифференцировки является сегрегация ядерных детерминантов, вскоре было опровергнуто.

Свен Гёрстадиус: потенции и градиенты в ооците

Но и Дриш оказался прав не на 100%. Как мы видели в предыдущей главе, существует много животных, развитие которых представляет собой главным образом мозаику самодифференцирующихся частей. Более важно, однако, что даже зародыши морского ежа не представляют собой коллекцию полностью эквипотенциальных клеток. Шведский биолог Свен Гёрстадиус в серии опытов, проведенных с 1928 по 1935 г., отделял тонкими стеклянными иглами разные слои ранних зародышей морского ежа и наблюдал их последующее развитие (Hörstadius, 1928, 1939). Если он разделял 8-клеточный зародыш пополам по меридиану, проходящему через анимальный и вегетативный полюсы, то из обеих половин развивались личинки – плутеусы, как и предсказывал Дриш. Но если зародыши на той же стадии разделяли пополам по экватору (т. е. на анимальную и вегетативную половины), то ни одна из частей не развивалась в нормальную личинку (рис. 8.5). Анимальная половина превращалась в полый шар, образованный реснитчатыми

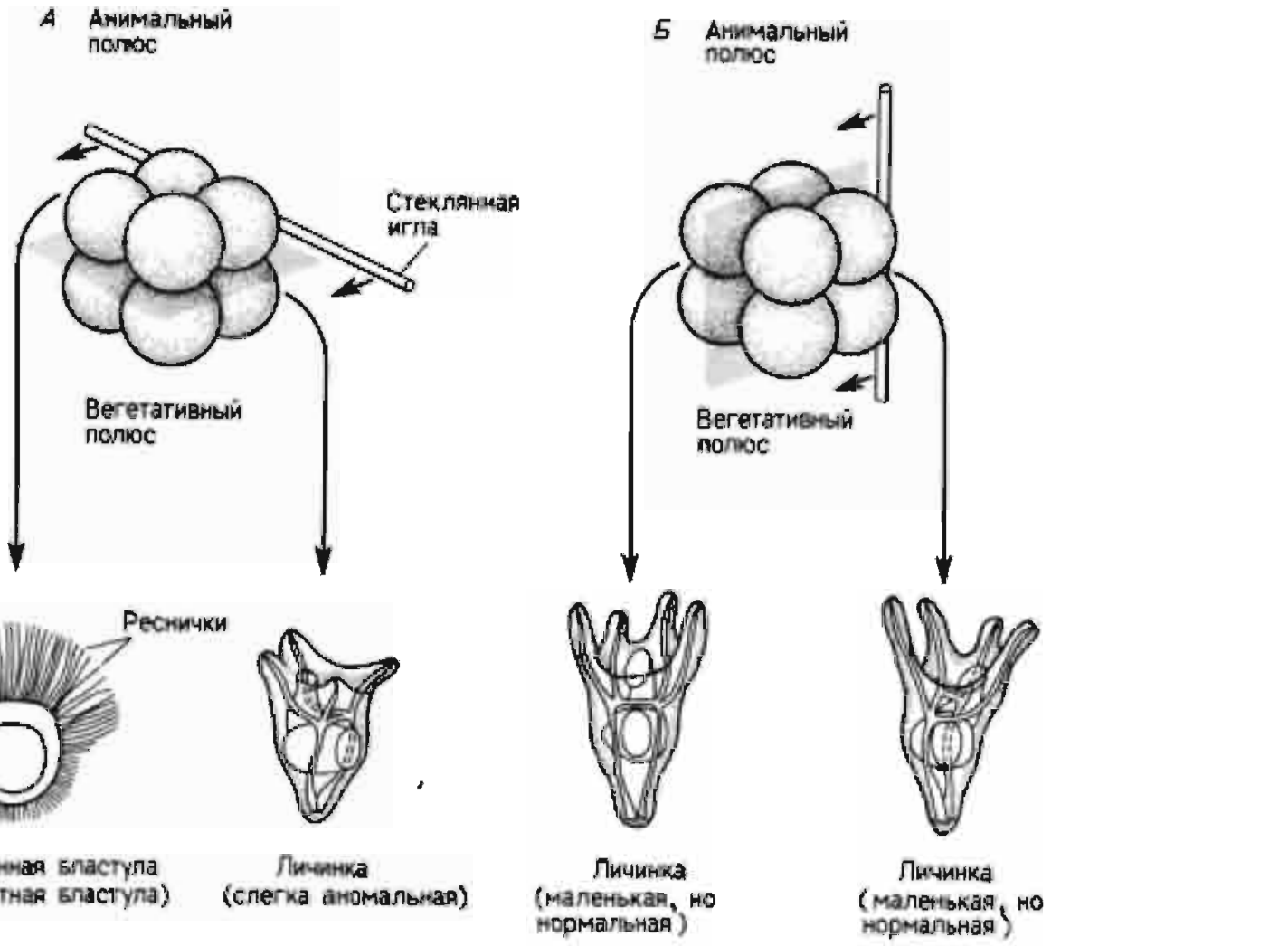


Рис. 8.5. Ранняя асимметрия у зародышей морского ежа. *А*. Если четыре анимальных бластомера отделить от четырех вегетативных и дать возможность каждой половине развиваться по отдельности, то анимальные клетки формируют снабженную ресничками *задержанную бластулу*, а вегетативные клетки – личинку с расширенной кишкой. *Б*. Если 8-клеточный зародыш разделить так, чтобы каждая половина содержала анимальные и вегетативные клетки, то развиваются мелкие, нормального вида личинки.

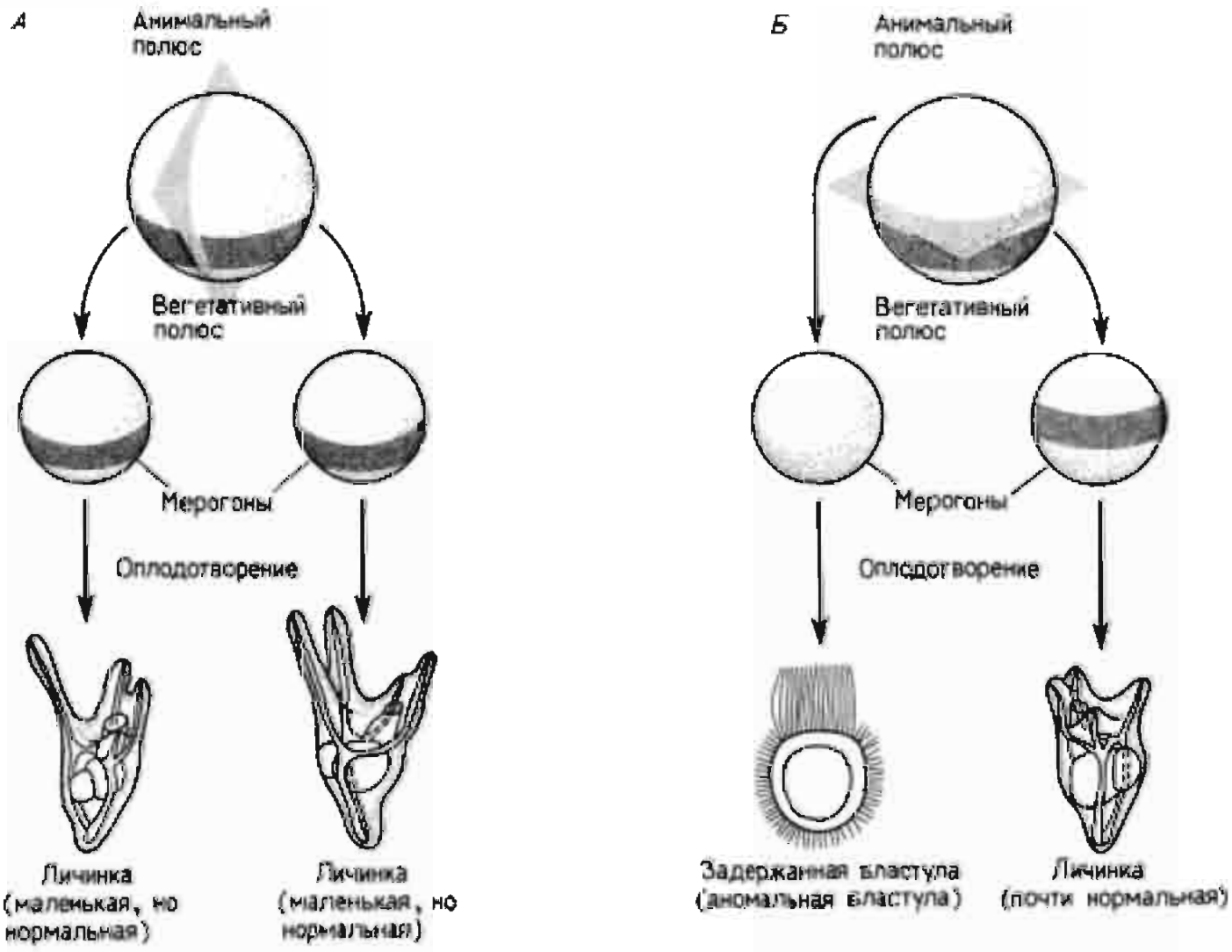


Рис. 8.6. Асимметрия в яйце морского ежа. *А*. Когда Гёрстадиус разделял яйцо морского ежа в меридиональной плоскости так, что обе половины (мерогоны) содержали анимальную и вегетативную цитоплазму, развивались мелкие, нормального вида плутеусы. *Б*. После того как яйцо морского ежа было разделено на анимальную и вегетативную половины и обе половины оплодотворены, из анимальной половины развивалась покрытая ресничками задержанная бластула, а из вегетативной – плутеус с расширенной кишкой.

эпидермальными клетками (называемый **Dauerblastula – продолженная** или **задержанная бластула**), а вегетативная половина развивалась в слегка аномальный зародыш с расширенной кишкой. Гёрстадиус смог повторить эти результаты, разрезая пополам яйца морского ежа и оплодотворяя обе половины по отдельности. У морских ежей фрагменты яиц (**мерогоны**) могут делиться и развиваться, даже если они имеют гаплоидное ядро. Если спермий проникает в половину, не содержащую гаплоидного ядра яйца, то мерогон также будет развиваться (рис. 8.6). Когда яйцо разрезали меридионально, из обеих половин яйца развивались нормальные зародыши. Однако когда яйцо разрезали экваториально, то после оплодотворения обеих половин из фрагментов формировались или окаймленный ресничками анимальный шарик, или зародыш с расширенной вегетативной кишкой. Следовательно, даже зародышам морского ежа, по-видимому, в некоторой степени присущ мозаицизм, по меньшей мере по анимально-вегетативной оси.

Эти наблюдения побудили Гёрстадиуса осуществить, пожалуй, один из наиболее поразительных опытов в истории эмбриологии. Сначала (1935) он проследил нормальное развитие шести слоев клеток у 64-клеточного зародыша морского ежа. Как показано на рис. 8.7, *А*, анимальные клетки и первый вегетативный слой (Veg_1) в норме образуют эктодерму, второй вегетативный слой (Veg_2) дает начало энтодерме и части личиночной мезодермы, а из микромеров развивается мезодермальный скелет.

Затем Гёрстадиус удалял у 64-клеточного зародыша оболочку оплодотворения, отделяя слои один от другого тонкими стеклянными иглами, и рекомбинировал их в разных сочетаниях. Изолированное анимальное полушарие превращалось в задержанную бластулу из эктодермальных клеток, покрытых ресничками (рис. 8.7, *Б*). Такой зародыш был назван анимализированным. Если Гёрстадиус комбинировал анимальное полушарие со слоем Veg_1 (рис. 8.7, *В*), то получившаяся в результате личинка была менее анимализированной; у нее было подавлено образование ресничек и формировалась часть кишки. Если же анимальное полушарие было соединено со слоем Veg_2 (рис. 8.7, *Г*), то развивалась личинка, выглядевшая нормальной. В этой комбинации слой Veg_2, который в норме формирует только архентерон и его производные, теперь формировал также скелетные структуры. Сходным образом, когда анимальную половину комбинировали только с микромерами (рис. 8.7, *Д*), формировался маленький, выглядевший нормальным плутеус, но в этом случае энтодерма была полностью образована анимальными клетками. У такого плутеуса кишка возникала из клеток, которые в норме должны были образовать снабженную ресничками эктодерму. Эти опыты показали, что даже на 64-клеточной стадии анимальные клетки сохраняют генетический потенциал к образованию клеток кишки. Еще более важным было то, что способность к подавлению «анимализации» носит **градиентный характер**. Микромеры были более сильными «вегетализаторами», чем слой Veg_2; но слой Veg_2 в свою очередь был сильнее, чем слой Veg_1.

Следующая серия опытов Гёрстадиуса подтвердила существование анимализирующего фактора, который также распределен по градиенту. Микромеры комбинировали с каждым слоем 64-клеточного зародыша по отдельности. Изолированный слой An_1 (рис. 8.8, *А*) должен был образовывать задержанную бластулу. Когда к этому слою добавляли различное число изолированных микромеров, причем число их постоянно увеличивали, развивались все более полные зародыши. Комбинация только слоя An_1 с четырьмя микромерами приводила к образованию нормального плутеуса. Из слоя An_2 нормальный плутеус развивался уже при комбинации с двумя микромерами (рис. 8.8, *Б*), а добавление четырех микромеров приводило к аномальному увеличению энтодермальных структур. Из слоя Veg_1 без добавления микромеров образуется также только задержанная бластула. Однако добавление даже одного микромера вызывало резкое увеличение кишки (рис. 8.8, *В*), а изолированный слой Veg_2 вообще имел тенденцию к вегетализации без добавления каких-либо микромеров (рис. 8.8, *Г*). Таким образом, существует, по-видимому, градиент анимализации, усиливающийся по направлению от An_1 к микромерам.

Наиболее логичным объяснением этих результатов было предположение, что существуют два противоположно направленных градиента: вегетализирующий градиент с максимумом активности на вегетативном полюсе и анимализирующий градиент с максимальной активностью на анимальном полюсе. Именно такую систему двойных градиентов предложил старший коллега Гёрстадиуса Дж. Рунстрем (Runnstrom, 1929). Поскольку для развития более важны относительные, а не абсолютные концентрации различных веществ, рекомбинация бластомеров из двух полюсов восстанавливает все промежуточные значения градиентов. Сходным образом промежуточные клетки, еще содержащие максимум и минимум для обоих градиентов, также могут дать начало нормальному плутеусу (рис. 8.9). Эта модель двойного градиента оказалась очень полезной для объяснения других рекомбинационных опытов. Например, если микромеры из вегетативного полюса пересаживали в область, близкую к центру 32-клеточного зародыша, то они инвагинировали в бластоцель хозяина, где вызывали формирование хорошо развитого вторичного архентерона

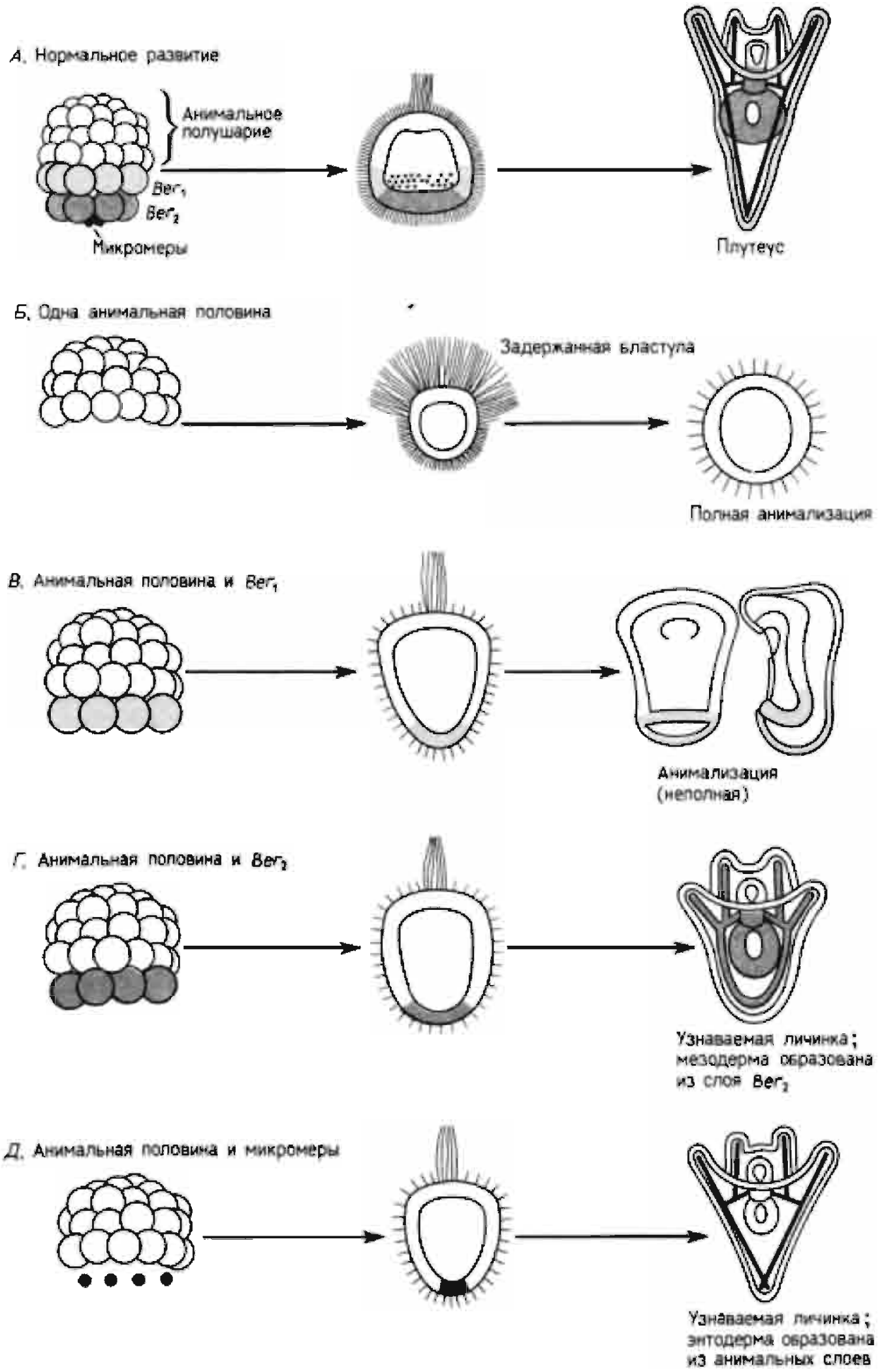


Рис. 8.7. Обнаружение вегетализирующего градиента в опытах Гёрстадиуса. *А*. Судьба каждого клеточного слоя зародыша морского ежа на стадии 64 клеток, прослеженная от бластулы до стадии плутеуса. Различные клеточные слои обозначены разными оттенками серого цвета, а микромеры – черным (как на рис. 4.1). *Б*. Судьба изолированной анимальной половины. *В*. Рекомбинация анимальной половины со слоем клеток Ber_1. *Г*. Рекомбинация анимальной половины со слоем клеток Ber_2. *Д*. Анимальная половина и микромеры. (По Hörstadius, 1939.)

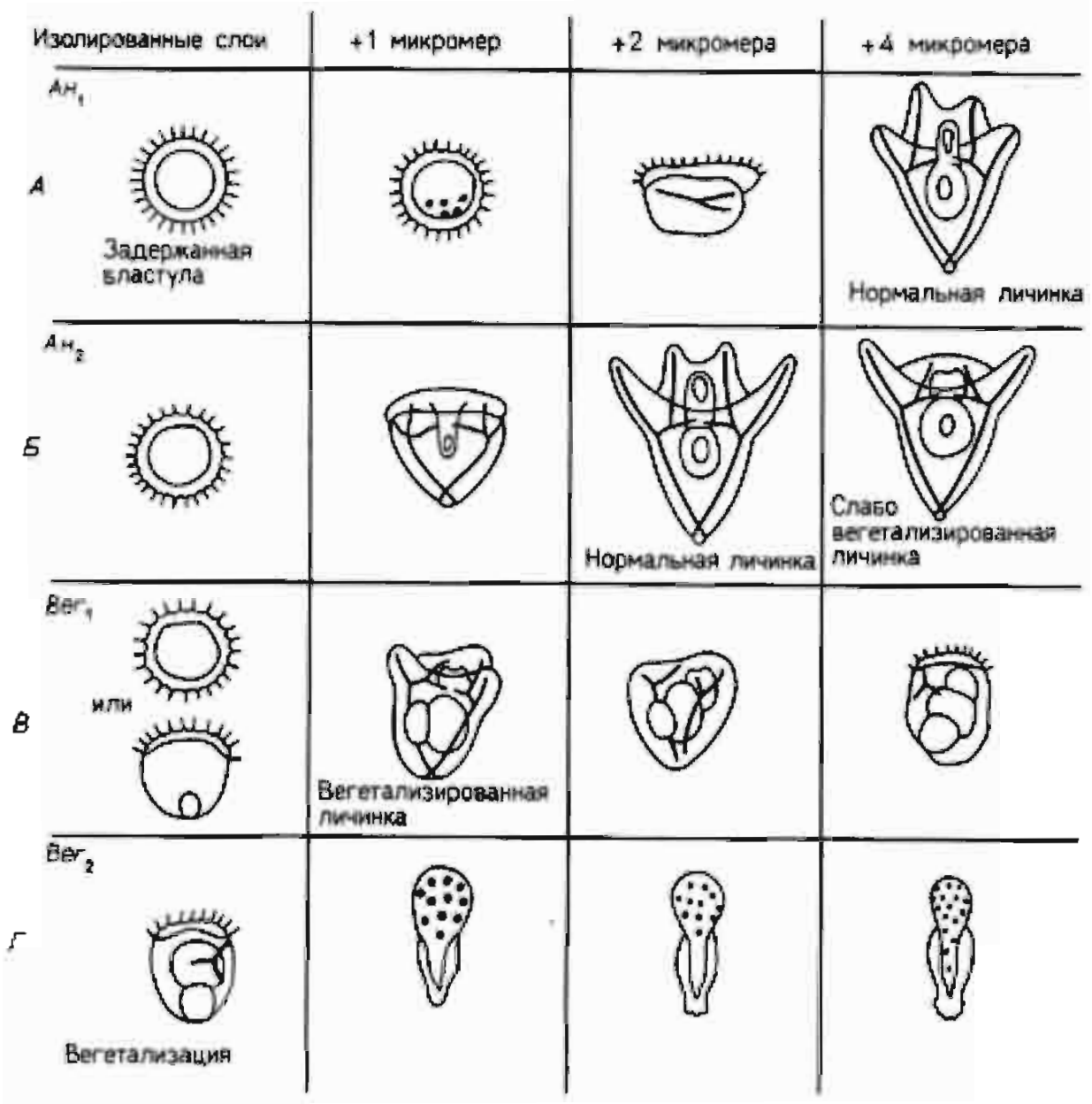


Рис. 8.8. Обнаружение анимализирующего градиента в опытах Гёрстадиуса. Каждый слой 32-клеточного зародыша морского ежа был изолирован и затем рекомбинирован с 0, 1, 2 или 4 микромерами. Чтобы из клеток, происходящих из слоя An_1, сформировался нормальный плутеус, необходимы все 4 микромера (*А*), но чтобы плутеус образовался из слоя An_2, достаточно двух микромеров. Слой Veg_1 развивается в вегетализированную личинку уже с одним микромером (*В*), а в клетках слоя Veg_2 вообще отсутствуют анимализирующие свойства, достаточные, чтобы сформировался нормальный плутеус (*Г*). (По Hörstadius, 1935.)

(рис. 8.10). Если же микромеры имплантировали на анимальный полюс, то формировалась очень маленькая вторичная кишка. Вместе с тем из зародышей не удалось выделить ни вегетативный, ни анимальный факторы. Ингибиторы белков (тяжелые металлы, NaSCN, краситель синий Эванса), по-видимому, уменьшали вегетализирующий градиент и таким способом анимализировали зародыш. Ингибиторы дыхания (CO, KCN, NaN_3, Li) вегетализировали зародыш. Так, Убишу (Ubisch, 1929) удалось получить нормальный плутеус из анимальной половины, которая развивалась в растворе хлористого лития. Литий, по-видимому, ослабляет анимальную часть градиента в пределах анимальных клеток и тем самым способствует сбалансированному развитию этого полушария.

Таким образом, мы имеем модель регуляционного развития, основанную на относительных концентрационных градиентах в ооците. Когда анимальные клетки комбинируют только с микромерами, формируется нормальный плутеус с клетками кишки, происходящими из анимальных клеток, которые в норме должны были формировать эктодерму. Следовательно, и на более поздних стадиях развития потенции клеток все еще шире, чем их судьба. Но из одних анимальных клеток теперь образуется только анимализированная бластула, так что способность одной клетки дать начало целой личинке исчезла. Другими словами, ее потенции стали ограниченными. Любая клетка с определенным соотношением анимальных и вегетативных веществ будет продуцировать определенный тип клеток. Следовательно, клетки анимального полюса с более высоким отношением анимального фактора к вегетативному в норме будут образовывать эктодермальную ткань. Однако некоторые ани-

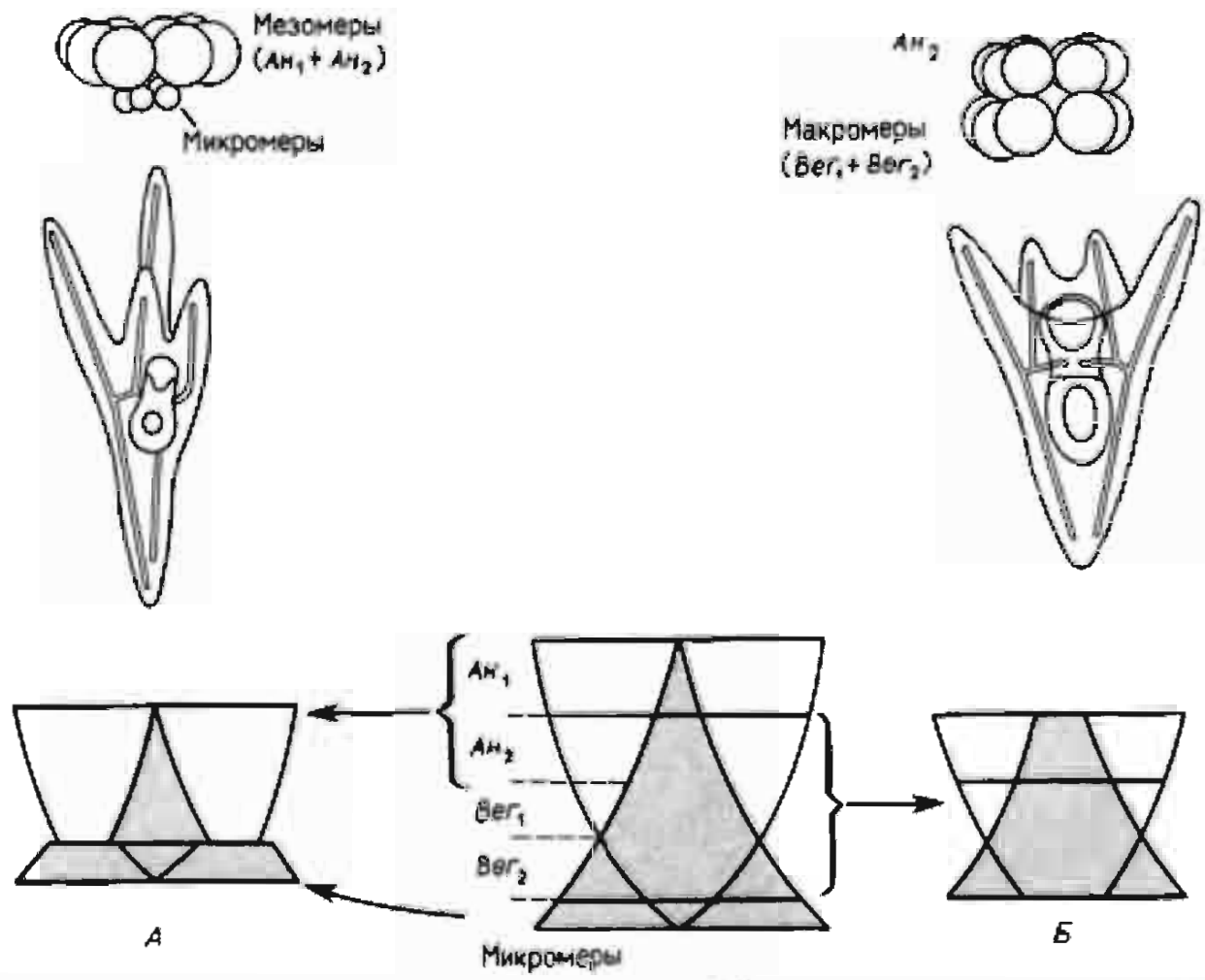


Рис. 8.9. Развитие плутеуса из наружных и промежуточных клеток 32-клеточного зародыша морского ежа. *А*. К слою мезомеров ($Ан_1 + Ан_2$) добавлены микромеры. *Б*. Слой $Ан_2$ с добавлением макромеров (будущие слои $Вег_1$ и $Вег_2$), но без двух крайних слоев ($Ан_1$ и микромеры). В обоих случаях образуются плутеусы. Каждый рисунок в нижнем ряду представляет собой гипотетический градиент. (По Czihak, 1971.)

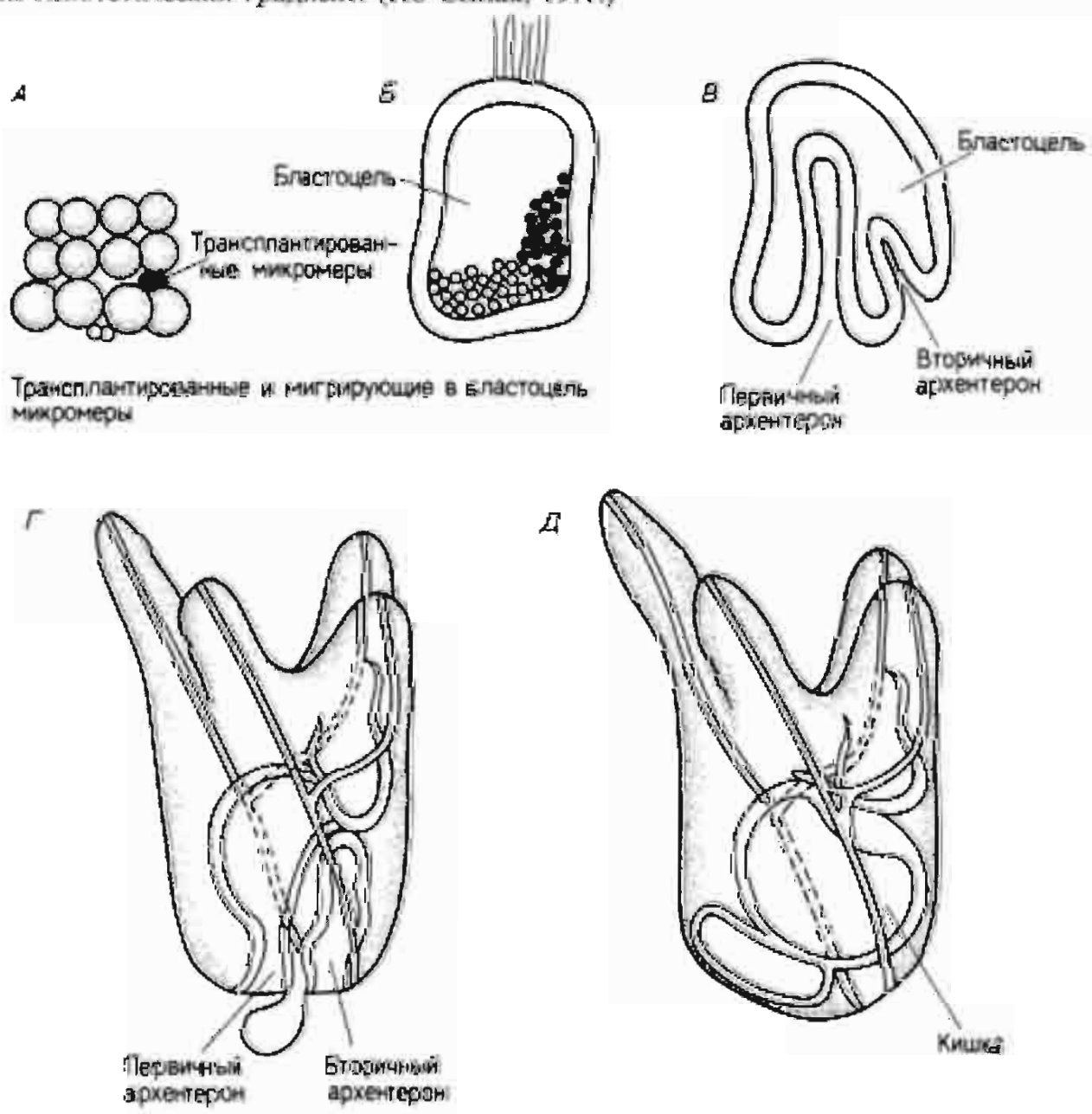


Рис. 8.10. *А*. Микромеры, взятые из области вегетативного полюса (обозначены черным), пересажены в область между анимальной и вегетативной половинами 32-клеточного зародыша. *Б*. Микромеры инвагинируют в бластоцель. *В*. Формируется вторичный архентерон и в конечном счете плутеус (*Г*), имеющий два архентерона. *Д*. Эти два отдельных архентерона позже сливаются в одну большую кишку. (По Hörstadius, 1935.)

мальные клетки, рекомбинированные с сильным источником вегетативного фактора, будут формировать ткань кишки. Если зародыш разделен таким образом, что каждая половина содержит полный анимальный и вегетативный градиенты (т.е. разделение произведено по меридиану, проходящему вдоль анимально-вегетативной оси), то формируется полная личинка. Бластомеры остаются способными к регуляции до тех пор, пока не будут формироваться исключительно из анимальной или вегетативной цитоплазмы. Поэтому неудивителен тот факт, что после 32-клеточной стадии бóльшая часть бластомеров по отдельности более не может дать начало целой личинке (Morgan, 1895), а микромеры с 16-клеточной стадии уже неспособны к этому (Hagstrom, Lonning, 1965; Okazaki, 1975). Даже для зародыша, развитие которого является регуляционным, наступает время, когда потенции его клеток становятся ограниченными.

Ганс Шпеман: прогрессивная детерминация эмбриональных клеток

В предыдущем разделе главы были приведены данные о регуляционном типе развития. Мы отметили два главных аспекта регуляции: 1) потенция изолированных бластомеров в эмбриогенезе шире, чем их нормальная судьба, и 2) бластомеры, перемещенные в другую область зародыша, развиваются согласно их новому положению. Оба этих явления характерны для ранних стадий дробления морского ежа. Однако впоследствии бластомеры морского ежа становятся коммитированными к их различным проспективным значениям. Гёрстадиусу удалось связать ограничение потенций с ориентацией плоскости делений дробления, поскольку бластомеры могли регулировать развитие лишь до тех пор, пока они имели достаточно материала как из анимальной, так и из вегетативной частей яйца. В 1918 г. Ганс Шпеман (H. Spemann) из Фрайбургского университета обнаружил, что сходная ситуация наблюдается и в яйце тритона. Опыты, с помощью которых он и его коллеги анализировали это явление в течение более чем 20 лет, заложили основу большей части наших знаний о физиологии развития и обусловили присуждение Шпеману Нобелевской премии в 1935 г.

Шпеман, подобно Ру и Дришу, решил проверить гипотезу Вейсмана и с помощью остроумной методики доказал, что ядра ранних бластомеров тритона идентичны, т.е. каждое из них способно обеспечить развитие целой личинки. Пользуясь волоском ребенка в качестве лигатуры, он перевязывал им яйцо тритона вскоре после оплодотворения в плоскости первого деления дробления. Затем он несколько стягивал петлю так, что все деления ядер происходили лишь в одной из половин. Наконец на стадии 16 бластомеров одно ядро смогло проскользнуть через перетяжку в безъядерную половину. Дробление начиналось и в этой половине, а петлю, накинутую на яйцо, Шпеман стягивал все сильнее, пока не разделял яйцо на две изолированные половины. В результате развивались два зародыша-близнеца, причем один был немного старше другого (рис. 8.11). Результаты этого опыта позволили Шпеману сделать вывод, что ядра ранних зародышей амфибий идентичны и каждое способно обеспечить развитие целого организма. В этом отношении бластомеры амфибий были сходны с бластомерами морских ежей.

Однако, когда Шпеман проделал сходный опыт с перетягиванием яйца также лонгитудинально, но перпендикулярно к плоскости первого деления дробления (т.е. разделял яйцо не на левую и правую половины, а на будущую спинную и брюшную стороны), он получил совершенно другой результат! По обе стороны от лигатуры ядра продолжали делиться, но лишь из клеток одной стороны образовалась нормальная личинка. Из другой половины возникала только неорганизованная масса ткани, названная Шпеманом Bauchstück – «кусок живота». Эта масса тканей представляла собой шарик эпидермальных клеток (эктодерма), содержащий внутри кровь и мезенхиму (мезодерма) и клетки кишки (энтодерма), но в нем не было дорсальных структур, таких, как нервная система, хорда или сомиты (рис. 8.12).

Почему описанные выше два опыта дали разные результаты? Не могло ли это быть вызвано тем, что при первом делении яйца, когда плоскость деления проходила перпендикулярно к нормальной плоскости первого деления дробления, некоторые цитоплазматические вещества неравномерно распределялись по двум половинам? К счастью, яйцо тритона оказалось очень удобным для получения ответа на этот вопрос. Как уже говорилось в гл. 2 и 4, в яйцах амфибий после оплодотворения происходит резкое смещение кортикального слоя цитоплазмы и у некоторых видов амфибий такое движение приводит к образованию серого серпа в области, прямо противоположной месту проникновения спермия в яйцо. Кроме того, плоскость первого деления дробления обычно делит эту область поровну между двумя бластомерами, из которых, если их отделить друг от друга, развиваются две нормальные личинки. Однако, если плоскость первого деления отклоняется от середины серого серпа (в редких случаях спонтанно или в опыте, в котором исследователь перетягивает яйцо волосяной петлей перпендикулярно плоскости нормального деления), то материал

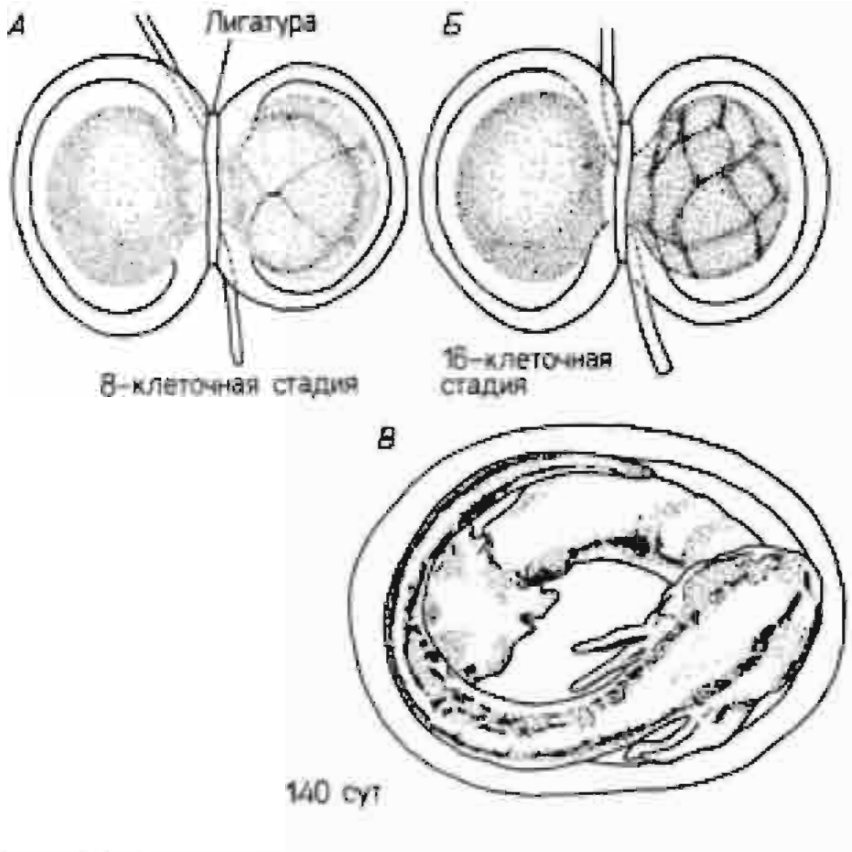


Рис. 8.11. Опыты Шпемана, показавшие равноценность ядер у зародышей тритона в период дробления. *А*. Если на оплодотворенное яйцо тритона *Triturus vulgaris (= T. taeniatus)* накладывали лигатуру, то ядро оказывалось в одной половине зародыша. Когда дробление в этой половине доходило до стадии 8 бластомеров, безъядерная половина оставалась неразделенной. *Б*. На 16-клеточной стадии в эту половину перешло одно ядро, и лигатура была стянута еще сильнее – до полного разделения двух половин в яйцевой оболочке. *В*. Через 140 сут каждая половина яйца развилась в нормального зародыша. (По Spemann, 1938.)

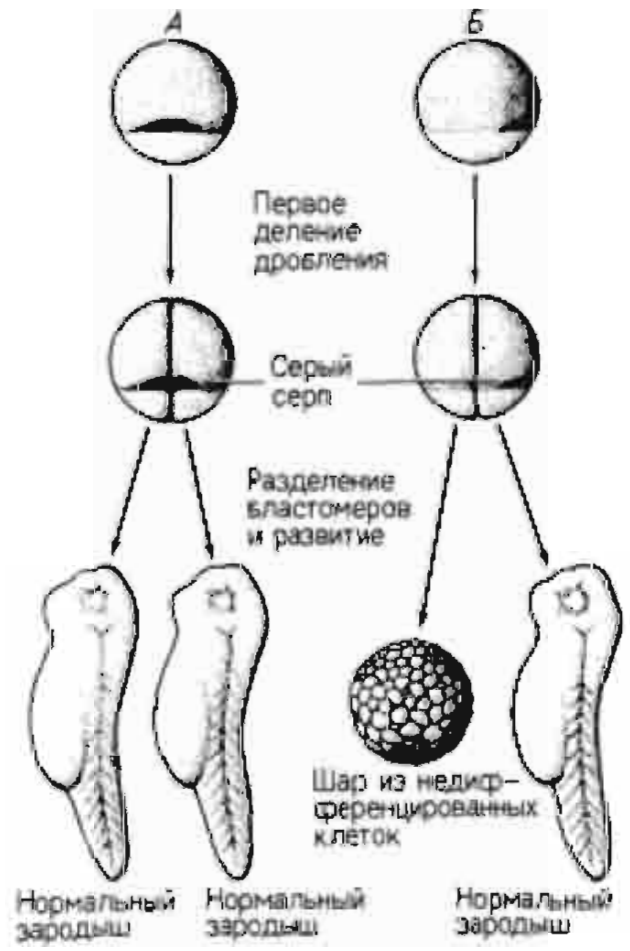


Рис. 8.12. Асимметрия в яйце амфибий. *А*. Если плоскость первого деления дробления делит яйцо на две половины, в каждую из которых попадает половина серого серпа, то оба бластомера после *их* изоляции друг от друга развиваются в нормальных зародышей. *Б*. Если весь серый серп попадает в один из двух бластомеров, то нормальный зародыш образуется только из бластомера, содержащего серый серп. Из другого формируется масса неорганизованной ткани, лишенной дорсальных структур. (По Spemann, 1938.)

серого серпа может попасть только в один из двух бластомеров. Шпеман обнаружил, что когда эти два бластомера разделены полностью, нормально развивается только тот бластомер, который содержит материал серого серпа.

Отсюда следует, что в области серого серпа содержится, по-видимому, какой-то фактор, весьма существенный для правильного развития зародыша. Но как этот фактор действует? Какую роль играет в нормальном развитии? Наиболее важный ключ к решению этого вопроса дает судьба области серого серпа. Показано, что из нее образуются клетки, которые инициируют гаструляцию и формируют спинную губу бластопора. Клетки спинной губы бластопора (см. гл. 4) запрограммированы, чтобы инвагинировать внутрь зародыша и, таким образом, начинать гаструляцию и формирование архентерона. Поскольку все будущее развитие амфибий зависит от взаимодействия клеток, перемещающихся в процессе гаструляции, Шпеман предположил, что материал серого серпа играет решающую роль в инициации гаструляции и что в период гаструляции в развитии зародыша происходят кардинальные изменения.

В 1918 г. Шпеман показал, что в период гаструляции действительно резко меняется потенция клеток. Он обнаружил, что клетки *ранней* гаструлы еще не детерминированы к их конечной дифференцировке, тогда как на стадии *поздней* гаструлы судьба клеток уже определена. Шпеман произвел пересадки тканей на стадии ранней гаструлы у двух различно пигментированных видов тритонов (рис. 8.13). Если участок презумптивного эпидермиса трансплантировали в область будущей нервной пластинки, то он превращался в нервную ткань. А если клетки презумптивной нервной пластинки пересаживали в область будущего эпидермиса живота, то они становились эпидермальными (табл. 8.2). Следовательно, клетки ранней гаструлы тритона не были коммитированы к специфическому типу дифференцировки. Их проспективные потенции были все еще шире их проспективного значения. Принято говорить о **зависимом развитии** этих клеток, поскольку их судьба зависит от их локализации в зародыше. Однако, когда такие же самые гетеропластические (межвидовые) пересадки были осуществлены на стадии *позд-*

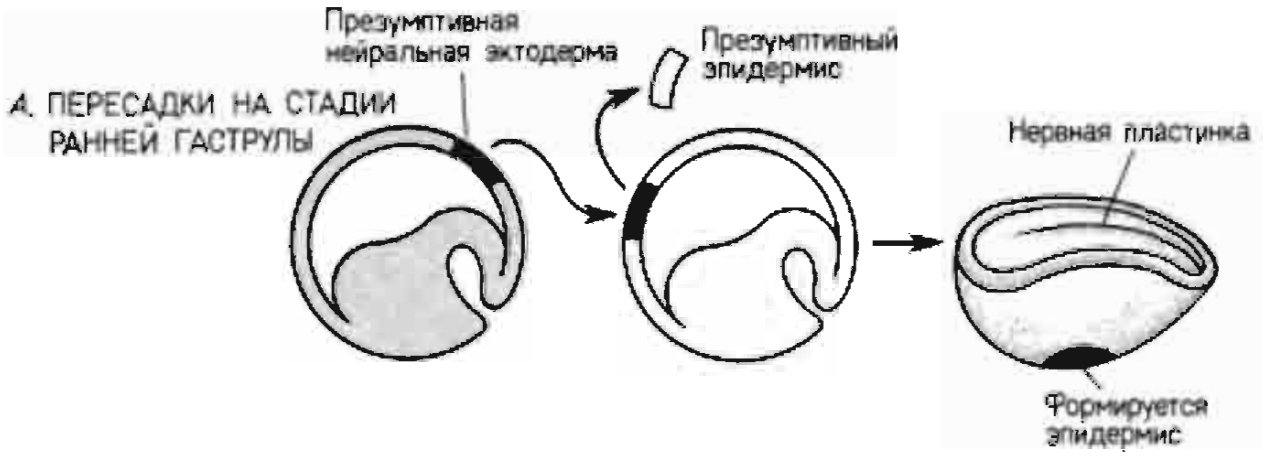


Рис. 8.13. Детерминация эктодермы в период гаструляции у тритона. Презумптивную нейральную эктодерму от одного зародыша тритона пересаживали другому зародышу в область, которая в норме становится эпидермисом. *А*. Если пересадку производили на стадии ранней гаструлы, то презумптивная нервная ткань развивалась в эпидермис и была видна только одна нервная пластинка. *Б*. Если такую же операцию проводили на стадии поздней гаструлы, то презумптивные нервные клетки формировали нейральную ткань и у хозяина формировались две нейральные области. (По Saxén, Toivonen, 1962.)

лей гаструлы. Шпеман получил совершенно другой результат. Вместо того чтобы регулировать собственную дифференцировку в соответствии со своим новым положением, трансплантированные клетки обнаружили **независимое** (или **автономное**) **развитие.** Их проспективное значение уже было зафиксировано, и клетки развивались независимо от своего нового положения в зародыше. Презумптивные нервные клетки теперь образовывали нервную ткань даже в том случае, когда их помещали в область будущего эпидермиса, а презумптивный эпидермис формировал кожу, даже будучи помещенным в область презумптивной нервной трубки. Следовательно, за время, прошедшее от стадии ранней гаструлы до стадии поздней гаструлы, потенции этих групп клеток сузились, так что они

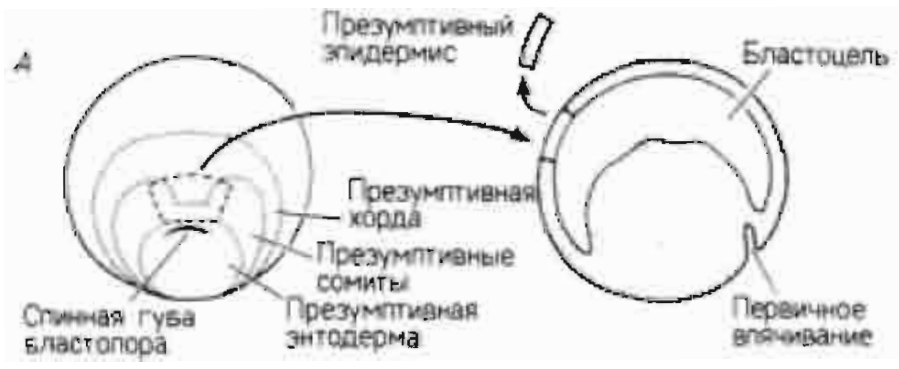
Таблица 8.2. Результаты пересадок тканей на стадиях ранней и поздней гаструлы у тритона

Область донора	Область хозяина	Дифференцировка ткани донора	Заключение
РАННЯЯ ГАСТРУЛА			
Презумптивные нейроны	Презумптивный эпидермис	Эпидермис	Зависимое развитие
Презумптивный эпидермис	Презумптивные нейроны	Нейроны	Зависимое развитие
ПОЗДНЯЯ ГАСТРУЛА			
Презумптивные нейроны	Презумптивный эпидермис	Нейроны	Независимое развитие (детерминированное)
Презумптивный эпидермис	Презумптивные нейроны	Эпидермис	Независимое развитие (детерминированное)

смогли следовать только одному своему специфическому пути дифференцировки. Эти клетки теперь можно назвать **детерминированными.** Под детерминацией подразумевается коммитирование (предназначение) клеток к тому, чтобы в конечном счете дифференцироваться именно в этот, а не в какой-либо иной специфический тип. Поэтому на стадии поздней гаструлы клетки анимального полюса на той стороне, где закладывается спинная губа бластопора, коммитированы (детерминированы) к образованию нервной ткани в любом месте, куда бы они ни попадали (включая чашку Петри). Их развитие уже не поддается регуляции, и они не могут превратиться в клетки других типов. Следует отметить, что критерием для определения состояния детерминации служит поведение клеток в условиях опыта. Никаких явных изменений в клетках не происходит, и еще не видно никаких признаков их дифференцировки. Молекулярные основы детерминации остаются одной из главных и пока нерешенных проблем биологии развития.

Ганс Шпеман и Гильда Мангольд: первичная эмбриональная индукция

Ганс Шпеман и Гильда Мангольд в 1924 г. опубликовали результаты наиболее эффектных опытов по трансплантации. Они показали, что единственной самодифференцирующейся областью на стадии ранней гаструлы является область спинной губы бластопора и что она действительно инициирует гаструляцию и эмбриогенез в окружающей ткани. В этих опытах Шпеман и Мангольд использовали зародышей двух по-разному пигментированных видов тритона: сильно пигментированного обыкновенного тритона [*Triturus vulgaris* (*taeniatus*)] и непигментированного (светлого) гребенчатого тритона (*Triturus cristatus*)]. Препарируя зародышей, Шпеман и Мангольд по окраске с легкостью могли различить ткани донора и хозяина. Спинную губу бластопора (материал дорсальной краевой зоны), взятую от зародышей гребенчатого тритона на стадии ранней гаструлы, пересаживали зародышу обыкновенного тритона, находящемуся на той же стадии, в область, предназначенную стать брюшным эпидермисом (рис. 8.14, *А*). В отличие от других тканей гаструлы, которые развивались согласно своему новому положению, губа бластопора донора не стала брюшным эпидермисом. Она инвагинировала, как делала бы это на своем обычном месте (обнаруживая тем самым свою детерминированность), и исчезала под клетками вегетативного полушария. Светлоокрашенные ткани донора затем продолжали дифференцироваться в хордомезодерму и другие мезодермальные структуры, образова-



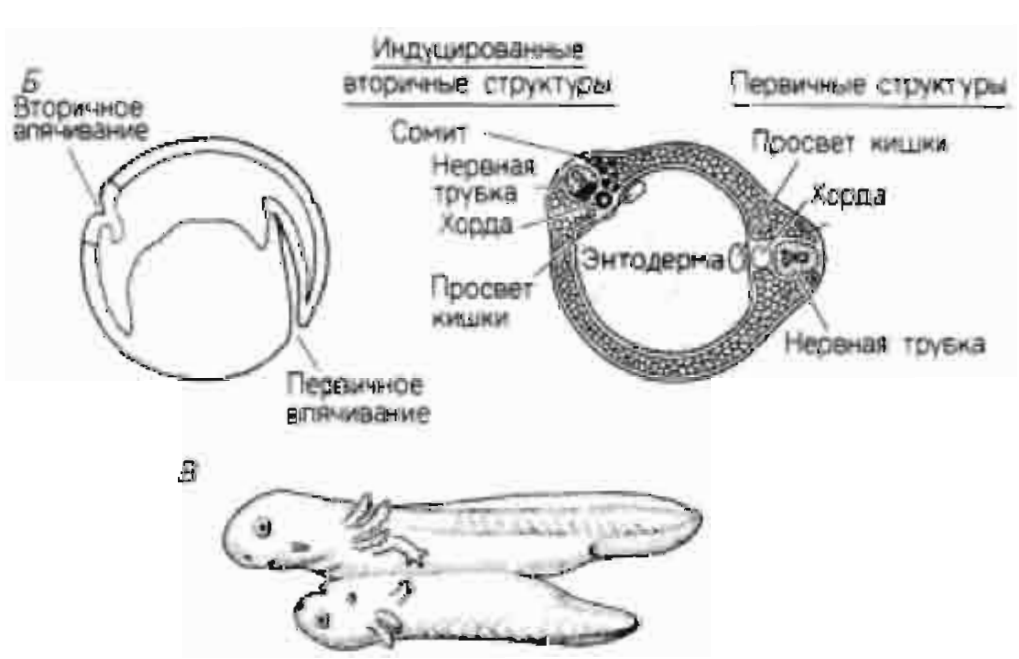


Рис. 8.14. Самодифференцировка материала спинной губы бластопора. Спинную губу бластопора, взятую у зародыша на стадии ранней гаструлы (*А*), пересаживали другому такому же зародышу в область, которая в норме должна стать брюшным эпидермисом. *Б*. Трансплантат инвагинирует и формирует второй архентерон, а затем вторичные осевые структуры. В образовании этой новой нервной трубки, хорды и сомитов участвуют как клетки донора (на рисунке обозначены черным цветом), так и хозяина (обозначены белым цветом). *В*. В результате формируется вторичный зародыш, соединенный с зародышем-хозяином.

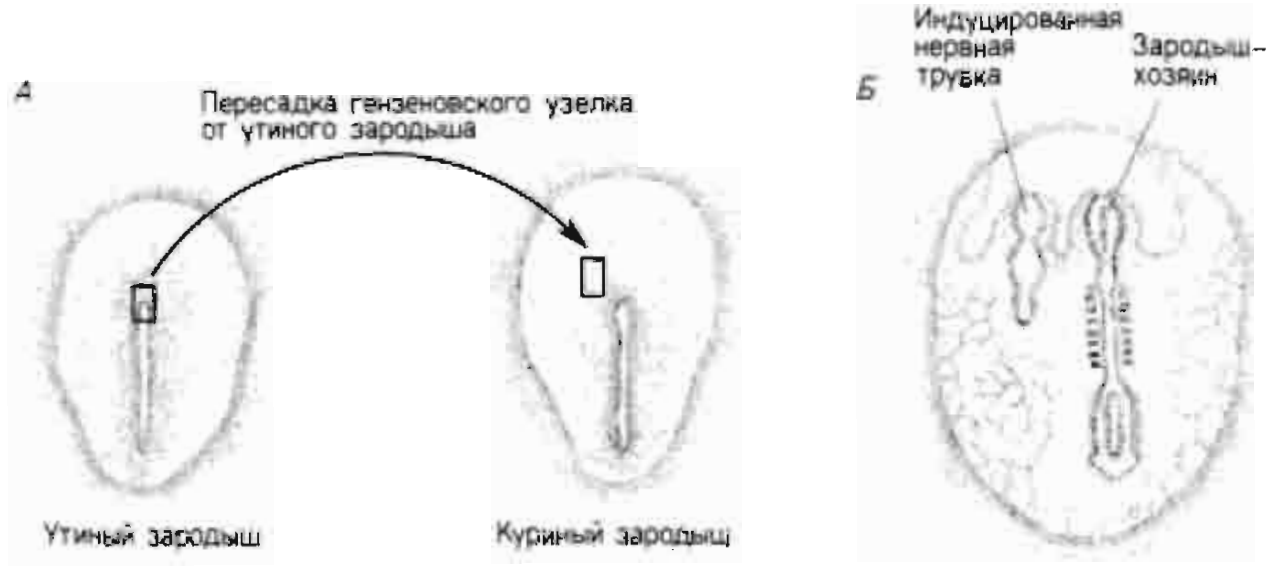


Рис. 8.15. Индукция новых осевых структур зародыша гензеновским узелком. *А*. Область гензеновского узелка, взятая у зародыша утки, имплантирована хозяину—куриному зародышу. *Б*. На месте трансплантата индуцировалась дополнительная нервная трубка. (По Waddington, 1933.)

ние которых соответствовало собственной судьбе материала спинной губы бластопора. После того как сформировались эти вторичные осевые структуры, клетки хозяина начали также принимать участие в образовании нового зародыша, давая начало органам, которыми они никогда не должны были стать. Например, сомиты содержали как бесцветную (донорскую), так и пигментированную (хозяйскую) ткань. Но наиболее поразительным оказалось то, что хордомезодерма была способна, взаимодействуя с лежащими над ней эктодермальными клетками, индуцировать образование всей нервной пластинки. В некоторых случаях «лицом к лицу» с зародышем-хозяином формировался вторичный зародыш (рис. 8.14, *Б*). Эти методически трудные опыты были недавно повторены с использованием ядер-маркеров; результаты опытов Шпемана и Мангольд подтвердились (Gimlich, Cook, 1983; Recanzone, Harris, 1985)[1].

Процесс, посредством которого одна область зародыша, взаимодействуя с другой, побуждает эту область развиваться в направлении ином, чем она развивалась бы без этого воздействия, называют **индукцией.** Поскольку в эмбриогенезе происходят самые разнообразные многочисленные индукционные взаимодействия, это ключевое взаимодействие, в котором дорсальная мезодерма индуцирует эктодерму к дифференцировке в нейральные структуры, получило название **первичной эмбриональной индукции**[1]. Область спинной губы бластопора Шпеман назвал **организатором.** Теперь известно (главным образом благодаря Шпеману и его ученикам), что взаимодействия между хордомезодермой и эктодермой недостаточно, чтобы «организовать» целого зародыша. Точнее, это взаимодействие инициирует серию индукционных процессов. Мы также знаем теперь, что спинная губа бластопора сходным образом «организует» вторичного зародыша у *Amphioxus* (ланцетника), круглоротых и различных видов амфибий. Передняя часть первичной полоски (т.е. гензеновский узелок—область, в которой начинается гаструляция у птиц и млекопитающих) действует сходным образом, инициируя образование вторичных зародышей у этих классов позвоночных (Waddington, 1933, рис. 8.15).

Региональная специфичность индукции

Одним из наиболее любопытных явлений в первичной эмбриональной индукции является региональная специфичность образующихся нейральных структур. Переднемозговая (архенцефалическая), заднемозговая (дейтеренцефалическая) и спинокаудальная области нервной трубки должны быть организованы в соответствующем порядке спереди назад. Следовательно, хордомезодермальная ткань крыши первичной кишки индуцирует не только нервную трубку в целом, но также и ее специфические отделы. Эта региональная специфичность индукции была обнаружена Отто Мангольдом

[1] Гильда Прейсольдт-Мангольд трагически погибла при взрыве бензина в нагревательном приборе. Она прожила всего 26 лет, и статья ее была только что опубликована. Опыт, который лег в основу ее кандидатской диссертации, был одним из очень немногих в биологии, имевших прямое отношение к присуждению Нобелевской премии. Более подробные сведения о жизни этого замечательного человека и ее времени можно найти в статье Гамбургера (Hamburger, 1984).

[1] Этот классический термин стал источником путаницы, поскольку индукция нервной трубки хордой больше не считается первым индукционным влиянием у зародыша. Позже мы обсудим индукционные события, предшествующие этой «первичной» индукции.

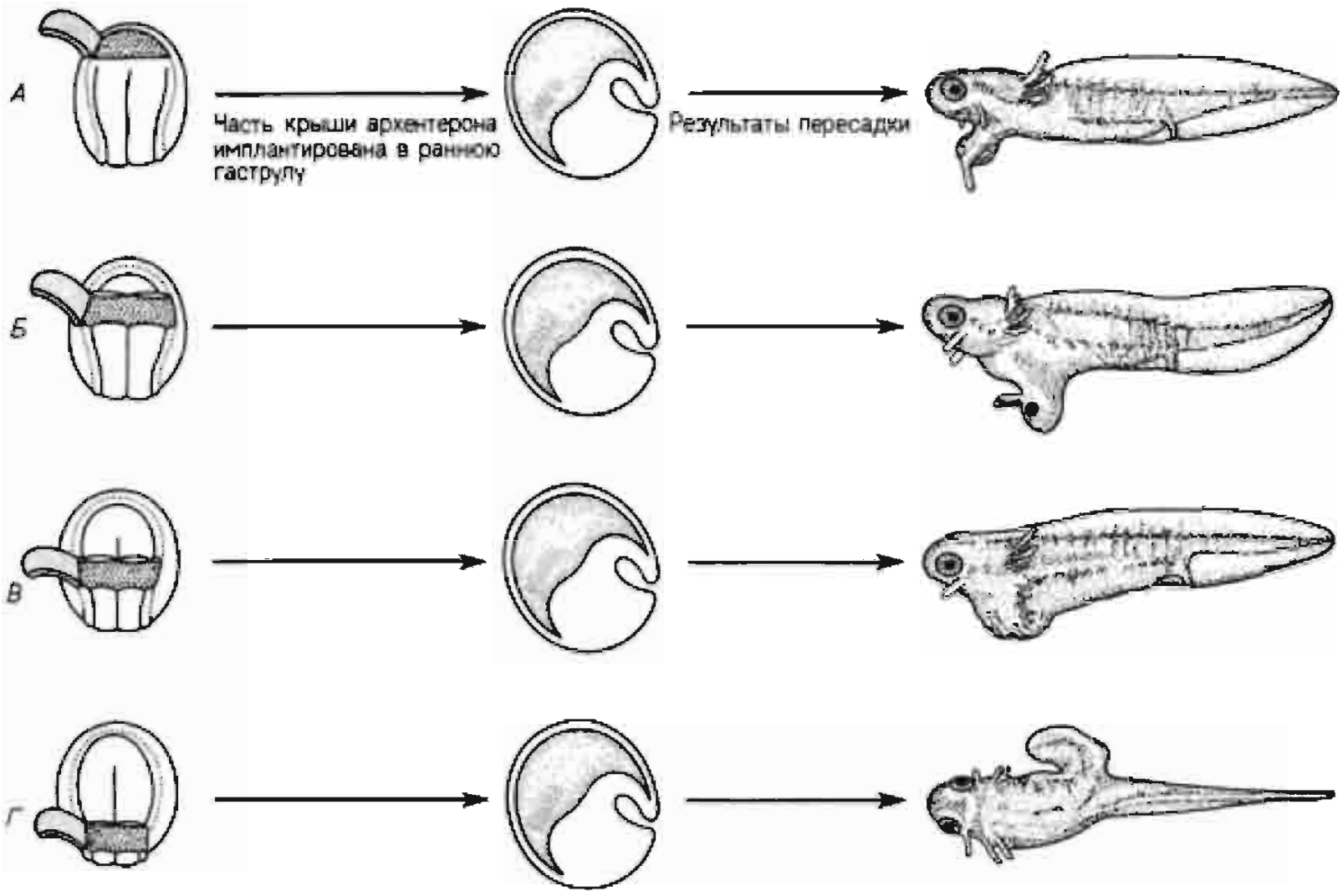


Рис. 8.16. Региональная специфичность индукции может быть обнаружена посредством имплантации различных участков крыши архентерона (обозначены темно-серым цветом) в бластоцель зародыша обыкновенного тритона на стадии ранней гаструлы. У животных-хозяев сформировались различные дополнительные структуры. *А*. Голова с балансерами. *Б*. Голова с балансерами, глазами и передним мозгом. *В*. Задняя часть головы, задний мозг и слуховые пузырьки. *Г*. Туловищно-хвостовые структуры. (По Mangold, 1933.)

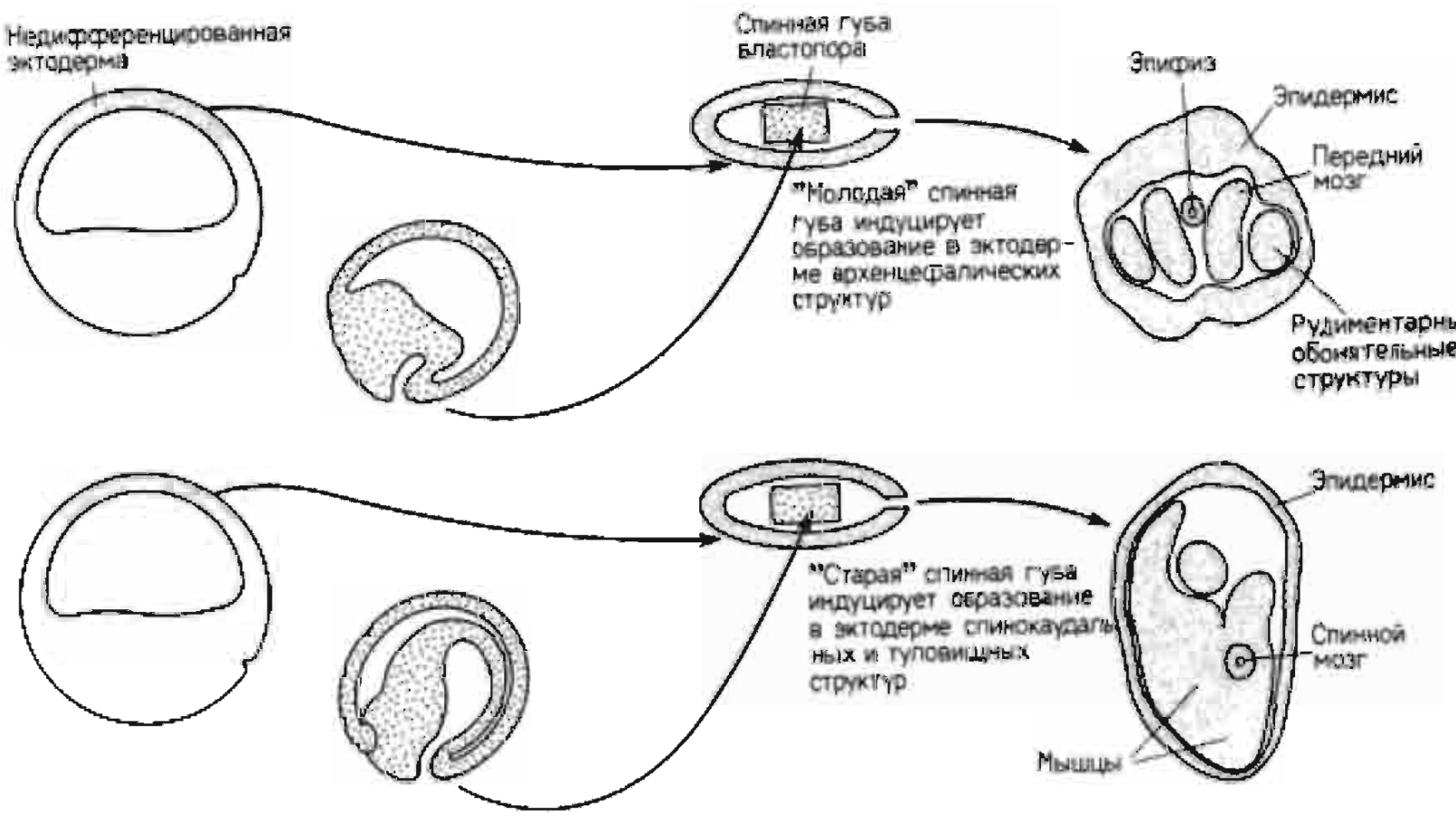


Рис. 8.17. Методика «сандвичей», разработанная Гольтфретером. Участки спинной губы бластопора, взятые на стадии ранней («молодые») и поздней («старые») гаструлы, помещены между двумя слоями эктодермы ранней гаструлы. Возраст спинной губы бластопора определяет специфичность индуцируемых структур.

(Mangold, 1933) в серии изящных экспериментов, в которых участки крыши архентерона, взятые на стадии ранней нейрулы тритона, имплантировали в бластоцель ранней гаструлы тритона (рис. 8.16). У зародышей, только что завершивших гаструляцию, после удаления нервной пластинки из лежащей под ней крыши первичной кишки были вырезаны четыре последовательных участка. Эти участки по отдельности имплантировали в бластоцель зародышам на стадии ранней гаструлы. Самая передняя часть крыши первичной кишки индуцировала образование балансёров и частей ротового аппарата (рис. 8.16, *А*); следующая за ней передняя часть индуцировала различные структуры головы, в том числе нос, глаза, балансёры и слуховые пузырьки (органы слуха) (рис. 8.16, *Б*). Третий участок индуцировал только слуховые пузырьки (рис. 8.16, *В*), а самый задний участок – дорсальную туловищную и хвостовую мезодерму (рис. 8.16, *Г*). (Индукция задним концом хорды дорсальной мезодермы, а не дорсальной эктодермы нервной системы была подтверждена Биджтелем (Bijtel, 1931) и Споффордом (Spofford, 1945), которые показали, что из задней 1/5 части нервной пластинки происходят хвостовые сомиты и задний отдел протока пронефроса.)

Продолжая изучение феномена индукции, Гольтфретер (Holtfreter, 1936) изготовил «сандвичи» из материала спинной губы бластопора, который поместил между двумя лоскутами недифференцированной эктодермы и культивировал их in vitro (рис. 8.17). Губа бластопора, взятая на стадии ранней гаструлы, индуцировала главным образом архенцефалические структуры, тогда как материал спинной губы бластопора, взятый на все более поздних стадиях, вызывал дифференцировку все более задних нейральных структур. Существует гипотеза, что региональная спецификация обусловлена действием двух веществ, секретируемых клетками хордомезодермы. Высокая концентрация одного из этих веществ обусловливает развитие переднего мозга, тогда как высокая концентрация другого индуцирует формирование спинного мозга и туловищных структур. Смесь этих двух веществ приводит к образованию среднего и заднего мозга.

Данные, подтверждающие эту модель, были получены в исследованиях с использованием искусственных тканеспецифических индукторов. Было обнаружено, например, что костный мозг морской свинки индуцирует образование только мезодермальных структур. Однако печень морской свинки может индуцировать развитие только структур переднего мозга. Тойвонен и Саксен (Toivonen, Saxén, 1955) имплантировали оба этих индуктора в бластоцель одного и того же зародыша на стадии ранней гаструлы. И если одна печень индуцировала только передний мозг, а костный мозг – только мезодерму, то оба вместе индуцировали нормальные передний, задний и спинной мозг и туловищную мезодерму. Таким образом, первичная нейральная индукция может также быть обусловлена двойным градиентом (рис. 8.18). В дальнейшем были получены данные, свидетельствующие о правильности модели двойного градиента: из экстракта куриного зародыша, способного индуцировать преимущественно структуры заднего мозга, выделили препараты, обладающие способностью индуцировать передний мозг и туловищные структуры (Tiedmann, 1967). Когда вещество, индуцирующее задний мозг,

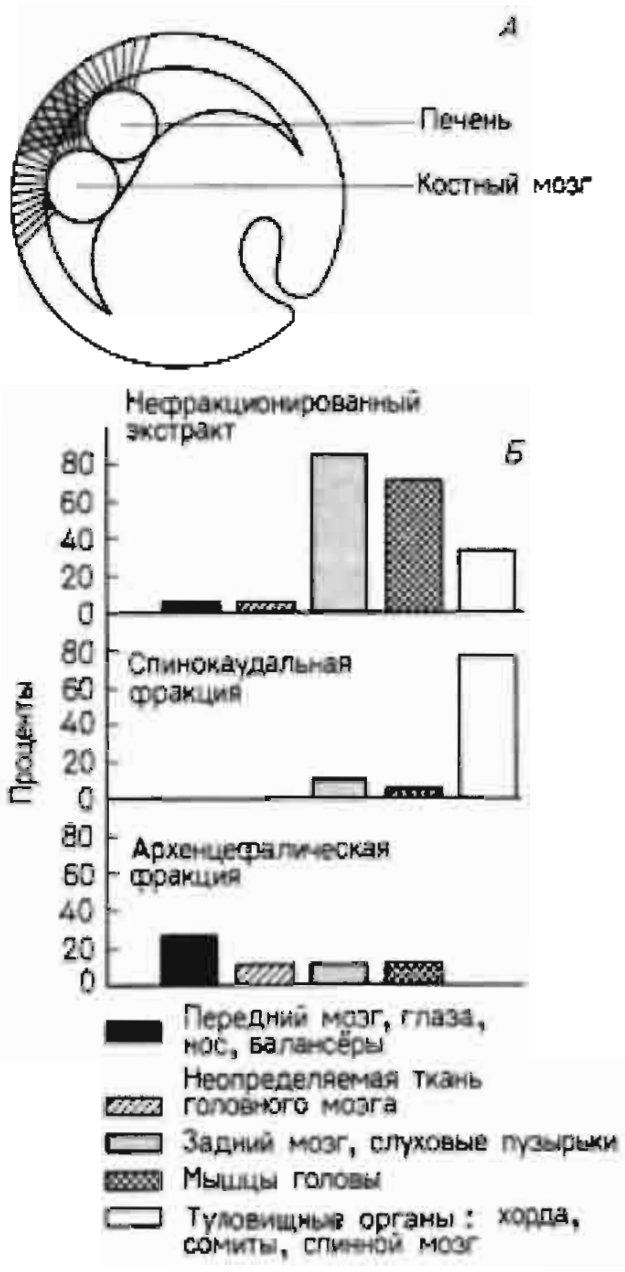


Рис. 8.18. Данные, свидетельствующие о существовании двойного градиента индукторов в крыше архентерона. *А*. Одновременная имплантация архенцефалического индуктора (печень морской свинки) и мезодермального индуктора (костный мозг морской свинки) в раннюю гаструлу тритона приводит к образованию всех отделов головного мозга и сомитов. *Б*. Разделение экстракта тканей куриного зародыша, обладающего свойствами дейтерэнцефалического индуктора на фракцию, индуцирующую архенцефалические структуры, и на фракцию со свойствами спинокаудального индуктора. (По Toivonen, Saxén, 1955; Tiedmann et al, 1963.)

фракционировали на колонке, получали два активных начала: одно – индуцировавшее мезодермальные структуры, и другое – индуцировавшее передний мозг (рис. 8.18, *Б*).

Механизмы первичной эмбриональной индукции

Первичная эмбриональная индукция включает в себя по крайней мере три основных процесса. Во-первых, это индукция вегетативными клетками специфических различий в мезодерме. Дорсальные вегетативные клетки индуцируют лежащие над ними дорсальные краевые клетки к образованию хорды и сомитов (как это описано в гл. 4), тогда как другие вегетативные клетки индуцируют вентральные краевые клетки к образованию других мезодермальных структур. Индуцирующая способность дорсальной мезодермы (хорды), по-видимому, активируется лежащими под ней клетками энтодермы, потому что пересадка дорсальных вегетативных клеток облученным ультрафиолетом зародышам предотвращает эффект облучения; без этих клеток у зародышей не формируются осевые структуры. Следовательно, существует индукция, предшествующая «первичной» эмбриональной индукции. Во-вторых, происходит индукция нейральных клеток инволюирующими хордомезодермальными клетками. Этот тип индукции обнаружили Шпеман и Г. Мангольд. В-третьих, индукция, ответственная за возникновение региональной специфичности в нервной трубке. Этот тип индукции был описан О. Мангольдом. Современные данные подтверждают, что из вегетативной энтодермы в клетки краевой зоны зародыша постепенно поступает индуктивная информация и что в полярности эктодермы отражается региональная специфичность хордомезодермы, которая индуцирована вегетативной энтодермой, подстилающей хордомезодерму.

Индукция мезодермальной специфичности энтодермой

Ньюкоп (Nieuwkoop, 1969, 1973, 1977) выявил значение вегетативной энтодермы для индукции. Удаляя экваториальные клетки у зародыша на стадии бластулы, он показал, что ни анимальная, ни вегетативная шапочки по отдельности не образуют мезодермальные ткани. Однако, когда эти две шапочки соединяли одну с другой, клетки анимальной шапочки оказывались индуцированными к образованию мезодермальных структур, таких, как хорда, мышцы, пронефросы и клетки крови. Кроме того, полярность этой индукции (будет ли область анимальных клеток формировать хорду или мышцы и т.п.) зависела от дорсовентральной полярности энтодермальной шапочки. В сходной серии опытов было показано (Nakamura, Takasaki, 1970), что эксплантаты из экваториальной области зародыша, взятые на стадии средней бластулы (участки, удаляемые в опытах Ньюкопа), были способны формировать мезодерму при культивировании in vitro. Эксплантаты из той же области, взятые на стадии 32 или 64 клеток, не могли формировать мезодермы и давали начало реснитчатым эктодермальным клеткам. Результаты этих опытов позволили предположить, что 1) клетки презумптивной мезодермы не детерминированы изначально, но достигают своего проспективного значения путем прогрессивного взаимодействия между анимальными и вегетативными клетками и 2) что клетки-предшественники экваториальных клеток становятся детерминированными к образованию мезодермы до начала гаструляции.

В середине восьмидесятых годов гипотеза нашла свое подтверждение и более глубокую трактовку в работах Гимлиха и Герхарта (Gimlich, Gerhart, 1984; см. также гл. 4). Когда лежащую наиболее дорсально вегетативную клетку зародыша шпорцевой лягушки, находящегося на стадии 64 клеток, пересаживали другому такому же зародышу, она индуцировала образование мезодермы. Сами эти вегетативные клетки формировали энтодермальные структуры, тогда как индуцированная мезодерма возникала из клеток хозяина. Можно видеть, что этот опыт (схему которого см. на рис. 4.20) аналогичен опыту Шпемана и Мангольд. Но если Шпеман и Мангольд получили две осевые структуры у хозяина, трансплантируя клетки дорсальной краевой зоны (ДКЗ), то Гимлих и Герхарт получили тот же результат, трансплантируя наиболее дорсальные *вегетативные* клетки, т.е. клетки, находящиеся ниже ДКЗ. Кроме того, Гимлих показал (Gimlich, 1985, 1986), что клетки презумптивной хордомезодермы у 32-клеточного зародыша (т.е. клетки дорсальной краевой зоны, но не их вентральные или латеральные экваториальные двойники) способны индуцировать образование осевых структур. Эти трансплантаты ДКЗ также индуцировали соседние клетки хозяина к формированию осевых структур, включая сомиты и клетки ЦНС (рис. 8.19). Отсюда, по-видимому, следует, что бластомеры дорсальной краевой зоны обладают частичной автономией и что их судьба детерминируется относительно рано (Gimlich, 1985, 1986)[1]. Частота, с которой эти *транс-*

[1] Описание «частичной автономии» указывает на частичный характер этого явления, поскольку полный хордомезодермальный фенотип не всегда продуцируется трансплантатами ДКЗ, взятыми со стадии 32 клеток. Так, например, даже если 92% хозяев имеют явные мезодермальные структуры, то только у 19% из них хордомезодерма образована тканями хозяина.

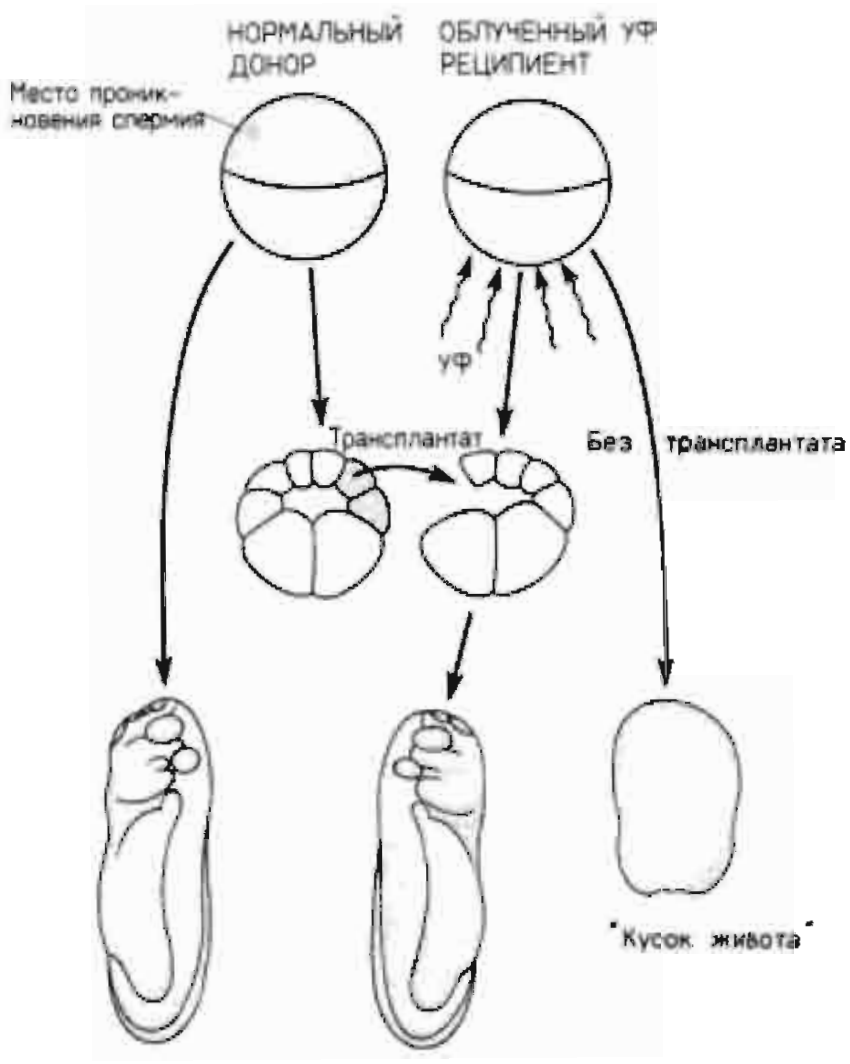


Рис. 8.19. Схематическое изображение результатов опытов по пересадке дорсальных краевых клеток от нормальных зародышей на стадии 32 бластомеров таким же зародышам, облученным УФ; без пересадки у облученных зародышей не происходит гаструляции, и из них формируются лишь «куски живота». Если облученным зародышам пересадить дорсальные краевые клетки, то они будут индуцировать формирование мезодермы, которая в свою очередь индуцирует образование осевых структур; в результате развивается нормальный головастик. (По Gimlich, 1986.)

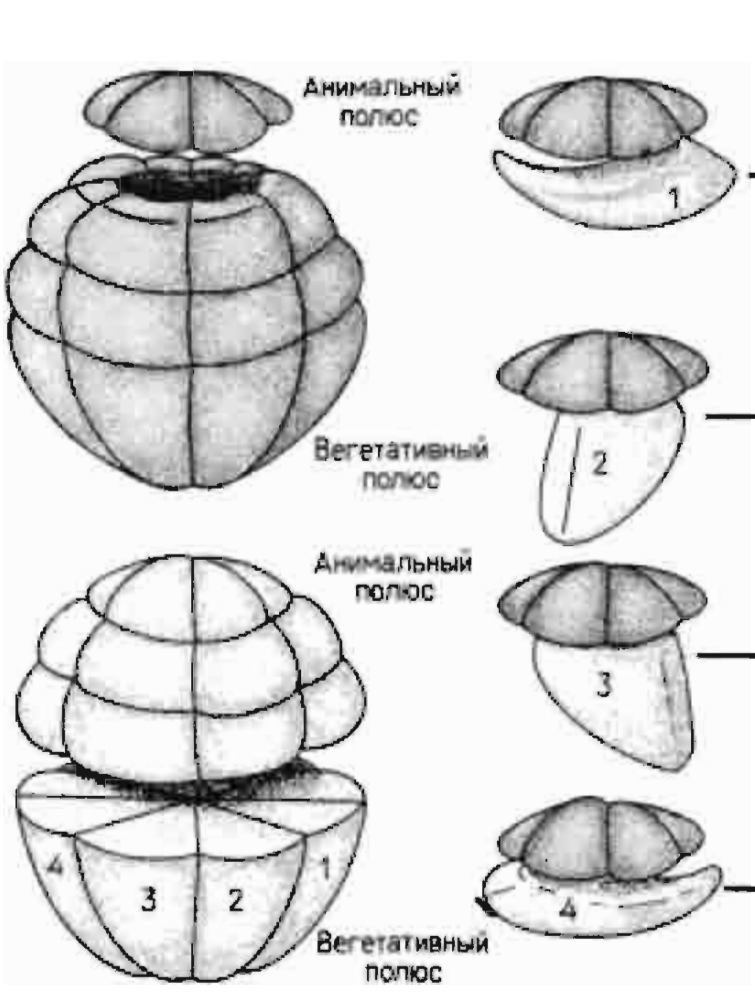
плантаты ДКЗ могут индуцировать образование полного набора осевых структур в облученных зародышах-хозяевах, вначале очень низкая и увеличивается с возрастом зародышей-доноров. Напротив, способность дорсальных *вегетативных* клеток индуцировать мезодерму в течение этого периода снижается (Gimlich, 1985; Boterenbrood, Nieuwkoop, 1973). По-видимому, клетки дорсального вегетативного квадранта каким-то образом активируют (или продуцируют) факторы в клетках ДКЗ и окончательный фенотип «индуктивной мезодермы» развивается постепенно по мере того, как вегетативные клетки оказывают влияние на клетки краевой зоны, лежащие над ними.

Вентральные и боковые вегетативные клетки также играют определенную роль в спецификации мезодермы. Если наиболее дорсальные вегетативные клетки специфицируют осевые компоненты мезодермы (хорду и сомиты), то остальные вегетативные клетки детерминируют промежуточные (мышцы, мезенхима) и вентральные (мезенхима, кровь, пронефросы) мезодермальные структуры. Об этом свидетельствуют опыты по рекомбинации, результаты которых представлены в форме иллюстрированной таблицы на рис. 8.20 (Dale, Slack, 1987). Четыре вегетативных бластомера, взятых у 32-клеточного зародыша *Xenopus*, по отдельности соединяли с самым верхним ярусом клеток, взятым у меченного флуоресцеином зародыша ранней стадии. Как и ожидалось, наиболее дорсальная вегетативная клетка индуцировала в клетках анимального полюса образование дорсальных мезодермальных структур. Остальные вегетативные клетки обычно индуцировали в анимальных клетках образование либо промежуточных, либо вентральных мезодермальных структур. Эти опыты свидетельствуют о наличии двух четко различающихся индукционных процессов (один – в наиболее дорсальных вегетативных клетках, индуцирующих дорсальные краевые клетки, и другой – в остальных вегетативных клетках, индуцирующих промежуточную и вентральную мезодерму). Однако они не объясняют, чем процесс индукции промежуточных мезодермальных структур отличается от процесса индукции вентральных мезодермальных структур. Кроме того, данные этих авторов не вполне соответствуют карте презумптивных зачатков зародыша *Xenopus*, согласно которой бо́льшая часть промежуточных мезодермальных тканей происходит из вентральных краевых клеток.

Дейл и Слэк (Dale, Slack, 1987) считают, что такое несоответствие можно объяснить действием третьего индуктивного сигнала, исходящего от дорсальных краевых клеток, который «дорсализирует» прилежащие к ним краевые клетки. Изолированные вентральные краевые клетки способны образовать в основном вентральные мезодермальные структуры. Если же эти клетки культивируют вместе с дорсальными краевыми клетками, то они образуют промежуточную мезодермальную ткань. Таким образом, имеются данные о трехступенчатой спецификации мезодермы (рис. 8.21): 1) индукция дорсальной мезодермы наиболее дорсальными вегетативными клетками; 2) индукция вентральной мезодермы другими вегетативными клетками; 3) дорсализация вентральных краевых клеток, прилежащих к дорсальным краевым клеткам, приводящая к образованию промежуточной мезодермы.

Влияние индукции на активность генов

Согласно приведенной выше модели, эктодерма и энтодерма специфицируются как таковые автономно. Лишь мезодерма приобретает свой статус путем индукции. Эта модель появилась на свет



Количество индукций, %		
дорсальных	промежуточных	вентральных
77	23	0
11	61	28
5	45	50
16	42	42

Рис. 8.20. Региональная специфичность индукции мезодермы, выявляемая рекомбинацией клеток 32-клеточного зародыша *Xenopus*. Клетки анимального полюса комбинировали с изолированными вегетативными бластомерами, взятыми по отдельности. Для идентификации клеток анимального полюса их метили флуоресцеином. Данные о специфичности индуцированных структур, возникших при таких рекомбинациях, суммированы справа. (По Dale, Slack, 1987.)

благодаря недавним исследованиям, в которых удалось идентифицировать клеточные РНК (такие методики будут изложены подробнее в гл. 10). Сарджент и др. (Sargent et al., 1986) диссоциировали ранние бластулы шпорцевой лягушки (от 32- до 128-клеточной стадии) на составляющие их клетки, удаляя оболочку оплодотворения и помещая зародышей в культуральную среду, не содержащую ионов Ca и Mg. Они решили выяснить, будут ли эти диспергированные клетки по прошествии соответствующего времени синтезировать мРНК, специфичные для данного зародышевого листка. Результаты исследований показали, что гены, специфичные для энтодермы (для синтеза специфического белка кишечника) и для эктодермы (для синтеза определенного белка цитоскелета), активируются и с них транскрибируются новые мРНК даже в диспергированных клетках. Это открытие позволило предположить, что клетки энтодермы регулируются автономно содержащимися в них цитоплазматическими факторами. Однако гены, специфические для мезодермы (гены α-актина), не активируются в изолированных клетках. Когда зародышей диссоциировали даже на 128-клеточной стадии, в потомках диссоциированных клеток не удалось обнаружить мРНК α-актина. Но этот ген можно было активировать, если клеткам давали возможность формировать скопления и таким образом взаимодействовать между собой. Отсюда следует, что экспрессия генов мезодермы требует, по-видимому, взаимодействия по меньшей мере двух типов клеток.

Наблюдения Ньюкопа были также подтверждены Гёрдоном и др. (Gurdon et al., 1985). Если морфологические исследования Ньюкопа правильны, то вегетативные клетки, помещенные непосредственно под клетки анимального полушария (которые в норме дают эктодермальные ткани), должны индуцировать в них активность α-актинового гена. У зародыша на стадии средней бластулы Гёрдон и его коллеги отрезали клетки краевой зоны и рекомбинировали клетки анимального полюса с массой вегетативных клеток (рис. 8.22). Они обнаружили, что в клетках анимального полюса началась транскрипция специфичной для мезодермы мРНК α-актина. Вегетативные клетки индуцировали включение специфического для мезодермы гена в презумптивной эктодермальной ткани. Одновременно эти взаимодействия вызывали утрату специфической активности эктодермальных генов (Sargent et al., 1986).

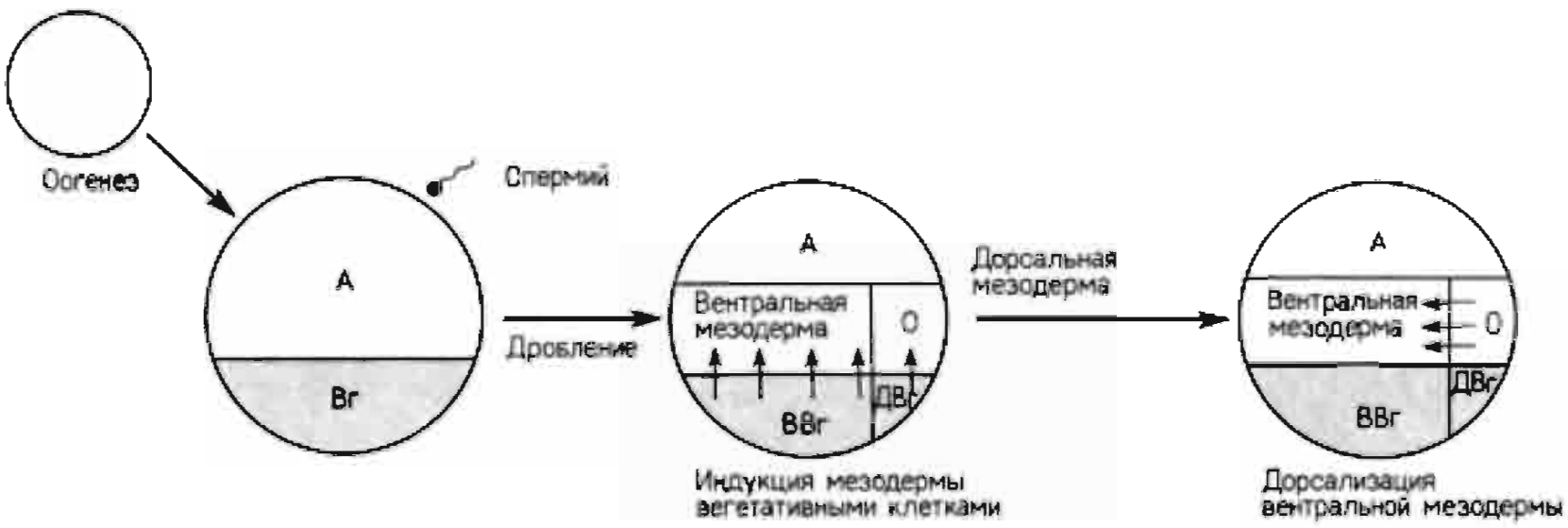


Рис. 8.21. Схема, иллюстрирующая индукционные взаимодействия в раннем развитии *Xenopus*. В период оогенеза возникает анимально-вегетативная полярность. После оплодотворения происходит перераспределение цитоплазмы, которое подразделяет вегетативную область на дорсо-вегетативную (ДВг) и вентро-вегетативную (ВВг) области. В период дробления осуществляется индукция мезодермы: ДВг-область индуцирует в лежащих над ней дорсальных краевых клетках активность организатора (О), тогда как ВВг-область индуцирует осевую мезодерму (М). Полярность этой мезодермы (М1, М2, М3, М4) является отражением полярности подстилающих ее вентральных клеток. В период гаструляции вентральная и боковая мезодерма перемещаются по сторонам зародыша (на рисунке не показаны), а дорсальная мезодерма распространяется (О1, О2, О3, О4) и индуцирует лежащие над ней эктодермальные клетки. Эта индукция побуждает эктодермальные клетки к превращению в нейральные клетки (Н1, Н2, Н3, Н4). Таким образом, полярность энтодермы передается нейральной ткани. Неиндуцированная эктодерма (А) становится эпидермисом (Э). (По Smith et al., 1985.)

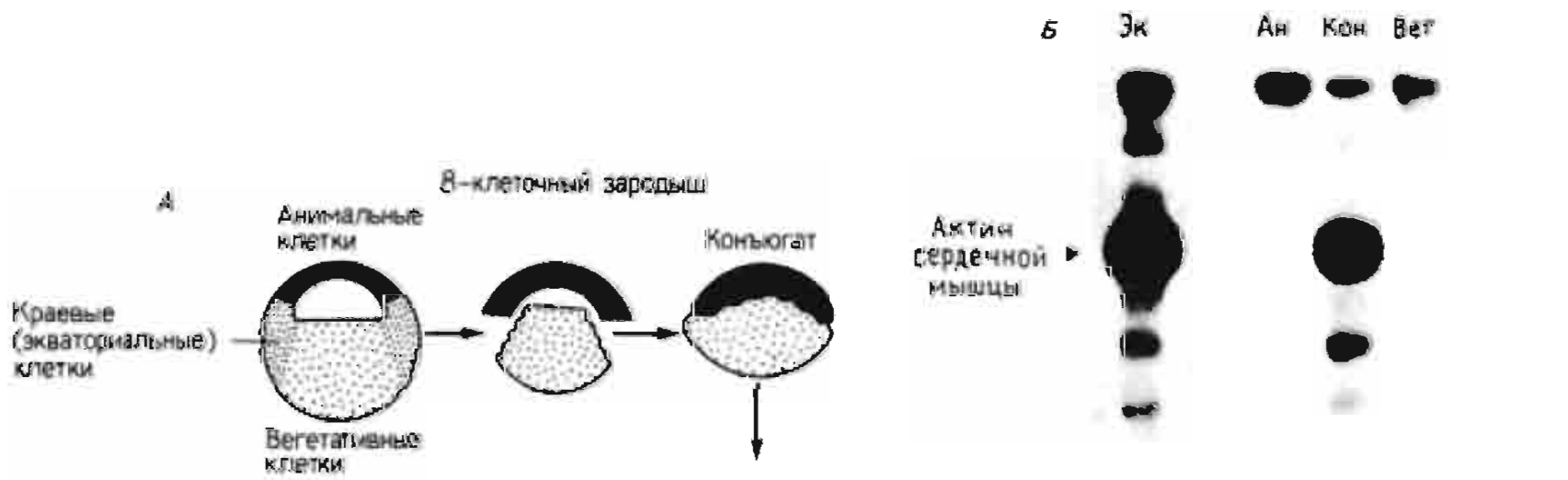


Рис. 8.22. Опыты анимально-вегетативной рекомбинации. *А*. У зародышей на стадии 8 бластомеров удаляли краевые (экваториальные) клетки и приводили в контакт анимальные и вегетативные клетки. *Б*. Специфический для мышц актин был обнаружен в краевой (экваториальной) области и в рекомбинированных анимальных и вегетативных клетках, но не в анимальных и вегетативных клетках, культивируемых по отдельности. Помимо этого меченный радиоактивной меткой фрагмент специфичного для мышц актинового гена гибридизировали с мРНК этого гена (если она присутствовала). Затем добавляли нуклеазу, которая должна была разрушить любую одноцепочную ДНК, но оставить ДНК – РНК-гибриды. Полученные ДНК – РНК-гибриды были подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле и определены с помощью радиоавтографии. Радиоактивный фрагмент гена был защищен от переваривания только в тех случаях, когда присутствовала специфичная для мышц актиновая мРНК. (По Gurdon et al., 1985; фотография с любезного разрешения J. Gurdon.)

Поиски индукторов мезодермы

Предполагается, как это следует из рис. 8.21, что в индукции мезодермы участвуют три фактора (или три комплекса факторов). Два фактора (исходящие из дорсальных вегетативных клеток и из вентральных вегетативных клеток) индуцируют формирование кольца мезодермы, содержащего область организатора (т.е. клеток, лежащих над дорсальными вегетативными клетками). Организатор затем синтезирует другой фактор, регионально индуцирующий специфические мезодермальные структуры (такие, как хорда и сомиты, лежащие на дорсальной стороне, и клетки крови, локализующиеся на периферии). Эти факторы еще не идентифицированы, однако результаты недавних исследований показали, что они могут быть идентичными или очень сходными с **факторами роста**, которые известны как регуляторы пролиферации клеток у млекопитающих (и которые будут обсуждаться в гл. 20). Фактор, вырабатываемый вентральными вегетативными клетками, по-видимому, сходен с **фактором роста фибробластов** (ФРФ). Сравнительно недавно было показано (Slack et al., 1987), что клетки анимального полушария зародышей шпорцевой лягушки на стадии средней бластулы (1024–2048 клеток), подвергнутые воздействию ФРФ в слабых концентрациях, формируют мезодермальные ткани, такие, как клетки крови и мезенхиму. Кроме того, подобно ФРФ, естественный мезодермальный индуктор специфически связывается с полисахаридом гепарином. (Об этом свидетельствует тот факт, что гепарин подавляет индукцию мезодермы в клетках анимального полушария, когда эти клетки культивируют вместе с вегетативными клетками.) Затем было обнаружено (Kimelman, Kirschner, 1987), что инкубация клеток *Xenopus*, взятых из области анимального полюса, в присутствии ФРФ приводит к транскрипции специфических для мезодермы актиновых генов. Таким образом, представляется вероятным, что у зародышей лягушек какой-то белок, очень сходный с ФРФ, ответствен за индукцию вентральной мезодермы.

Фактор, ответственный за образование дорсальной мезодермы (хорды и осевой мускулатуры), по-видимому, представляет собой белок с молекулярной массой 16 000 дальтон, который секретируется клоном клеток линии XTC из головастиков *Xenopus* (Smith, 1987). Когда клетки анимального полушария зародышей *Xenopus* на стадии средней бластулы помещали в среду, в которой росли клетки линии XTC (и секретировали в нее белки), то клетки *Xenopus* давали начало хорде и мышцам (но из них не возникали клетки крови и лишь изредка развивались почки) (рис. 8.23). Один из факторов, секретируемых клетками XTC, возможно, аналогичен трансформирующему фактору роста β2 (ТФР-β2). Во-первых, продукты, секретируемые клетками XTC в опытах с количественным анализом роста, способны действовать подобно ТФР-β2. Во-вторых, один ТФР-β2 оказался мощным активатором специфичного для мезодермы α-актинового гена в клетках анимальной шапочки. В-третьих, антитела к ТФР-β2 блокировали 80% индукций мезодермальных структур в клетках анимальной шапочки, помещенных в кондиционированную XTC среду (Rosa et al., 1988).

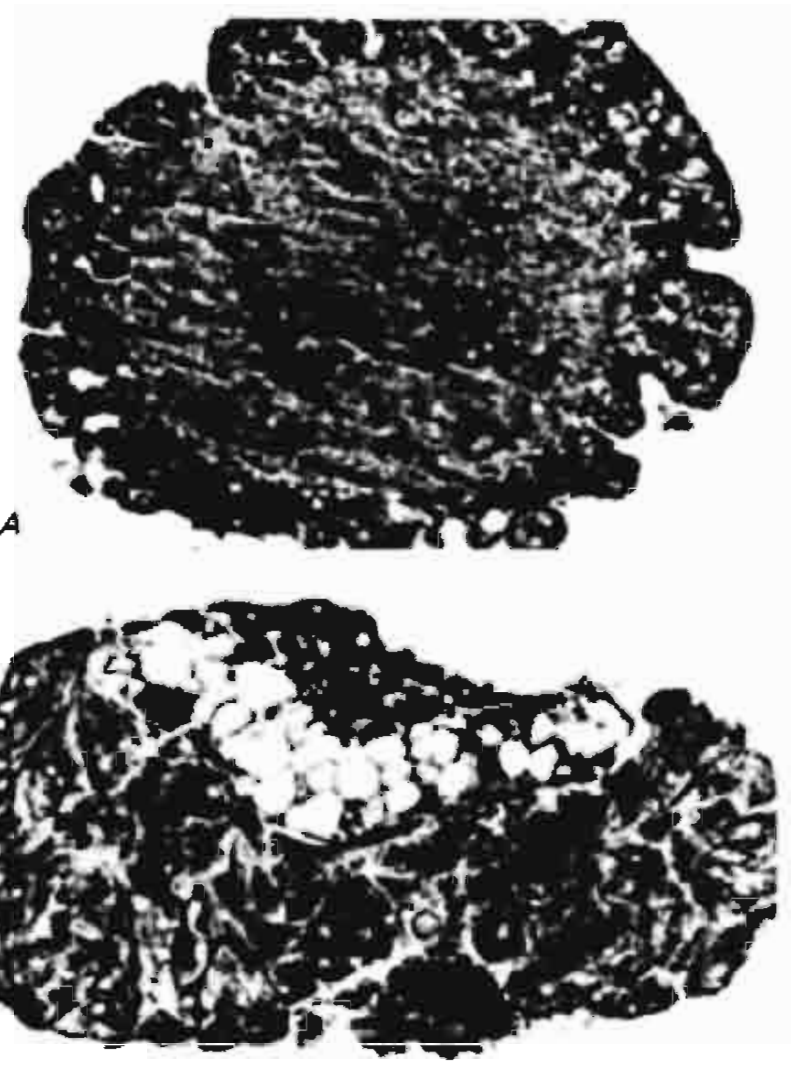


Рис. 8.23. Влияние «мезодермализующего фактора» на клетки анимального полюса зародыша *Xenopus*. *А*. Срез через участок ткани из клеток анимального полюса, взятых на стадии бластулы и культивировавшихся в течение 3 сут. Сформировался «атипичный эпидермис». *Б*. Срез через ткань из клеток анимального полюса, инкубировавшихся в присутствии дорсального мезодермализующего фактора. Можно идентифицировать хорду и мышцы. (Из Smith et al., 1985.)

Этот ТФР-β2-подобный фактор, вероятно, является продуктом гена *Vg1*, мРНК которого локализована в вегетативной части яйца *Xenopus* (см. рис. 7.9). В развивающемся зародыше эта мРНК обнаруживается исключительно в энтодерме. Белок, который кодирует эта мРНК, напоминает белок ТФР и секретируется вегетативными клетками (Weeks, Melton, 1987). Возможно, что взаимодей-

ствия между этими ФРФ-подобными и ТФР-β2-подобными факторами ответственны за генерирование региональной специфичности мезодермальных индукторов. ФРФ усиливает способность ТФР-β2 к индукции мезодермы, а смесь ТФР-β-факторов, по-видимому, усиливает способность ФРФ к индукции мезодермы (Kimelman, Kirschner, 1987; Rosa et al., 1988).

Не исключено, что дорсализирующий фактор (или факторы) присутствует во всех вегетативных клетках, но только в вегетативных клетках, занимающих наиболее дорсальное положение, он может экспрессироваться. Было обнаружено (Kao et al., 1986), что микроинъекция ионов лития в клетки любого вегетативного слоя, облученного ультрафиолетом 32-клеточного зародыша, приводит к образованию из него нормальной личинки с дорсовентральной полярностью. Инъекция лития в любую вентральную вегетативную клетку *необлученного* 32-клеточного зародыша приводит к возникновению головастика с двумя головами. По-видимому, все вегетативные клетки могут обладать потенциальной «дорсализирующей информацией», но для ее реализации необходима некоторая активация этого материала.

Нейральный индуктор как молекула, способная к диффузии

Перейдем теперь к стадии, на которой хордомезодерма индуцирует образование нервной трубки (т. е. к тому, что Шпеман называл первичной индукцией). Хотя Шпеман считал поиски молекулы-организатора, мягко говоря, глупостью, его ученики упорно стремились вперед. Они пришли к выводу, что идентификация активного индуктора является нелегкой задачей. Проблема заключалась в отсутствии специфичности: оказалось, что огромное число самых разных веществ могут индуцировать нервную пластинку. Среди веществ были терпентин, формальдегид и краситель метиленовый синий, а также фиксированный материал спинной губы и широкой ассортимент тканей взрослых организмов, относящихся к разным типам животных. Основываясь на таком эклектическом характере индукции, Гольтфретер (Holtfreter, 1948) предположил, что реальный индуктор может содержаться в самой эктодерме и высвобождаться из нее с помощью слабого цитолиза. Достаточным было любое воздействие, вызывающее такое сублетальное повреждение, например помещение эктодермы в слабощелочную или гипертоническую среду. Впоследствии эта гипотеза была изменена некоторыми авторами (Barth, Barth, 1969), предположившими, что различные вещества действуют, высвобождая из клеток эктодермы ионы натрия, находящиеся в них в связанном состоянии. Молекула индуктора не выделена до сих пор, хотя получены данные, свидетельствующие о том, что нейрализующий фактор в маскированной форме содержится в рибонуклеопротеидных частицах эктодермальных клеток (John et al., 1984).

Какое бы вещество ни было ответственным за индукцию, для нее не требуется физический контакт между эктодермой и хордомезодермой. Ниу и Твитти (Niu, Twitty, 1953) было показано, что фактор, вызывающий индукцию, способен к диффузии. Эти авторы культивировали губу бластопора или хордомезодерму в течение недели in vitro. Когда они удалили индуктор и поместили в такую кондиционированную среду эктодерму зародыша, она дифференцировалась в нейральные, пигментные и мезодермальные клетки. Преобладание того или иного типа клеток зависело от возраста индуктора. Хордомезодерма более ранних зародышей-доноров вызывала в большинстве случаев дифференцировку нейральных и пигментных клеток. В культуральной среде, не кондиционированной тканями индуктора, не наблюдалось ни нейральной, ни мезодермальной дифференцировки эктодермальных клеток. Следовательно, для осуществления индукции не нужен физический контакт между индуктором и реагирующей тканью. Сходные данные получил Тойвонен (Toivonen, 1979), поместив спинную губу бластопора и эктодермальную ткань на противоположные стороны мембранного фильтра с диаметром пор 0,5 мкм. И хотя в порах мембраны не было обнаружено отростков клеток, индукция имела место. Таким образом, подтвердились данные о том, что индукция может происходить без контакта между клетками.

Все еще ведутся споры относительно компонентов и механизма первичной эмбриональной индукции, одной из старейших проблем биологии развития. В одном обзоре, написанном в 1985 г. (Smith et al., 1985), авторы признаются: «Нельзя не согласиться с тем, что мы в самом деле ничего не знаем о биохимических основах индукционных взаимодействий». Обсуждая эту проблему в 1927 г., Шпеман заметил: «То, что достигнуто,– это лишь первый шаг. Мы стоим перед загадками, но не без надежды решить их. А загадки с надеждой на их решение– чего еще больше может желать ученый?» Брошенный Шпеманом вызов все еще остается в силе.

Компетенция и вторичная индукция

Каждая система эмбриональной индукции состоит по меньшей мере из двух компонентов: из ткани, способной синтезировать индуцирующие

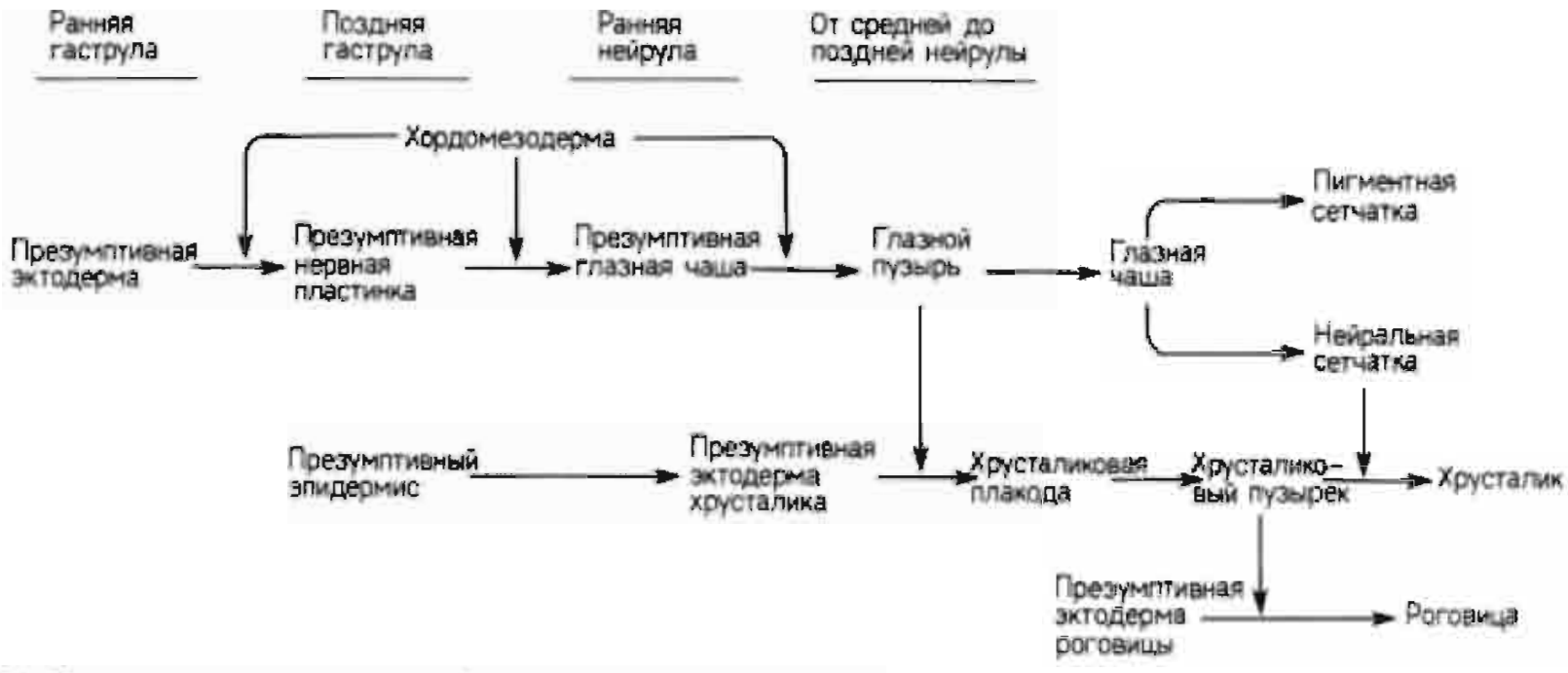


Рис. 8.24. Каскад вторичных индукций в процессе развития глаза.

стимулы, и ткани, способной воспринимать эти стимулы и реагировать на них. До сих пор мы рассматривали специфичность стимулов; теперь мы обратимся к специфичности реагирующих клеток. Способность отвечать специфическим образом на данный стимул называется **компетенцией.** Мы уже видели, что на стадии ранней гаструлы имплантированная спинная губа бластопора может индуцировать нервную пластинку и осевые структуры почти в любом месте зародыша, где имеется эктодерма. Однако с возрастом эктодерма зародыша теряет способность реагировать на воздействие, и имплантация спинной губы бластопора под презумптивный эпидермис на стадии нейрулы не приводит к формированию у зародыша новой нервной пластинки.

Итак, эктодермальный эпителий поздней нейрулы более не компетентен реагировать на воздействие хордомезодермы, однако он становится компетентным к реакции на новые индукторы. Например, на контакт с глазным пузырем (происходящим из переднего мозга) он отвечает образованием хрусталика. Сходным образом задний мозг может индуцировать в прилегающей к нему области эпителия образование слуховых пузырьков. Следовательно, эктодермальный эпителий приобрел способность отвечать на стимулы, получаемые от **вторичных индукторов.**

Будет полезно рассмотреть здесь одну из схем этих вторичных индукций. (Такие индукции представляют собой наиболее важные события в развитии и будут подробно обсуждаться в гл. 16.) Если бы Шпеман никогда не выполнил описанных выше опытов, открывших явление первичной эмбриональной индукции, ему все равно была бы обеспечена слава благодаря проведенному им анализу тканевых взаимодействий в развитии глаза. Эти вторичные индукции иллюстрирует рис. 8.24. Формирование хрусталика, как уже упоминалось, начинается, когда выпячивание переднего мозга (глазной пузырь) на стадиях от средней до поздней нейрулы вступает в контакт с лежащим над ним эпителием. В результате такого контакта передняя стенка глазного пузыря инвагинирует, образуя двуслойную нейральную структуру – глазную чашу. Глазной пузырь ответствен за индукцию хрусталиковой плакоды в лежащем над ним эпителии. Если между глазным пузырем и лежащим над ним эпителием поместить какую-либо преграду, то хрусталиковая плакода не формируется. Глазная чаша дифференцируется на пигментную и нейральную части сетчатки (ретины). Хрусталиковый пузырек представляет собой и индуцирующую, и реагирующую ткань. Он индуцирует в новом лежащем над ним эпителии образование роговицы, и вместе с тем он отвечает на индуцирующие стимулы нейральной сетчатки, дифференцируясь в дефинитивный хрусталик.

Таким образом, и при первичных, и при вторичных индукциях происходит прогрессивное ограничение потенций эктодермальных клеток. При первичных индукционных взаимодействиях изменения происходят в период гаструляции; при вторичных индукционных взаимодействиях детерминация наступает позже. И в этих случаях мы снова видим, что детерминация зависит от взаимодействия между группами клеток.

В этой и в предыдущей главах мы обсуждали механизмы детерминации эмбриональных клеток. Мы видели, что имеются два главных способа, с помощью которых осуществляется детерминация. Первый способ состоит в распределении морфогенетических детерминантов по специфическим клеткам и последующей детерминации этих клеток в зависимости от того, какая область цитоплазмы

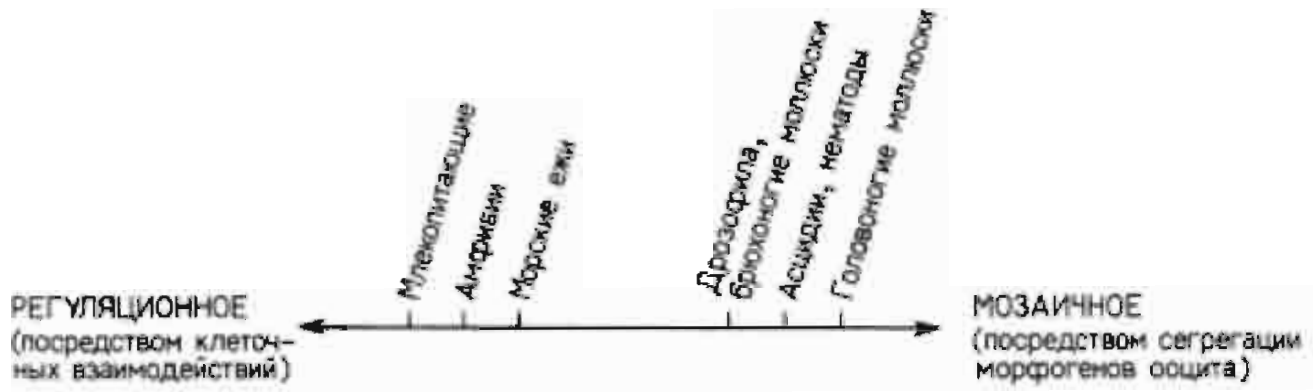


Рис. 8.25. Непрерывность ряда от зародышей с резко выраженной мозаичностью развития (моллюски, нематоды) до зародышей, характеризующихся преимущественно регуляционным типом развития (млекопитающие, амфибии). У всех животных в той или иной степени используются оба механизма. (По диаграмме D. Kirk, личное сообщение.)

зиготы включена в них. Каждая такая клетка будет дифференцироваться автономно, независимо от окружающих ее клеток. Организмы, в развитии которых превалирует этот способ детерминации, следуют по пути мозаичного развития. Второй способ детерминации включает в себя взаимодействие клеток на более поздних стадиях развития. Клетки развиваются соответственно своему положению в зародыше. Зародыши, чьи клетки первоначально детерминируются таким способом, следуют по регуляционному типу развития. Так, любая клетка в наиболее анимальном слое раннего зародыша морского ежа будет в норме давать эктодермальное потомство, но если ее комбинировать с микромерами, то она может образовать ткань кишки, что характерно для энтодермы.

Очень важно помнить о том, что оба механизма используются в развитии любого конкретного организма и что имеется непрерывный ряд между мозаичным и регуляционным типами развития (рис. 8.25). У животных с мозаичным типом развития, таких, как оболочники и улитки, некоторые ткани образуются в результате регуляционных взаимодействий, а у животных с регуляционным типом развития, таких, как лягушки, имеются области цитоплазмы, содержащие морфогенетические детерминанты (например, полярные гранулы). Следует подчеркнуть, что как мозаичный, так и регуляционный способы детерминации могут быть прослежены в обратном направлении до гетерогенно расположенных материалов в цитоплазме зиготы. Механизмы, которые обусловливают локализацию в цитоплазме определенных клеток особых молекул, влияющих на экспрессию генов, до сих пор неизвестны.

ЛИТЕРАТУРА

Barth L. G., Barth L. J. (1969). The sodium dependence of embryonic induction. Dev. Biol. **20**, 236–262.

Bijtel J. H. (1931). Über die Entwicklung der Schwanzes bei Amphibien. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **125**, 448–486.

Bonnet C. (1764). Contemplation de la Nature. Marc-Michel Ray, Amsterdam.

Boterenbrood E. C., Nieuwkoop P. D. (1973). The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. V. Its regional induction by the endoderm. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **173**, 319–332.

Brenner S. (1979). Cited in H. F. Judson (1979). The Eighth Day of Creation. Simon and Schuster, New York, p. 219.

Cassirer E. (1950). Developmental mechanics and the problem of cause in biology. In E. Cassirer (ed.), The Problem of Knowledge. Yale University Press, New Haven.

Czihak G. (1971). Echinoids. In: G. Reverberi (ed.), Experimental Embryology of Marine and Freshwater Invertebrates. Elsevier North-Holland, Amsterdam, pp. 363–506.

Dale L., Slack J. M. W. (1987). Regional specificity within the mesoderm of early embryos of *Xenopus laevis*. Development **100**, 279–295.

Driesch H. (1892). The potency of the first two cleavage cells in echinoderm development. Experimental production of partial and double formations. In: B. H. Willer and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York.

Driesch H. (1893). Zur Verlagerung der Blastomeren des Echinideneies. Anat. Anz. **8**, 348–357.

Driesch H. (1894). Analytische Theorie de organischen Entwicklung. W. Engelmann, Leipzig.

Gimlich R. L. (1985). Cytoplasmic localization and chordamesoderm induction in the frog embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. **89** [Suppl.], 89–111.

Gimlich R. L. (1986). Acquisition of developmental autonomy in the equatorial region of the *Xenopus* embryo. Dev. Biol. **116**, 340–352.

Gimlich R. L., Cook J. (1983). Cell lineage and the induction of nervous systems in amphibian development. Nature **306**, 471–473.

Gimlich R. L., Gerhart J. C. (1984). Early cellular interactions promote embryonic axis formation in *Xenopus laevis*. Dev. Biol. **104**, 117–130.

Gould S. J. (1977). Ontogeny and Phylogeny. Belknap Press, Cambridge, MA.

Gurdon J. B., Fairman S., Mohun T. J., Brennan S. (1985b). The activation of muscle-specific actin genes in *Xenopus* development by an induction between animal and vegetal cells of a blastula. Cell **41**, 913–922.

Hagstrom B. E., Lonning S. (1965). Studies in cleavage and development of isolated sea urchin blastomeres. Sarsia **18**, 1–9.

Hamburger V. (1984). Hilde Mangold, co-discoverer of the organizer. J. Hist. Biol. **17**, 1–11.

Holtfreter J. (1936). Regional induktionen in Xenoplastisch zusammengesetzten explantaten. Wilhelm Rous Arch. Entwicklungsmech. Org. **134**, 466–561.

Holtfreter J. (1948). Concepts on the mechanism of embryonic

induction and its relation to parthenogenesis and malignancy. Symp. Soc. Exp. Biol. **2**, 17–48.
Hörstadius S. (1928). Über die Determination des Keimes bei Echinodermen. Acta Zool. **9**, 1–191.
Hörstadius S. (1935). Über die Determination im Verlaufe der Eiasche bei Seeigeln. Pubbl. Stn. Zool. Napoli **14**, 251–479.
Hörstadius S. (1939). The mechanics of sea urchin development studied by operative methods. Biol. Rev. **14**, 132–179.
Hörstadius S., Wolsky A. (1936). Studien über die Determination der Bilateralsymmetrie des jungen Seeigelkeimes. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **135**, 69–113.
Huxley J. S., deBeer G. R. (1934). Elements of Experimental Embryology. Cambridge University Press, Cambridge.
John M., Born J., Tiedemann He. and *Tiedemann Hi.* (1984). Activation of a neuralizing factor in amphibian ectoderm. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **193**, 13–18.
Jukes T. (1966). Molecules and Evolution. Columbia University Press, New York.
Kao K. R., Masui Y., Elinson R. P. (1986). Lithium-induced respecification of pattern in *Xenopus laevis* embryos. Nature **322**, 371–373.
Kimelman D., Kirschner M. (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-β and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. Cell **51**, 869–877.
Kölreuter J. G. (1761–1766). Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen, nebst Fortsetzungen 1, 2, und 3. Leipzig.
Lenoir T. (1980). Kant, Blumenbach, and vital materialism in German biology. Isis **71**, 77–108.
Mangold O. (1933). Über die Induktionsfahigkeit der verschiedenen Bezirke der Neurula von Urodelen. Naturwissenschaften **21**, 761–766.
McClendon J. F. (1910). The development of isolated blastomeres of the frog's egg. Am. J. Anat. **10**, 425–430.
Morgan T. H. (1895). Studies on the "partial" larvae of *Sphaerechinus*. Wilhelm Rous Arch. Entwicklungsmech. Org. **2**, 81–126.
Nakamura O., Takasaki H. (1970). Further studies on the differentiation capacity of the dorsal marginal zone in the morula of *Triturus pyrrhogaster*. Proc. Japan Acad. **46**, 700–705.
Nieuwkoop P. D. (1969). The formation of the mesoderm in urodele amphibians. I. Induction by the endoderm. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **162**, 341–373.
Nieuwkoop P. D. (1973). The "organisation center" of the amphibian embryo: Its origin, spatial organisation and morphogenetic action. Adv. Morphog. **10**, 1–39.
Nieuwkoop P. D. (1977). Origin and establishment of embryonic polar axes in amphibian development. Curr. Top. Dev. Biol. **11**, 115–132.
Niu M. C., Twitty V. C. (1953). The differentiation of gastrula ectoderm in medium conditioned by axial mesoderm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **39**, 985–989.
Okazaki K. (1975). Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo. Am. Zool. **15**, 567–581.
Recanzone G., Harris W. A. (1985). Demonstration of neural induction using nuclear markers in *Xenopus*. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **194**, 344–354.
Rosa F., Roberts A. B., Daneilpour D., Dart L. L., Sporn M. B., Dawid I. B. (1988). Mesoderm induction in amphibians: The role of TGF-β2-like factors. Science **239**, 783–785.
Roux W. (1888). Contributions to the developmental mechanics of the embryo. On the artificial production of half-embryos by destruction of one of the first two blastomeres and the later development (postgeneration) of the missing half of the body. In: B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, pp. 2–37.
Runnstrom J. (1929). Über Selbstdifferenzierun und Induktion bei dem Seeigelkeim. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **117**, 123–145.
Sargent T. D., Jamrich M., Dawid I. (1986). Cell interactions and the control of gene activity during early development of *Xenopus laevis*. Dev. Biol. **114**, 238–246.
Saxén L., Toivonen S. (1962). Embryonic Induction. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
Slack J. M. W., Darlington B. G., Heath J. K., Godsave S. F. (1987). Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factor. Nature **326**, 197–200.
Smith J. C. (1987). A mesoderm-inducing factor is produced from a *Xenopus* cell line. Development **99**, 3–14.
Smith J. C., Dale L., Slack J. M. W. (1985). Cell lineage labels and region-specific markers in the analysis of inductive interactions. J. Embryol. Exp. Morphol. **89** [Suppl.], 317–331.
Spemann H. (1918). Über die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **43**, 448–555.
Spemann H. (1938). Embryonic Development and Induction. Yale University Press, New Haven.
Spemann H., Mangold H. (1924). Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. In: B. H. Willier and J. M. Oppenheimer (eds.), Foundations of Experimental Embryology. Hafner, New York, pp. 144–184.
Spofford W. R. (1945). Observations on the posterior part of the neural plate in *Amblystoma*. J. Exp. Zool. **99**, 35–52.
Thomson J. A. (1907). Heredity. Putnam, New York.
Tiedmann H. (1967). Biochemical aspect of primary induction and determination. In: R. Weber (ed.), The Biochemistry of Animal Development, Vol. 2. Academic, New York, pp. 3–55.
Tiedmann H., Becker U., Tiedmann H. (1963). Chromatographic separation of a hindbrain-inducing substance into mesodermal- and neural-inducing subfractions. Biochem. Biophys. Acta **74**, 557–560.
Toivonen S. (1979). Transmission problems in primary induction. Differentiation **15**, 177–181.
Toivonen S., Saxén L. (1955). The simultaneous inducing action of liver and bone marrow of the guinea pig in implantation and explantation experiments with embryos of *Triturus*. Exp. Cell. Res. [Suppl.] **3**, 346–357.
Ubisch L. von (1919). Über die Determination der larvalen Organe und der Imaginalanlage bei Seeigeln. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **117**, 80–122.
Waddington C. H. (1933). Induction by the primitive streak and its derivatives in the chick. J. Exp. Biol. **10**, 38–46.
Weeks D. L., Melton D. A. (1987). A maternal messenger RNA localized to the vegetal pole in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-β. Cell **51**, 861–867.
Weismann A. (1892). Essays on Heredity and Kindred Biological Problems. Translated by E. B. Poulton, S. Schoenland and A. E. Shipley. Clarendon, Oxford.
Weismann A. (1893). The Germ-Plasm: A Theory of Heredity. Translated by W. Newton Parker and H. Ronnfeld. Walter Scott, Ltd., London.
Wilson E. B. (1896). The Cell in Development and Inheritance. Macmillan, New York.

Глава 9

Тождество геномов и дифференциальная экспрессия генов: эмбриологические исследования

Наследственность осуществляется путем передачи ядерной преформации, которая в ходе развития находит свое выражение в процессе цитоплазматического эпигенеза.

Э. Б. ВИЛЬСОН (1925)[1]

Две клетки дифференцированы по-разному, если, обладая одинаковым геномом, они синтезируют разные белки.

Ф. ЖАКОБ и Ж. МОНО (1963)

Введение

Генетика развития изучает проблему реализации наследственных потенций оплодотворенного яйца в течение жизни организма. Когда мы наблюдаем развитие зародыша, становится очевидным, что в клетках разных типов экспрессируются разные гены. Гемоглобин, например, характерен для эритроцитов, тогда как кристаллин обнаруживается только в клетках хрусталика глаза. Клетки сетчатки способны передавать электрические импульсы на большие расстояния, а прилежащие к ним клетки пигментного эпителия черны от гранул меланина и лишены способности проводить электричество. А между тем клетки каждого из типов образуются в результате митотических делений одного и того же оплодотворенного яйца, и, следовательно, ядра клеток каждого типа должны содержать одинаковую информацию. Развитие, таким образом, осуществляется посредством избирательного включения специфических генов в соответствующем месте и в соответствующее время. Отсюда рождается и проблема, которой занимается генетика развития: какие именно механизмы обусловливают такое избирательное включение, в результате которого возникают различия между клетками?

Центральная гипотеза генетики развития заключается в том, что дифференцировка клеток происходит без генетических изменений. Другими словами, предполагается, что в любом организме все соматические клетки содержат одинаковый набор генов. Следовательно, разные типы дифференцированных клеток должны использовать разные гены из этого общего для всех клеток наследственного материала. Данные, положенные в основу гипотезы **дифференциальной экспрессии генов,** получены как в генетических, так и эмбриологических исследованиях. В этой главе мы обсудим работы, посвященные вопросу о том, происходят ли в процессе развития необратимые изменения генома.

[1] Цит. по кн.: Э. Вильсон. Клетка и ее роль в развитии и наследственности. т. 2, с. 974. Изд-во АН СССР. М.–Л., 1940, 1062 с. Перевод с англ. В. А. Дорфмана и М. С. Навашина.

Тождество геномов

Некоторые крупные неделящиеся клетки личинок двукрылых (таких, как *Drosophila* и *Chironomus*) содержат **политенные (многонитчатые) хромосомы.** В этих хромосомах репликация ДНК происходит без последующего митоза, и поэтому они содержат 512, 1024 и даже больше двойных спиральных молекул ДНК вместо одной (рис. 9.1 и 9.2). Клетки с политенными хромосомами никогда не делятся. Эти хромосомы можно увидеть с помощью светового микроскопа и различить характерную для них исчерченность. У дрозофилы в гаплоидном наборе хромосом насчитывается примерно 5150 дисков. В некоторых тканях в политенных хромосомах видны широкие полосы, внутри которых после спе-

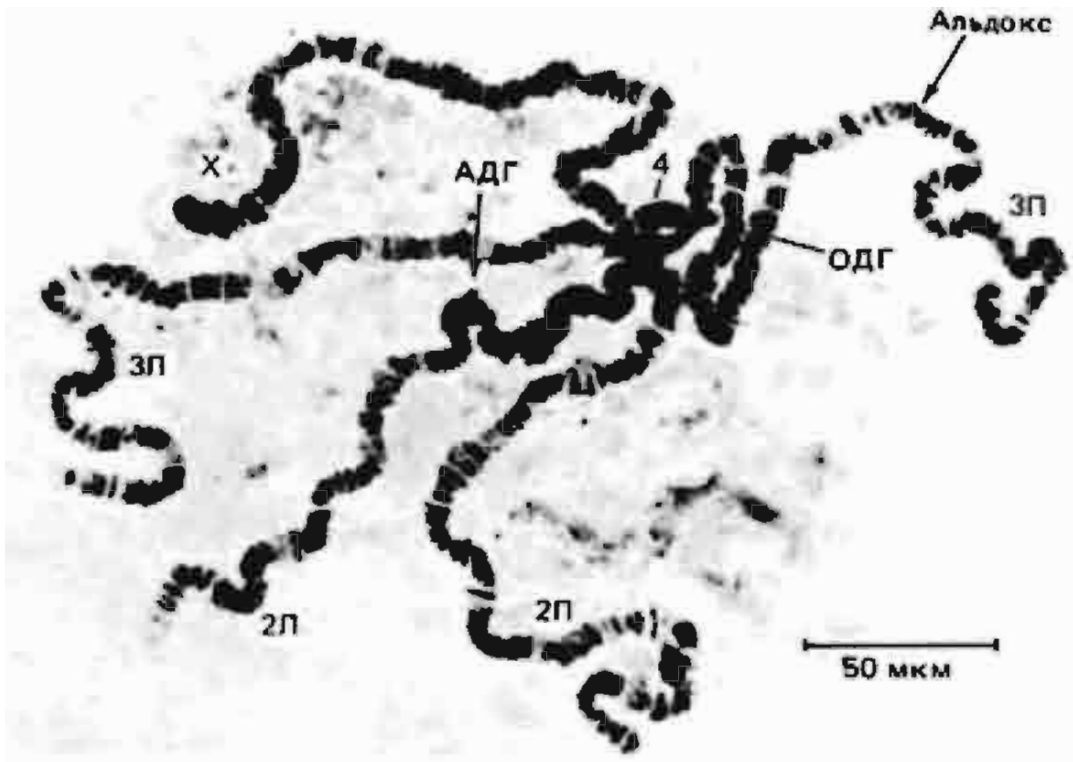


Рис. 9.1. Политенные хромосомы из клеток слюнных желез *Drosophila melanogaster*. Четыре хромосомы соединены в области центромер, формирующих плотный хромоцентр. На этих хромосомах картированы структурные гены для алкогольдегидрогеназы (АДГ), альдегидоксидазы (альдокс) и октанолдегидрогеназы (ОДГ). X – половая хромосома; арабскими цифрами обозначены номера хромосом; Л – левое и П – правое плечо второй и третьей хромосом. (Из Ursprung et al., 1968; фотография с любезного разрешения H. Ursprung.)

циальной обработки можно обнаружить два или более тонких дисков. В ряде генетических работ (Judd, Young, 1973) высказывалось предположение о наличии корреляции между числом этих дисков или **хромомер**, и числом генов у мухи (Swanson et al., 1981). Число политенных хромосом и характер исчерченности на протяжении всего личиночного периода остаются неизменными (Beermann, 1952; рис. 9.3). При сравнении политенных хромосом в разных тканях личинки не было

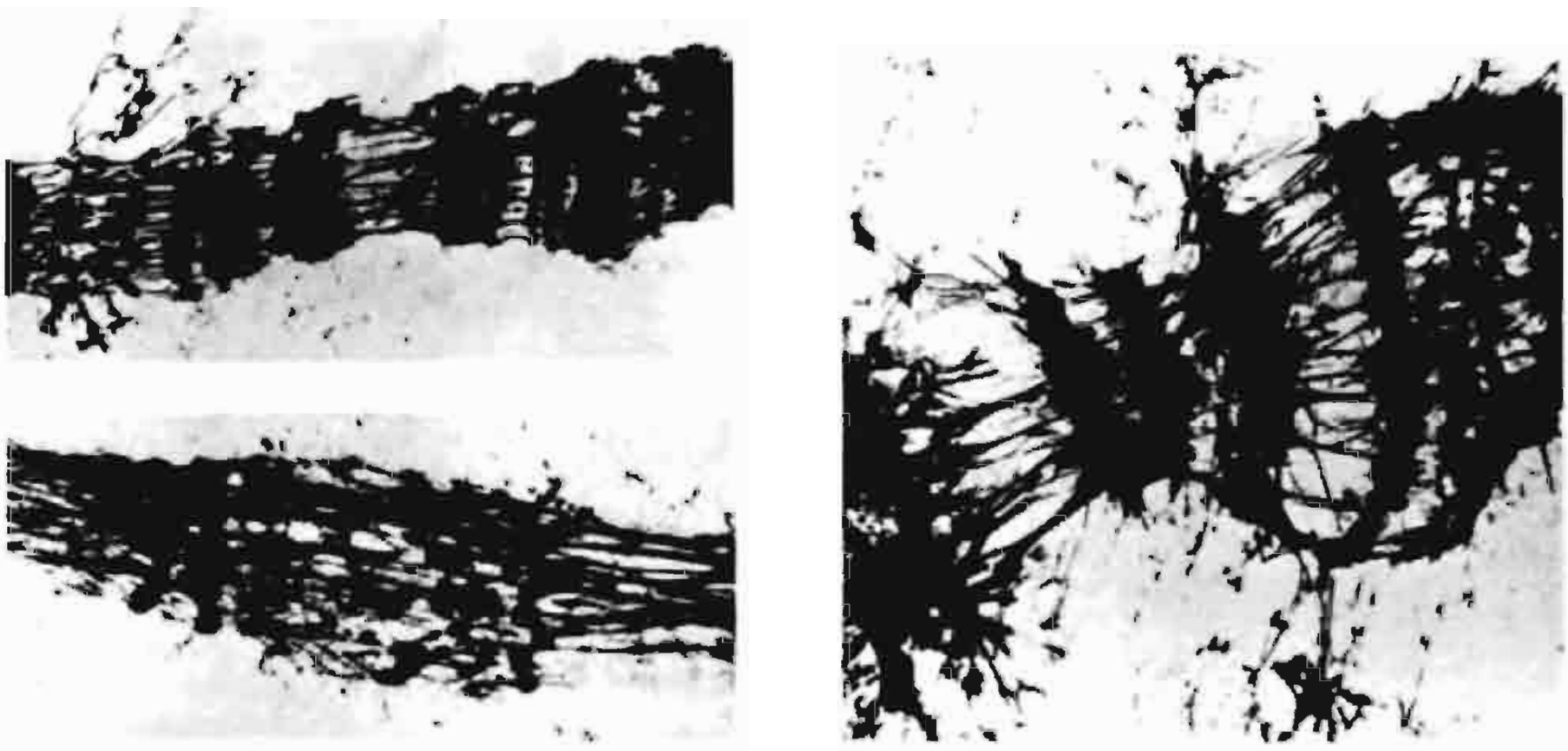


Рис. 9.2. Диски (темные области) и междиски (светлые области) в политенных хромосомах дрозофилы (фотографии получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа). Хроматин в дисках сильно конденсирован по сравнению с хроматином в междисках. На фотографиях показаны хромосомы в разной степени растяжения, для того чтобы можно было увидеть ультраструктуру дисков. (Из Burkholder, 1976; фотографии с любезного разрешения G. D. Burkholder.)

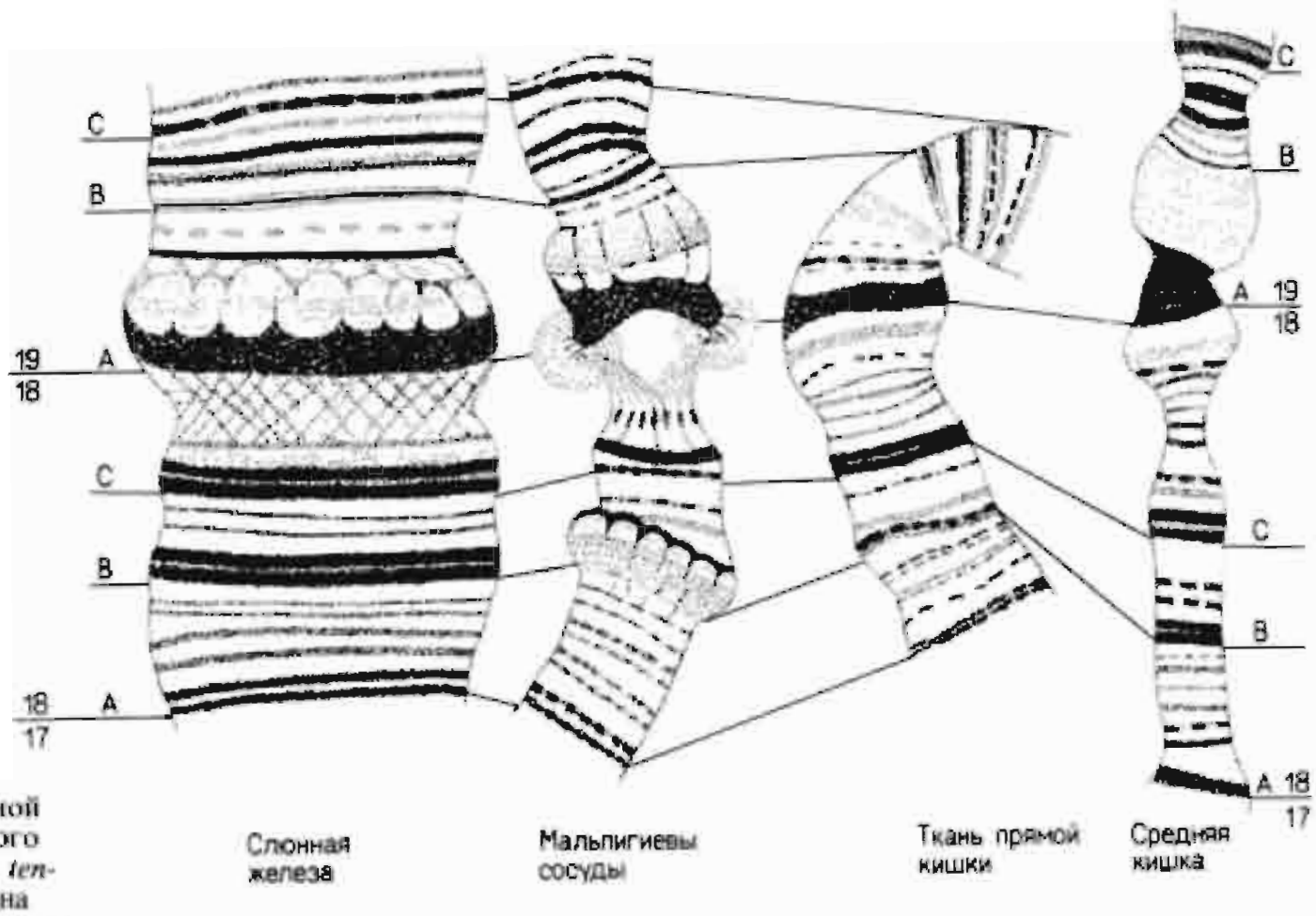


Рис. 9.3. Участок политенной хромосомы из хромосомного набора комара *Chironomus tentans*. Обратите внимание на постоянство числа дисков в разных тканях. Латинскими буквами и цифрами слева и справа от рисунка обозначены локализация участка и положение дисков внутри его. (По Beermann, 1952.)

выявлено утраты какого-либо из их участков. Когда появилась возможность изучать индивидуальные хромосомы позвоночных, удалось установить, что число хромосом в разных тканях взрослого организма постоянно (Tjio, Puck, 1958). Как мы узнаем позже, в разных исследованиях было показано, что состав и свойства ДНК, экстрагированных из разных соматических тканей, очень сходны.

Другие данные, свидетельствующие об эквивалентности генома, были получены в эмбриологических исследованиях. Дриш и Шпеман (гл. 8) четко показали, что ядра ранних бластомеров морских ежей и тритонов **тотипотентны,** т. е. способны обеспечить дифференцировку любых типов клеток. В их опытах бластомер, который в норме должен был бы дать начало лишь части зародыша, оказался способным дать в процессе развития целый организм. Следовательно, его ядро должно было содержать гены, необходимые для образования всех других типов клеток. Кроме того, Шпеман обнаружил, что проспективное значение клеток, взятых у зародыша тритона на стадии ранней гаструлы, меняется после пересадки их в другую область зародыша. Можно ли экстраполировать результаты этих эмбриологических исследований на клетки, которые уже детерминированы к дифференцировке в определенном направлении? Сохраняют ли детерминированные или дифференцированные клетки другие потенции к развитию? Излагаемые ниже данные, полученные в двух направлениях исследований, приводят к положительному ответу на эти вопросы.

Трансдетерминация

Личинка дрозофилы после вылупления имеет две четко различающиеся популяции клеток. Ее ткани образованы примерно 10 000 клеток. У большей части клеток имеются политенные хромосомы; эти клетки интенсивно растут, увеличиваясь в объеме примерно в 150 раз. Помимо этого, еще около 1000 клеток с диплоидными (неполитенными) ядрами образуют скопления в различных областях личинки. Такие скопления недифференцированных клеток называются **имагинальными дисками** (от латинского слова «имаго», означающего «взрослый»). Эти клетки делятся в течение всего периода роста личинки. Во время метаморфоза гормон **экдистерон** вызывает огромные изменения во всем организме (гл. 19). Личиночные клетки дегенерируют, тогда как имагинальные диски получают сигналы к дифференцировке в органы взрослой мухи. На рис. 9.4 показано расположение имагинальных дисков и перечислены структуры, которые из них развиваются.

Клетки имагинальных дисков личинки детерминированы. Так, например, глазной диск можно удалить у одной личинки и имплантировать его в брюшко другой. После метаморфоза муха, развившаяся из этой второй личинки, будет иметь

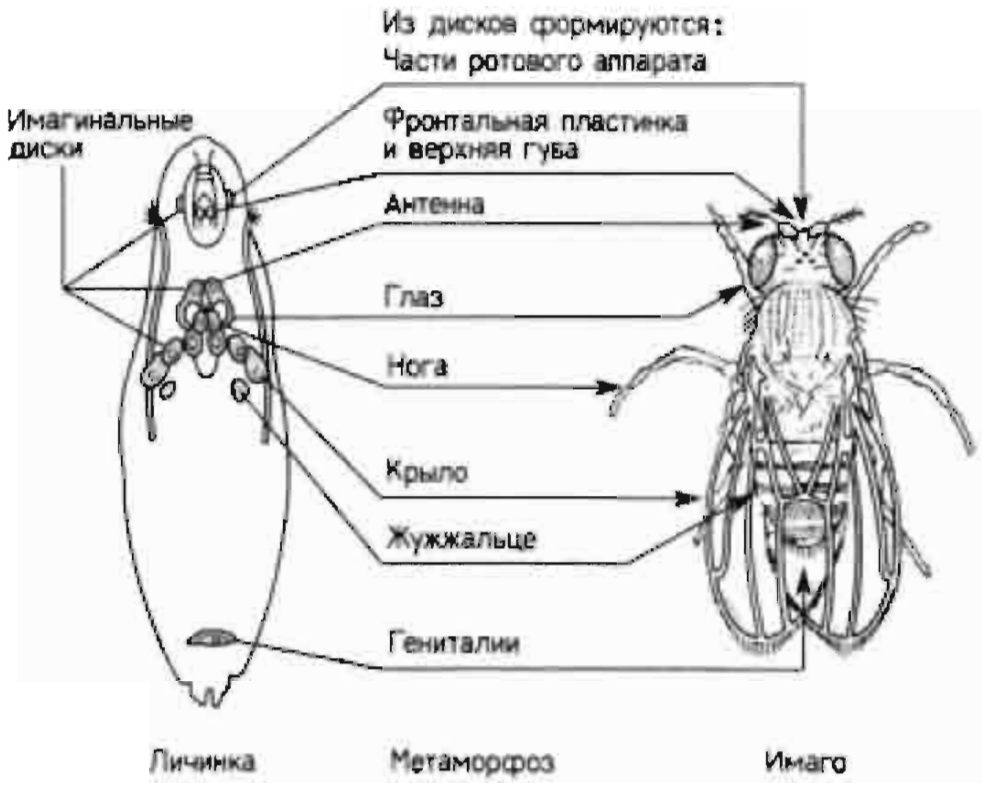


Рис. 9.4. Локализация и проспективное значение имагинальных дисков у *Drosophila melanogaster*. (По Fristrom et al., 1969.)

лишний глаз на брюшке. Если трансплантировать часть имагинального диска, то разовьется только часть глаза. Таким образом, трансплантация диска или его фрагмента личинке – прекрасный метод для тестирования состояния их детерминации, т. е. того, какая структура или ее фрагмент возникнет из этого диска при метаморфозе. Однако, когда диски трансплантируют *взрослым мухам*, они не дифференцируются, а их клетки продолжают пролиферировать. Эти пролиферирующие клетки можно непрерывно культивировать, пересаживая их от одной взрослой мухи к другой. Вместе с тем можно вновь тестировать состояние детерминации клеток диска путем удаления у мухи фрагментов растущих дисков и помещения их в личинку, претерпевающую метаморфоз (рис. 9.5).

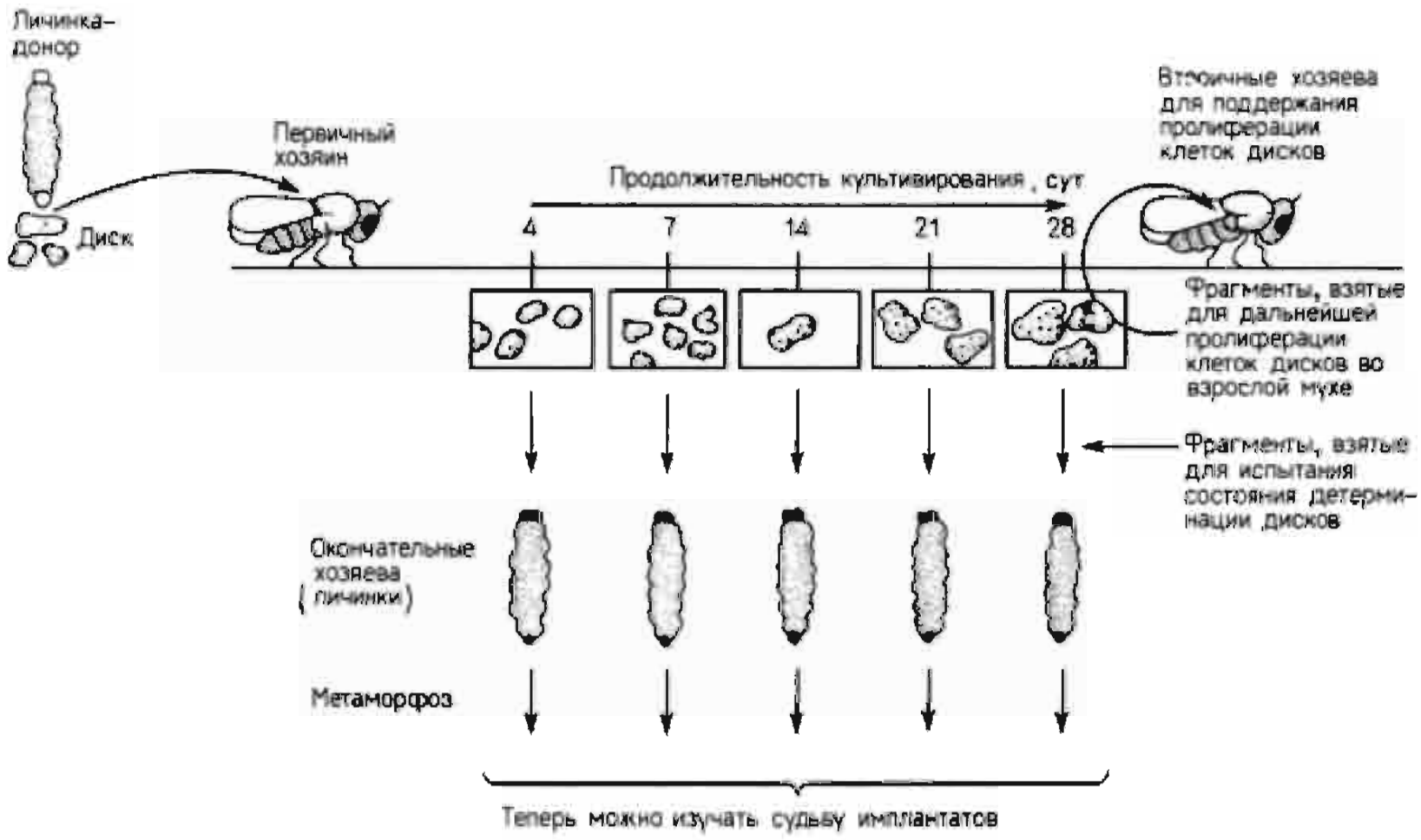


Рис. 9.5. Тестирование потенций имагинальных дисков. Диски вырезали и помещали во взрослых мух, где клетки этих дисков делились. Если диски удаляли из взрослых мух через различные сроки инкубации и пересаживали в нормальных личинок, то после метаморфоза из них формировались структуры взрослого организма. (По Markert, Ursprung, 1971.)



Рис. 9.6. Трансдетерминация структур антенны в структуры ноги. *А*. Трансдетерминация антеннального диска, пересаженного по схеме, показанной на рис. 9.5. Помимо нормальных структур антенны (*AIII* – третий антеннальный сегмент; *Ар* – аристы) развились структуры ноги, такие, как тарзальные щетинки (*ТЩ*) и связанные с ними браКты (*б*). *Б*. Голова взрослой мухи, несущей мутацию *Antennapedia*. У этого мутанта антенны почти полностью превратились в нормальные ноги. Мутации, обусловливающие превращение одной структуры в другую, называются гомеозисными мутациями (гл. 18). Хотя механизм трансдетерминации дисков, вероятно, отличается от механизма гомеозисных мутаций, оба они демонстрируют изменения судьбы дисков. (*А* – из Gehring, 1969; с любезного разрешения W. T. Gehring; фотография на рис. 9.6, *Б* любезно предоставлена J. Haynie.)

Эрнст Хадорн с коллегами (Hadorn, 1968) использовали методику пересадки дисков, чтобы показать, что клетка может изменять свое коммитированное состояние. Обычно фрагменты диска, детерминированного к образованию антенн, продолжали образовывать антеннальные структуры каждый раз, когда их тестировали, даже после нескольких серийных трансплантаций таких фрагментов взрослым мухам. Однако результат одного опыта удивил исследователей: вместо монотонного образования антеннальных структур участки антеннального диска формировали части ног, ротового аппарата или крыла. Это явление названо **трансдетерминацией.** Вместо развития в «собственный» орган имагинальные клетки развивались в другую часть взрослой мухи. Например, из диска, в норме детерминированного к развитию антенны, могла возникнуть структура, свойственная ноге взрослой мухи (рис. 9.6). Кроме того, подобно исходному состоянию детерминации, трансдетерминированное состояние оказалось относительно стабильным и наследовалось клетками диска на протяжении многих поколений.

Трансдетерминация чаще наблюдается после нескольких пассажей через взрослых мух и происходит преимущественно в определенных направлениях (рис. 9.7). Из диска крыла, например, могут возникнуть структуры груди, но грудные диски никогда не дифференцируются в части крыла. Генитальные диски могут дать начало антеннам или ногам, но никогда не наблюдается образования генитальных структур из дисков других типов. Причина такой направленности остается неизвестной, однако ясно, что детерминированные клетки могут дать начало иным типам клеток, чем те, которые образуются из них в норме. Следовательно, в клетках имагиналь-

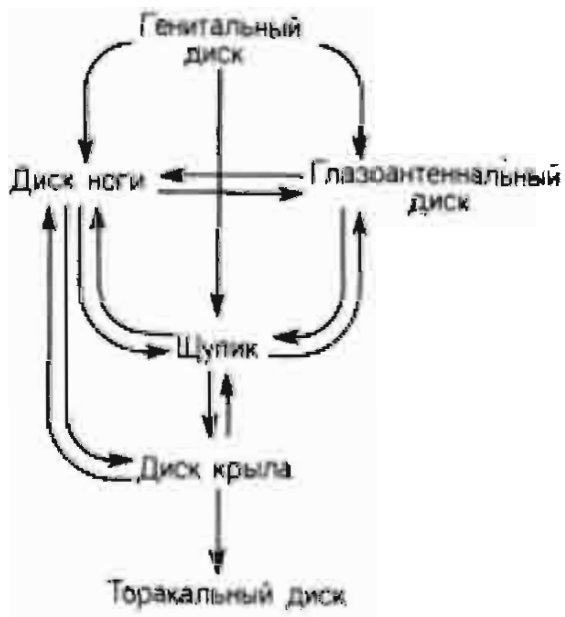


Рис. 9.7. Пути трансдетерминации имагинальных дисков. Черными стрелками показаны часто наблюдаемые изменения; серые стрелки указывают на более редкие события.

ных дисков сохраняются гены для специфических продуктов, которые в норме синтезируются клетками других типов.

Метаплазия

Результаты экспериментов по регенерации глаз у тритонов показали, что даже *дифференцированные* клетки взрослого организма могут сохранять потенции к образованию клеток других типов. Удаление сетчатки у тритона стимулирует ее регенерацию из пигментного эпителия, а новый хрусталик может сформироваться из клеток дорсальной радужки. Этот последний тип регенерации (названный вольфовской регенерацией по имени ученого, первым обнаружившего это явление) интенсивно изучался Тунео Ямадой и его коллегами (Jamada, 1966; Dumont, Jamada, 1972). Они обнаружили, что после удаления хрусталика происходит ряд событий, в результате которых радужка образует новый хрусталик (рис. 9.8).

1. Меняется форма ядер клеток радужки.
2. В клетках дорсальной части радужки образуется огромное количество рибосом.
3. ДНК этих клеток реплицируется, и вскоре клетки начинают делиться.
4. Происходит дедифференцировка этих клеток. Они выбрасывают меланосомы (продукты дифференцировки, придающие глазу его характерный цвет), которые перевариваются макрофагами, проникающими в рану.
5. Клетки дорсальной части радужки продолжают делиться, формируя дедифференцированную ткань в области удаленного хрусталика.
6. В дедифференцированных клетках радужки начинается синтез специфических для клеток хрусталика продуктов – белков кристаллинов.

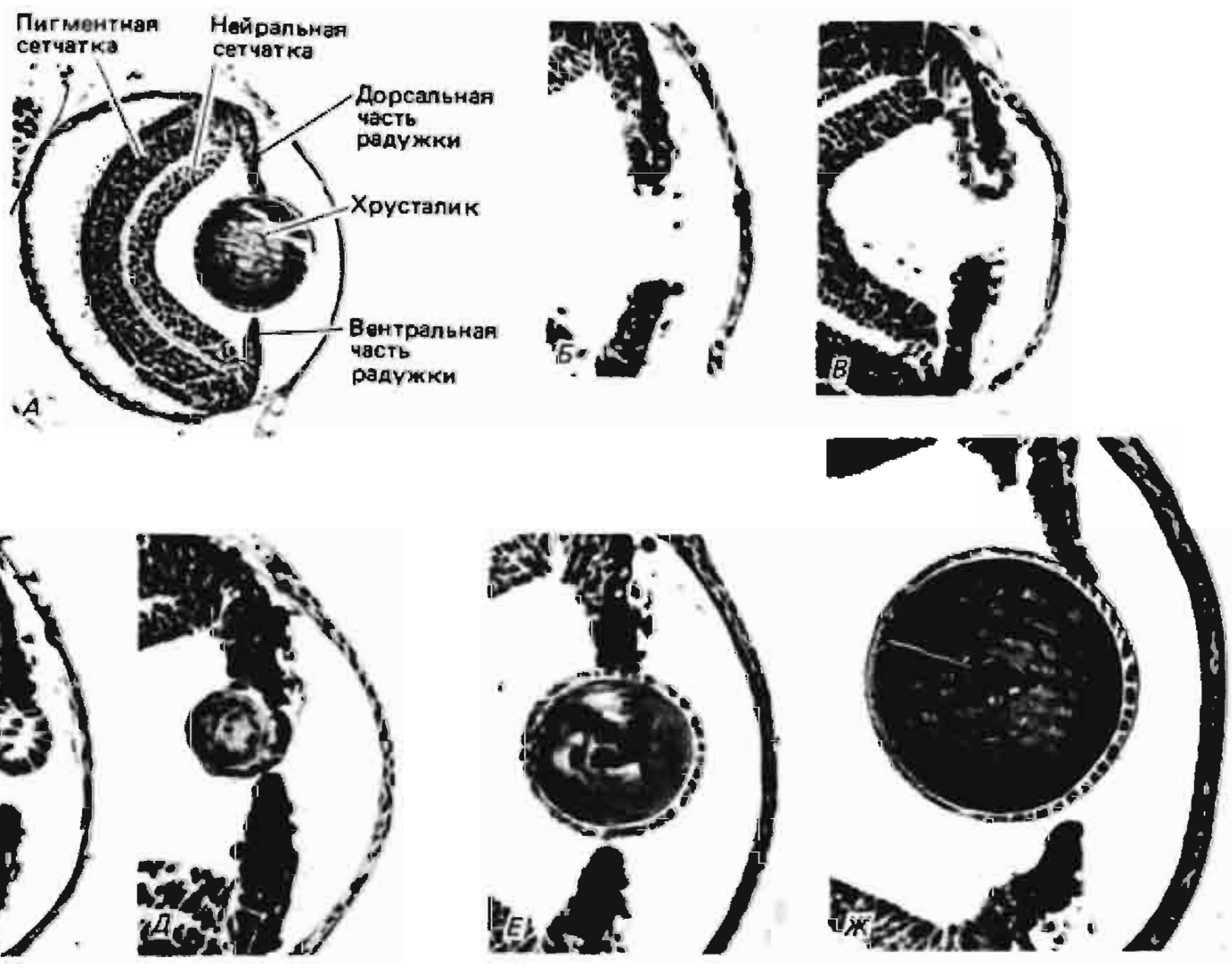


Рис. 9.8. Вольфовская регенерация хрусталика из дорсального края радужки у тритона. *А*. Нормальный неоперированный глаз личинки тритона *Notophthalmus viridiscens*. *Б – Ж*. Процесс регенерации хрусталика, наблюдаемый на сроках 5, 7, 9, 16, 18 и 30 сут после удаления хрусталика. Образование нового хрусталика завершается к 30 сут. (Из Reyer, 1954; фотографии с любезного разрешения R. W. Reyer.)

Эти белки синтезируются в такой же последовательности, как и при развитии нормального хрусталика.

7. Как только сформировался новый хрусталик, деления клеток дорсальной части радужки прекращаются.

Перечисленные события нельзя считать нормальным путем образования хрусталика. Вспомним, что в эмбриогенезе хрусталик образуется из слоя эпителиальных клеток, индуцированных клетками передней стенки глазного пузыря. Процесс формирования хрусталика из дифференцированных клеток радужки называется **метаплазией**; явление это состоит в превращении (трансформации) одного типа дифференцированных клеток в другой. Следовательно, данные, полученные генетиками и биологами развития, подтверждают гипотезу дифференциальной экспрессии генов в генетически идентичных ядрах.

Клонирование у амфибий: ограничение потенций клеток

Окончательно решить вопрос о том, является ли сужение функций ядра дифференцированной клетки необратимым, было бы можно, проверив способность этого ядра индуцировать образование дифференцированных клеток любого другого типа. В 1938 г. Ганс Шпеман предложил, по его словам, «фантастический» опыт, чтобы ответить на вопрос о том, действительно ли геномы в разных клетках идентичны. Для этого следует имплантировать ядро какой-либо дифференцированной клетки в яйцо, собственное ядро которого предварительно было удалено. Если любое пересаженное ядро идентично ядру зиготы, то оно должно обеспечить полное развитие организма. Однако для проведения такого опыта необходимо было прежде всего разработать три методики: 1) методику энуклеации яиц-реципиентов без их разрушения; 2) методику изоляции неповрежденных ядер; 3) методику переноса таких ядер в яйцо без повреждения и ядра, и яйца.

Указанные методики были разработаны Робертом Бригтсом и Томасом Кингом. Эти исследователи комбинировали энуклеацию яйца с его партеногенетической активацией. Если яйцеклетку леопардовой лягушки (*Rana pipiens*) уколоть стеклянной иглой, то в ней начнут происходить все цитологические и биохимические изменения, связанные с оплодотворением: разрушаются кортикальные гранулы, перемещается внутренняя цитоплазма, а вблизи анимального полюса завершается мейоз.

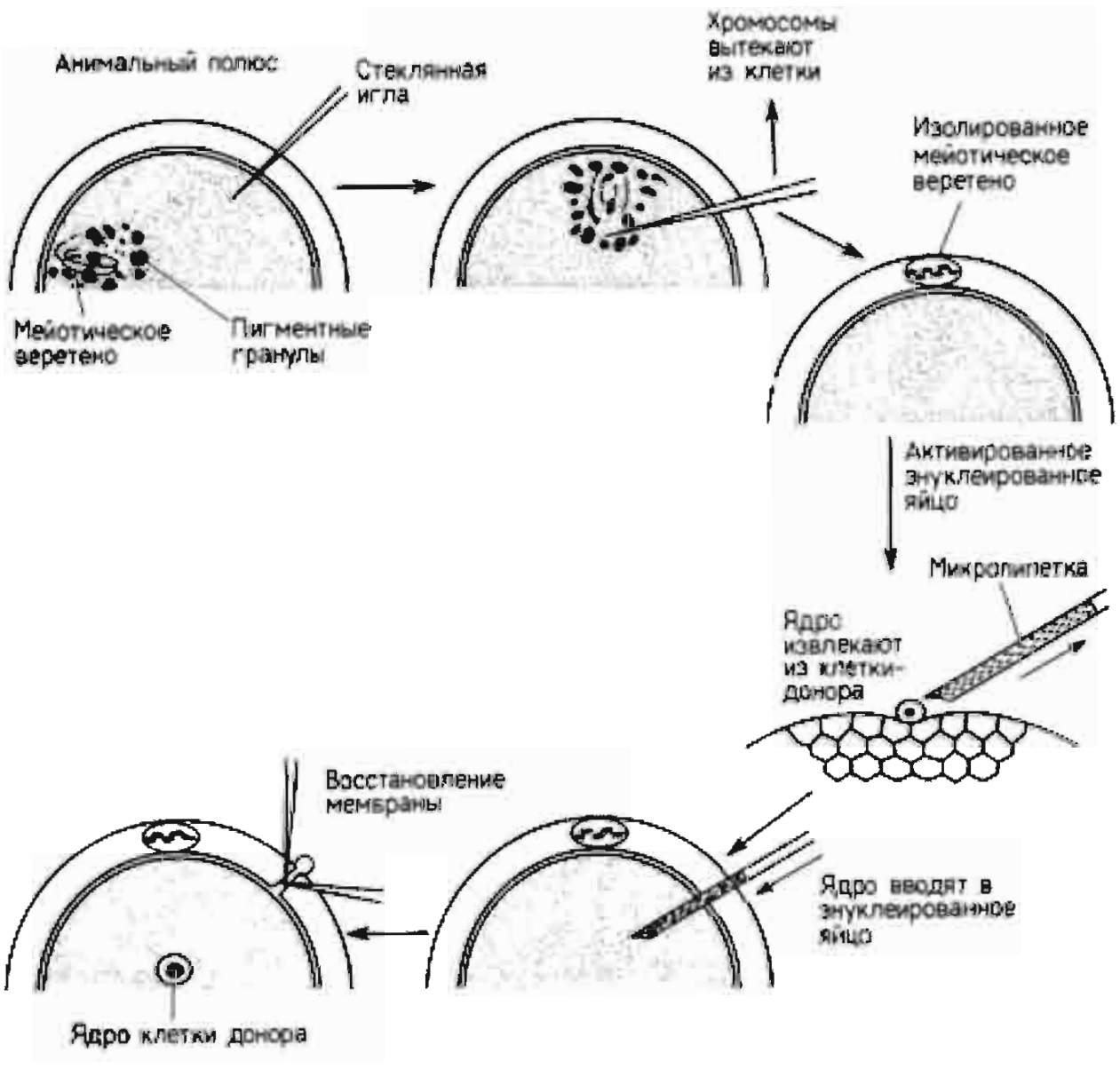


Рис. 9.9. Процедура пересадки ядер бластулы в активированные энуклеированные яйца *Rana pipiens*. Относительные размеры мейотического веретена сильно увеличены, чтобы сделать более наглядной методику пересадки. (По King, 1966.)



Рис. 9.10. Этот великолепный экземпляр *Rana pipiens* был получен с помощью трансплантации ядра бластулы в активированное энуклеированное яйцо. (Фотография любезно предоставлена M. DiBerardino, N. Hoffner.)

Положение мейотического веретена в яйце легко определить, поскольку на анимальном полюсе пигментные гранулы удаляются от него и прокол яйца в этом месте приводит к вытеканию мейотического веретена вместе с хромосомами наружу (рис. 9.9). Теперь яйцо является и активированным (так как процессы, необходимые для начала развития, завершены), и одновременно энуклеированным. В энуклеированные яйца переносят ядра из клеток-доноров. Для этого клетку разрывают, с помощью микропипетки захватывают ее ядро и вводят его в яйцо-реципиент. Вместе с ядром в яйцо попадает и некоторое количество окружающей его цитоплазмы клетки-донора, но соотношение цитоплазмы донора и реципиента столь ничтожно ($1:10^5$), что вряд ли она оказывает какое-либо влияние на исход опыта.

В 1952 г. Бриггс и Кинг (Briggs, King, 1952) показали, что ядра, взятые у зародыша на стадии бластулы, будучи перенесенными в цитоплазму яйцеклетки, обеспечивают развитие полностью сформированного головастика. Еще раньше Шпеман продемонстрировал, что клетки бластулы не детерминированы и, следовательно, их ядра тотипотентны. Поэтому если система переноса ядер работает, то ядра бластулы должны быть способны обеспечить полное развитие. Именно это и наблюдается в опытах по пересадке ядер бластулы. Шестьдесят процентов всех имплантированных ядер оказались способными направлять развитие яиц до стадии свободно плавающего головастика; все эти головастики были диплоидными (результат, подтверждающий, что их ядра происходили из ядра клетки-донора). Следовательно, система переноса ядер работает и ее можно использовать для изучения потенций ядра (рис. 9.10).

Что произойдет, если в активированное энуклеированное яйцо пересадить ядро из клетки зародыша, находящегося на более продвинутой стадии развития? Результаты опытов Кинга и Бриггса (King, Briggs, 1956) суммированы на рис. 9.11. Из этого рисунка видно, что большинство ядер из клеток

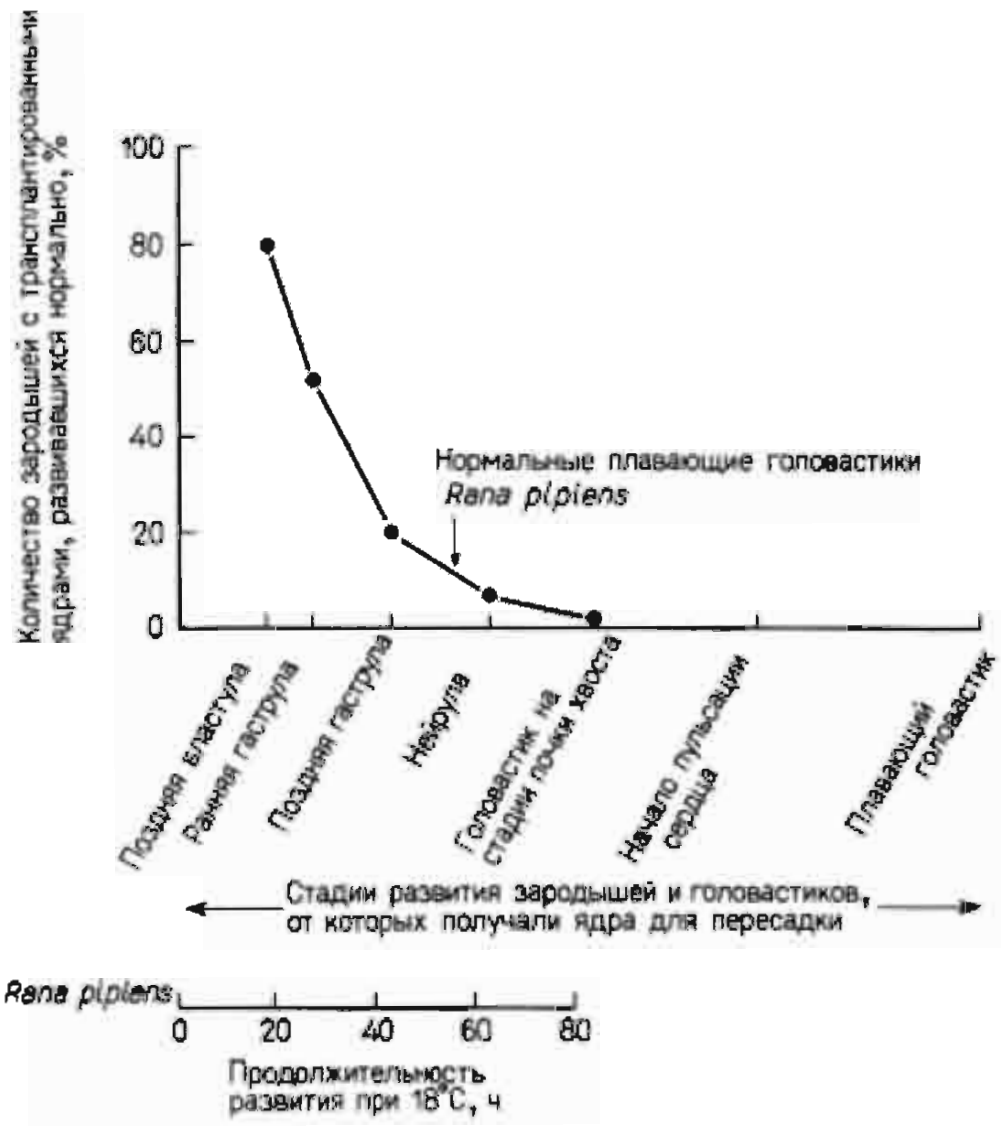


Рис. 9.11. Зависимость результата трансплантации ядер от стадии развития, на которой были взяты ядра. На оси абсцисс обозначены стадии развития, на которых изолировали ядро из клетки-донора *Rana pipiens* и вводили его в активированное и энуклеированное яйцо. По оси ординат отложено количество успешно развивающихся до стадии бластулы и далее до стадии плавающего головастика яиц с трансплантированными ядрами. (По McKinnell, 1978.)

бластулы способны обеспечить развитие яиц-реципиентов до стадии нормальных свободно плавающих головастиков, однако в ядрах, взятых от доноров, находящихся на более поздних стадиях развития, эта способность резко ограничивается. Ни одно из ядер *соматических клеток*, взятых на стадии хвостовой почки, не могло дать информацию, необходимую для развития нормального зародыша. Однако, когда на той же стадии брали ядра *половых клеток* (в норме дающих после оплодотворения начало целому организму), в 40% случаев были получены бластулы, способные к дальнейшему развитию (Smith, 1956). Следовательно, соматические клетки, становясь детерминированными и дифференцированными, по-видимому, утрачивают способность обеспечивать полное развитие организма.

Было показано, что ограничение потенций ядер по мере развития является стабильным и тканеспецифическим признаком. Данные в пользу этого получали в следующих опытах. Число энтодермальных ядер, взятых на стадии поздней гаструлы, увеличивали путем серийных пересадок. С этой целью одно ядро переносили в энуклеированное яйцо; развившийся в результате такой процедуры зародыш имел на стадии бластулы тысячи идентичных ядер. Ядра этой бластулы снова переносили в энуклеированные яйца и таким образом получали много копий первоначального ядра, что позволяло количественно оценить его потенции. Такая методика называется **клонированием ядер** (рис. 9.12). При трансплантации неклонированных ядер наблюдается большая изменчивость в способности ядер, полученных от разных доноров, обеспечивать развитие. Некоторые ядра обеспечивают весь путь развития до стадии свободно плавающего головастика, тогда как другие – только до стадии аномальной гаструлы. Кинг и Бригге считали эту изменчивость в *разных* клонах нормальной. Однако они обнаружили, что *в пределах одного* клона все ядра обладают одинаковыми потенциями. Каждый клон имел «характерный» фенотип, и часто стадия, на которой останавливалось развитие особей, полученных в результате пересадки ядер – потомков одного клонированного ядра энтодермальной клетки, была сходной. Это наблюдалось и при трансплантации ядер, клонированных в течение нескольких поколений. Кроме того, если личинки развивались с какими-либо дефектами, то эти дефекты у всех личинок были одинаковыми. Все личинки с клонированными ядрами имели энтодермальные структуры (а именно, кишку), но у них отсутствовали некоторые производные мезодермы или эктодермы. По-видимому, ядра из клеток энтодермы пригодны для формирования энтодермы, но их способность к формированию эктодермы или мезодермы ограничена. Сходная утрата потенций была обнаружена и в ядрах клеток эктодермы (DiBerardino, King, 1967). Аномальные головастики имели превосходно дифференцированные нейральные структуры, но у них отсутствовали энтодермальные производные. Таким образом, прогрессивное ограничение потенций ядер по мере развития является, по-видимому, общим правилом. Не исключено, что ядра разных дифференцированных клеток отличаются друг от друга.

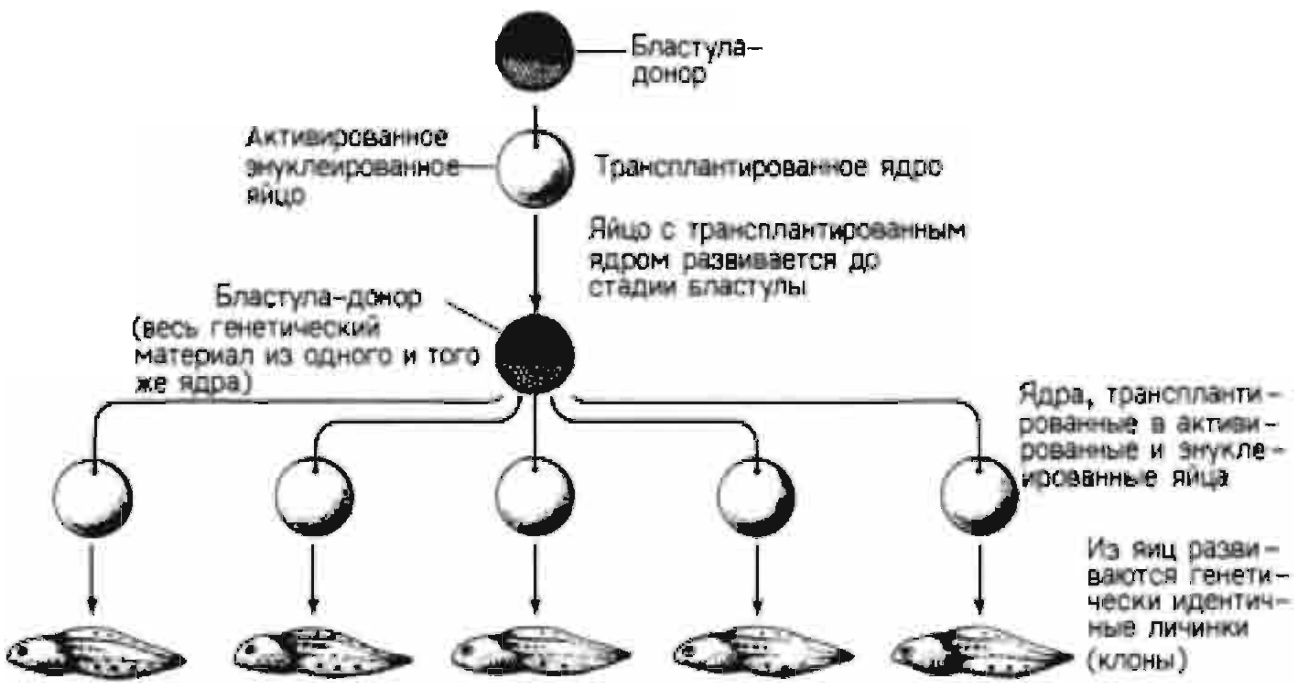


Рис. 9.12. Изучение потенций ядер методом их серийных пересадок. Ядро, полученное из клетки одной бластулы, вводят в активированное энуклеированное яйцо. Бластула, развившаяся из этого яйца, служит источником ядер для второго поколения зародышей, развившихся из энуклеированных яиц; этот процесс называется клонированием ядер.

Клонирование у амфибий: исключения из ограничения потенций

Можно, однако, и по-иному объяснить ограничение потенций ядер в дифференцированных клетках. Перенося ядро дифференцированной клетки в цитоплазму зрелого яйца, мы тем самым заставляем его вернуться к теперь уже не свойственному ему физиологическому состоянию. У лягушек в период дробления ядра клеток делятся с очень высокой скоростью, тогда как в некоторых дифференцированных клетках они делятся редко или не делятся вообще. Неспособность к репликации ДНК быстро приводит к поломкам хромосом; такие хромосомные аномалии наблюдаются во многих клетках головастиков, развившихся из яиц, содержавших клонированные ядра. Джон Гёрдон и его коллеги, используя несколько измененную методику пересадки ядер, получили результаты, показывающие, что многие из ядер дифференцированных клеток остаются тотипотентными.

Главное различие между опытами Гёрдона и опытами Бриггса и Кинга заключалось в выборе объекта исследований. Гёрдон изолировал ядра из клеток *Xenopus laevis*, южноафриканской шпорцевой лягушки. Эта лягушка (рис. 9.13) гораздо более



Рис. 9.13. Спаривание у *Xenopus laevis*. Маленький самец обхватывает самку и осеменяет свежеотложенные яйца снаружи. (Из Deuchar, 1975.)

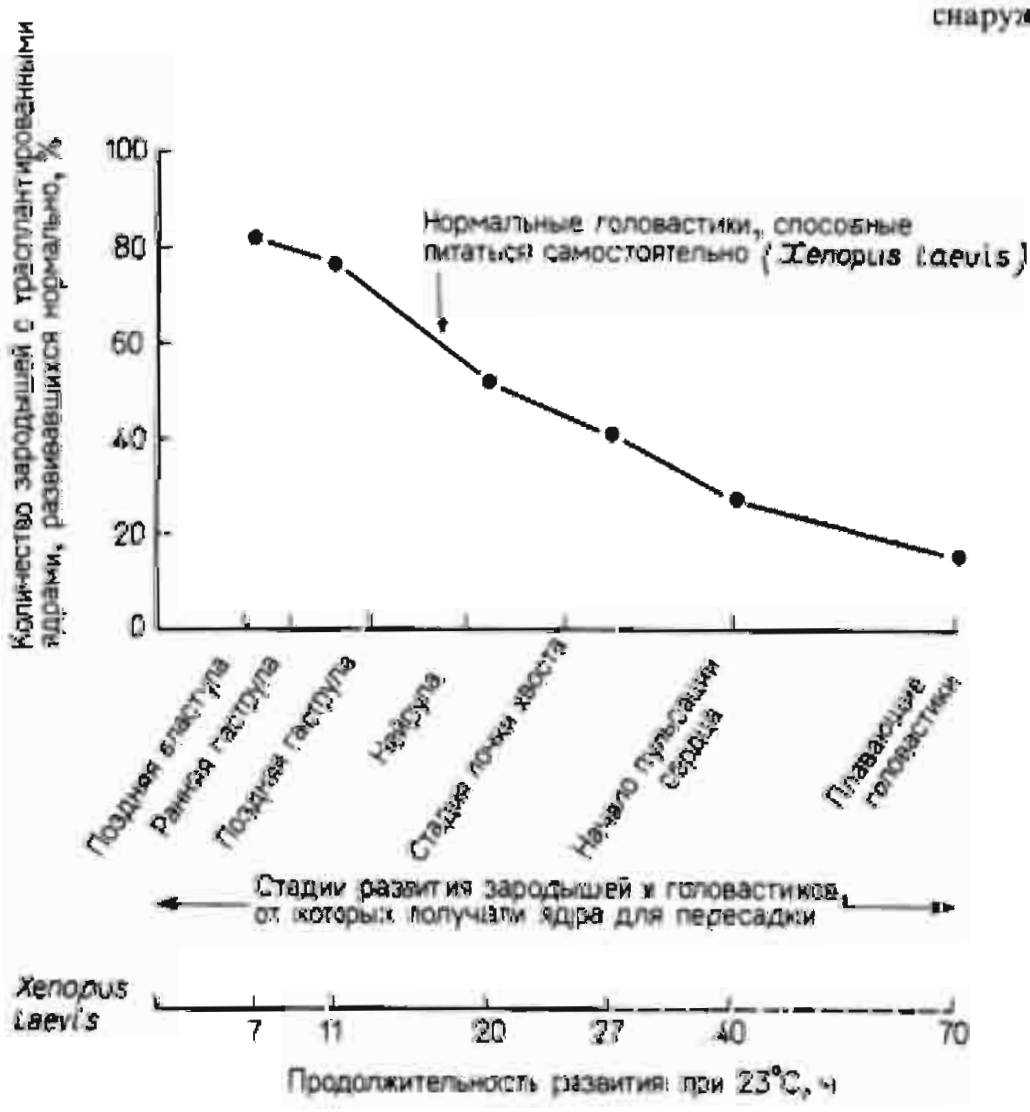


Рис. 9.14. Зависимость результата трансплантации ядер от стадии развития донора ядер. Сравните с кривой на рис. 9.11. Ядра из клеток *Xenopus laevis*, взятые на более поздних стадиях развития, дают в общем лучший результат, чем ядра, взятые из клеток *Rana pipiens* на тех же стадиях развития. (По McKinnell, 1978.)

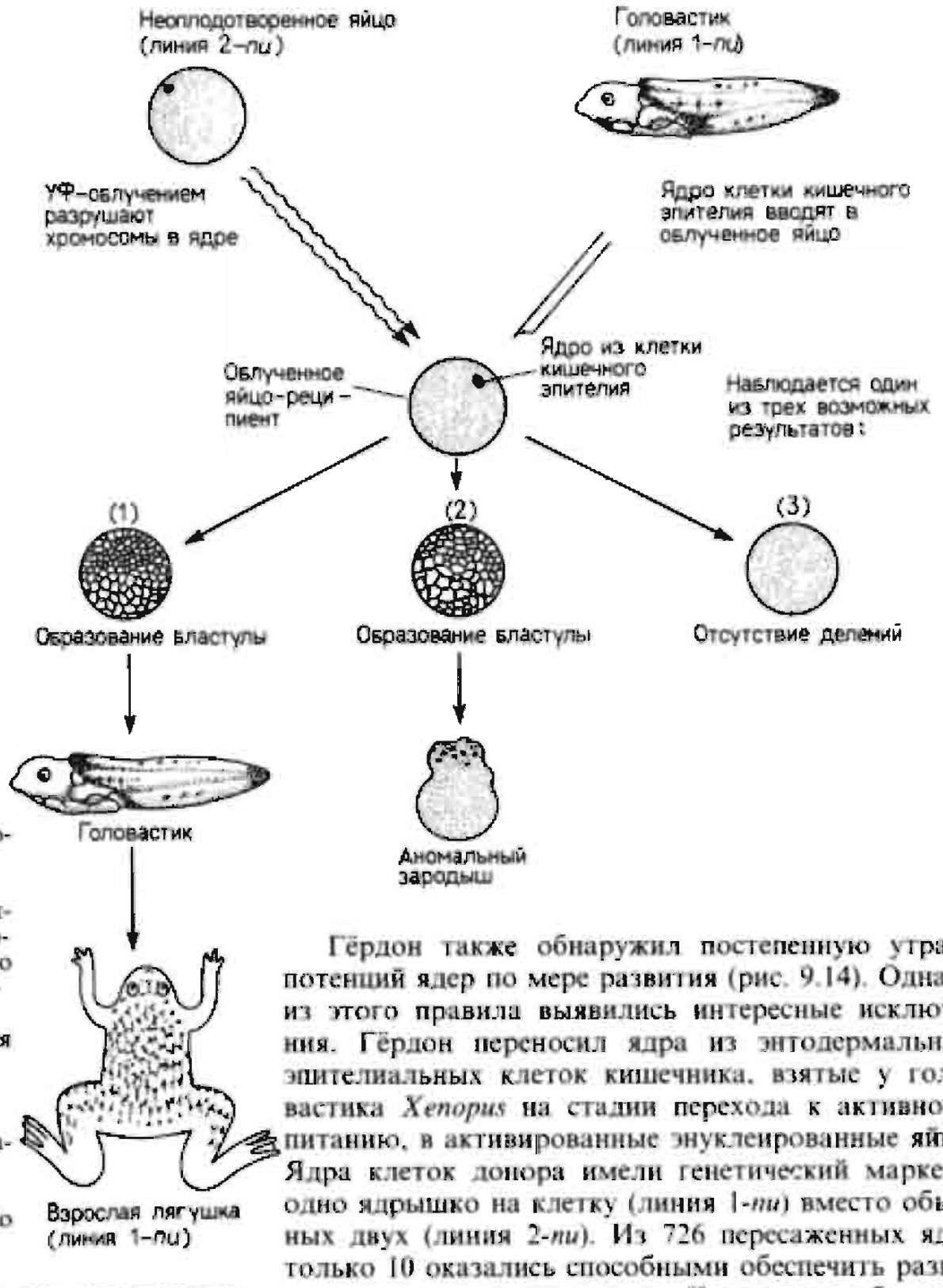


Рис. 9.15. Процедура получения половозрелых особей шпорцевой лягушки посредством трансплантации ядер клеток кишечного эпителия головастика в энуклеированные яйца. Хромосомы в яйце шпорцевой лягушки дикого типа (с двумя ядрышками – 2-*пи*) разрушают УФ-облучением и вводят в него ядро клетки кишечного эпителия головастика шпорцевой лягушки из линии с одним ядрышком (1-*пи*). В одних случаях яйцо не делится, в других – развитие зародыша нарушается, но в ряде случаев развивается нормальная взрослая особь, клетки которой содержат одно ядрышко. (По Gurdon, 1968, 1977.)

примитивна, чем *Rana pipiens*; у нее отсутствуют веки, среднее ухо и даже язык, столь характерный для позднее эволюционировавших видов *Rana*. Шпорцевая лягушка отличается также и по биологии развития. В отличие от леопардовой лягушки взрослая особь *Xenopus* способна регенерировать утраченные конечности; раннее развитие у нее протекает в три раза быстрее, чем у леопардовой лягушки. В частности, для достижения стадии хвостовой почки зародышу *Rana pipiens* требуется 80 ч, тогда как *Xenopus laevis* достигает той же стадии развития всего за 26 ч. Следовательно, ядра энтодермальных клеток на стадии хвостовой почки у шпорцевой лягушки имеют такой же возраст, как ядра из клеток ранней гаструлы у *Rana* (McKinnell, 1978).

Гёрдон также обнаружил постепенную утрату потенций ядер по мере развития (рис. 9.14). Однако из этого правила выявились интересные исключения. Гёрдон переносил ядра из энтодермальных эпителиальных клеток кишечника, взятые у головастика *Xenopus* на стадии перехода к активному питанию, в активированные энуклеированные яйца. Ядра клеток донора имели генетический маркер – одно ядрышко на клетку (линия 1-*пи*) вместо обычных двух (линия 2-*пи*). Из 726 пересаженных ядер только 10 оказались способными обеспечить развитие зиготы до стадии донора. Число ядер, обеспечивающих развитие, удалось повысить до 7% (Gurdon, 1962) с помощью метода серийных пересадок (переноса ядра из клеток кишечника в яйцо и после достижения яйцом-реципиентом стадии бластулы, последующего переноса ядер клеток бластулы в большее число яиц). В некоторых случаях ядра были способны реализовать информацию, достаточную для достижения стадии головастика и образования клеток всех линий – нейронов, клеток крови и др. Кроме того, семь головастиков (развившихся после пересадки в яйца ядер, полученных клонированием двух исходных ядер) метаморфизировали и превратились в половозрелых взрослых лягушек (Gurdon, Uehlinger, 1966). Эти ядра были тотипотентными (рис. 9.15).

Однако Кинг и его коллеги с сомнением отнеслись к опытам Гёрдона, считая, во-первых, что исследователи не приняли достаточных мер предосторожности, исключающих возможность использования вместо ядер кишечника ядер первичных половых клеток, которые, мигрируя, часто задерживаются в кишке, и, во-вторых, что эпителиальные клетки кишечника таких ранних, перешедших на активное питание головастиков могут не обладать свойствами вполне дифференцированных клеток. У них эти клетки еще содержат желточные пластинки (DiBerardino, King, 1967; McKinnell, 1978; Briggs, 1979).

В ответ на эти критические замечания Гёрдон и его коллеги провели следующие опыты. Они культивировали эпителиальные клетки из кожных межпальцевых перепонок ноги взрослой особи *Xenopus*. Эти клетки были, безусловно, дифференцированными, потому что каждая из них содержала кератин – белок, характерный для клеток кожи взрослых особей. Когда ядра этих клеток пересаживали в энуклеированные яйца, ни одно из ядер не обеспечивало развития зародышей дальше нейрулы. Однако после клонирования ядер и их пересадки в энуклеированные яйца из таких яиц развивались многочисленные головастики; правда, все они погибали, не переходя на активное питание (Gurdon et al., 1975). Сходную остановку развития наблюдали другие исследователи (Wabl et al., 1975), пытаясь получить взрослых лягушек при пересадке ядер лимфоцитов. Ди Берардино (DiBerardino, 1987) пришла к заключению, что «на сегодня еще не доказано, что ядра клеток хотя бы одного какого-либо специализированного типа или клеток взрослого организма являются тотипотентными».

Результаты опытов по клонированию ядер у амфибий позволяют сделать два вывода. Во-первых, в них можно увидеть общее правило ограничения потенций в процессе развития. Это ограничение генетически детерминировано и характерно для ядер определенного типа клеток-доноров. Во-вторых, можно легко убедиться в том, что геном дифференцированной клетки обладает изумительной способностью инициировать образование всех типов клеток головастика. Ядро эритроцита лягушки, в котором никогда не происходит репликации ДНК (и синтеза мРНК), может претерпеть при серийных пересадках в общей сложности свыше 100 делений и все же сохранить способность обеспечивать развитие энуклеированного и активированного яйца в свободно плавающего головастика (Orr et al., 1986). Другими словами, даже если еще и ведутся споры о *тотипотентности* таких ядер, то в том, что они в высокой степени *полипотентны*, сомневаться не приходится. Ясно одно – многие неиспользованные гены клеток кожи или крови могут реактивироваться и обеспечить образование нервов, желудка и сердца свободно плавающего головастика.

Дополнительные сведения и гипотезы

Клонирование

Как мы уже убедились ранее, обсуждая работы Ру и Дриша, детали экспериментальной методики могут сильно повлиять на получаемые результаты. Незначительное изменение процедуры клонирования ядер леопардовой лягушки привело к тому, что ядра, взятые даже на поздней стадии развития, обеспечивали развитие нормальной личинки. Салли Хеннен (Hennen, 1970) показала, что эффективность действия ядер донора можно увеличить, обработав их перед трансплантацией спермином или охладив яйца после пересадки, чтобы дать ядру время для адаптации к цитоплазме яйца. Обрабатывая таким способом ядра энтодермальных клеток, взятых у зародыша леопардовой лягушки на стадии хвостовой почки, и пересаживая затем эти ядра в энуклеированные яйца, Хеннен в 60% случаев получала нормальных личинок (в контрольных опытах процент таких личинок был равен нулю). Однако обработка ядер, взятых из дифференцированных клеток кожи взрослых лягушек, спермином не приводила к развитию взрослых особей из энуклеированных яиц, в которые пересаживали эти ядра.

Клонирование человека из дифференцированных клеток, похоже, стало задачей некоторых журналистов и писателей (писатели задавались целью воспроизводить важных политических деятелей, таких, как Гитлер или Кеннеди, а журналисты возмечтали распространить эту методику на атлетов и кинозвезд). Из предыдущего обсуждения очевидно, что клонирование полностью развитого индивидуума из дифференцированных клеток – невероятно трудное дело, да и результаты этих опытов не вполне убедительны. Даже у амфибий ядра дифференцированных клеток, взятые у взрослого животного, не способны после их пересадки в активированные и энуклеированные яйца обеспечить развитие из этих яиц взрослого животного.

Но даже если бы и удалось вырастить взрослых лягушек из яиц, в которые были пересажены ядра дифференцированных клеток, то этот результат

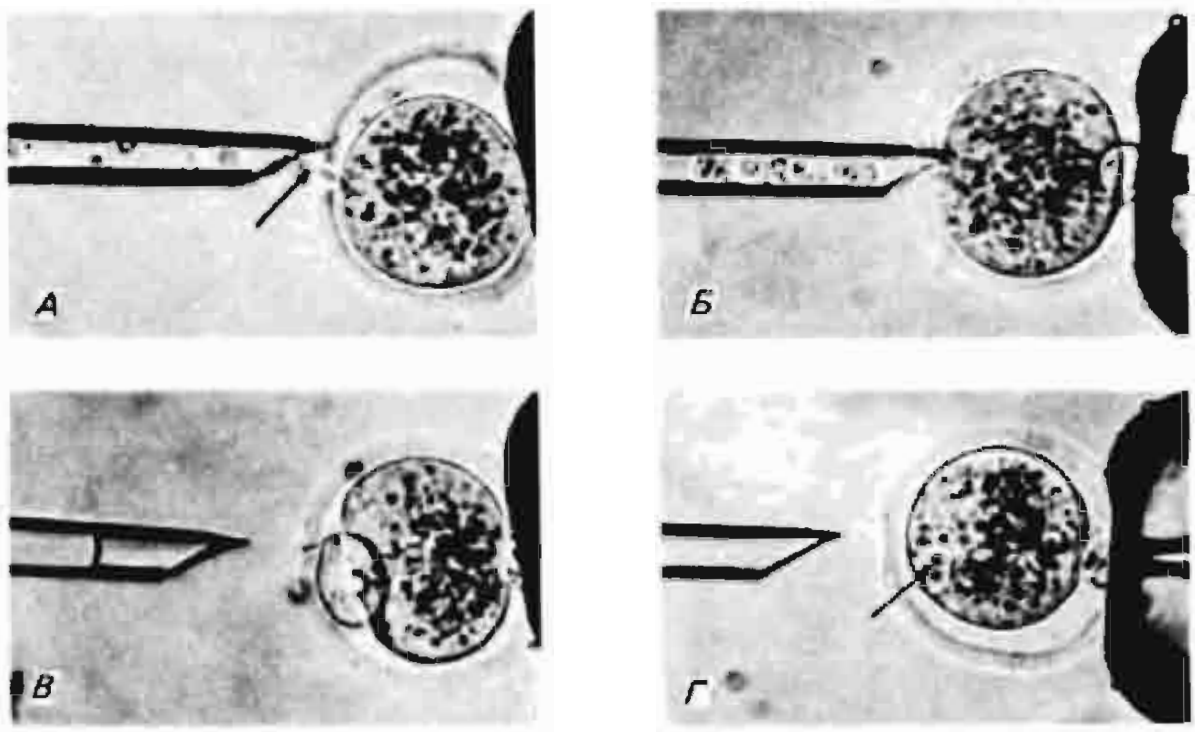


Рис. 9.16. Процедура переноса ядер в активированное энуклеированное яйцо млекопитающего. Одноклеточный зародыш, инкубируемый в среде с колцемидом и цитохалазином, удерживают на месте присасывающей пипеткой. Энуклеирующей пипеткой прокалывают прозрачную оболочку (zona pellucida) и втягивают в пипетку прилежащую к пронуклеусам клеточную (плазматическую) мембрану вместе с частью клетки, содержащей пронуклеусы. Затем энуклеирующую пипетку вытягивают из яйца (*А*) и тем самым удаляют из него содержащую пронуклеусы цитоплазму. Клеточная мембрана остается неразрушенной; стрелкой указана связь с плазматической мембраной яйца. *Б*. В пипетке клеточная мембрана образует пузырек с цитоплазмой и пронуклеусами внутри. *В*. Этот пузырек вместе с вирусом Сендай вводят в перивителлиновое пространство между прозрачной оболочкой и мембраной другой энуклеированной зиготы. *Г*. Вирус Сендай способствует слиянию энуклеированного яйца с окруженными мембраной пронуклеусами, что позволяет им попасть в клетку (стрелка). Полярное тельце, лежащее возле присасывающей пипетки, в реакцию слияния не вступает. (*Из* McGrath, Solter, 1983; с любезного разрешения авторов.)

нельзя экстраполировать на человека. Не говоря уже об этических проблемах, при работе с человеческим материалом исследователь сталкивается с многочисленными трудностями. Если у самки амфибий одновременно созревают сотни яиц, то у женщины ежемесячно образуется очень мало зрелых яиц. Кроме того, цитоплазма из яйцеклетки женщины может существенно отличаться от цитоплазмы яйцеклетки лягушки по своей способности воспринимать сигналы, исходящие из ядра клетки, которая находится на более продвинутой стадии развития.

Пересадки ядер были впервые осуществлены у мышей. С этой целью у одной зиготы удаляли оба пронуклеуса и замещали их пронуклеусами, взятыми из другой зиготы (McGrath, Solter, 1983). Процедура этого опыта показана на рис. 9.16. Сначала одноклеточных зародышей инкубируют в среде с цитохалазином и колхицином, чтобы ослабить микрофиламенты и микротрубочки цитоскелета. Затем зародыша удерживают на месте с помощью присасывающей пипетки, а пипеткой для энуклеации прокалывают прозрачную оболочку (zona pellucida) яйца. Цитоплазматическую мембрану клетки энуклеирующей пипеткой не прокалывают, а лишь нажимают ею на область, где находятся пронуклеусы, и втягивают внутрь пипетки этот участок мембраны вместе с прилежащей к нему цитоплазмой и пронуклеусами (*А*). Затем пипетку оттягивают и тем самым цитоплазму с пронуклеусами отделяют от яйца. Эта цитоплазма окружена плазматической мембраной (*Б*). Пипетку с пронуклеусами, окруженными мембраной, погружают в каплю, содержащую инактивированный вирус Сендай, который вызывает слияние мембран. После всасывания некоторого количества вируса пипетку приближают к другой зиготе, из которой таким же образом были удалены пронуклеусы. Прокалывают прозрачную оболочку и вводят пронуклеусы вместе с окружающей их мембраной в перивителлиновое пространство между оболочкой яйца и его плазматической мембраной (*В*). Затем зародыш инкубируют при температуре 37 °С до момента слияния мембраны яйца-хозяина и донора ядер (*Г*). Таким образом два пронуклеуса донора попадают в цитоплазму хозяина. Через пять дней культивирования зародыши достигают стадии бластоцисты, и их можно имплантировать в матку приемной псевдобеременной взрослой самки. Родившийся мышонок имеет фенотип мыши, служившей донором ядер.

Свыше 90% энуклеированных зигот мыши, получивших ядра из других зигот, успешно развивались до стадии бластоцисты. Когда же в энуклеированные зиготы пересаживали ядра 4-клеточных

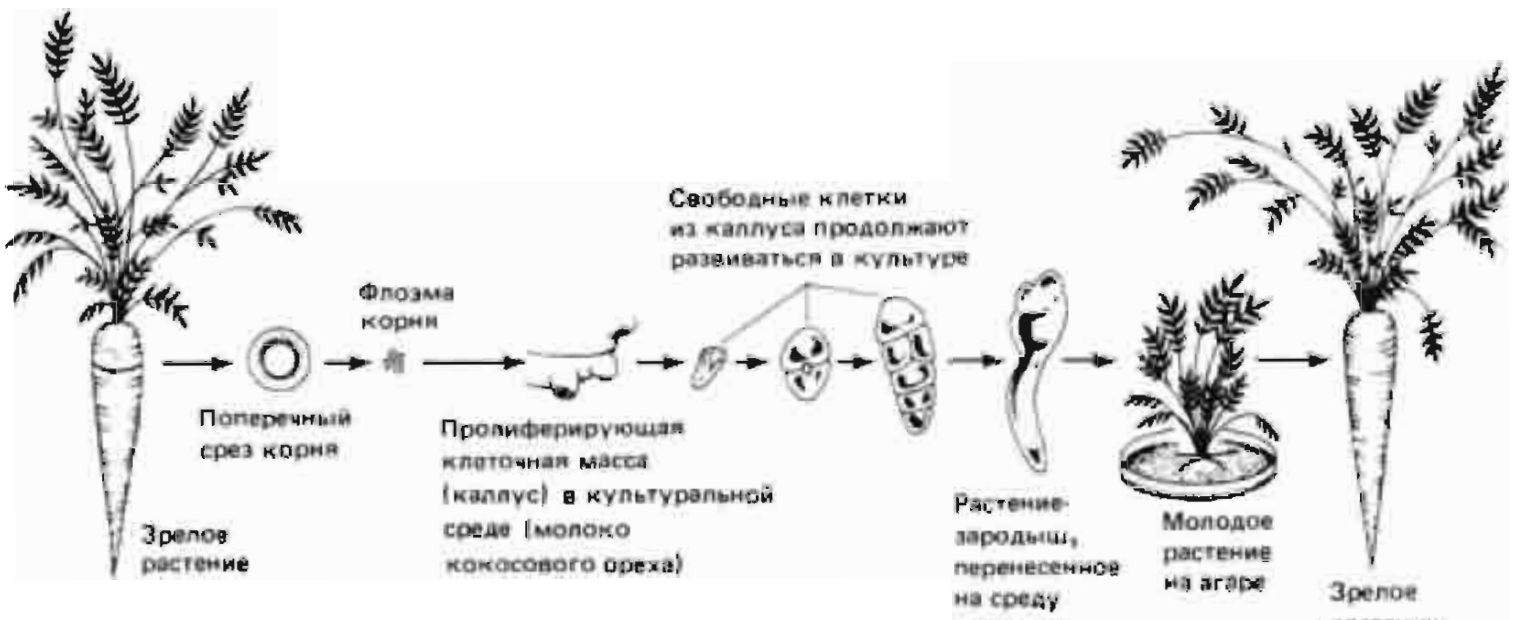


Рис. 9.17. Опыты Стьюарда, демонстрирующие тотипотентность клеток флоэмы моркови.

зародышей, ни одна зигота (из 81) не достигала стадии бластоцисты. Точно так же ядра из клеток 8-клеточного зародыша и из клеток внутренней клеточной массы были не способны поддерживать развитие до предимплантационных стадий (McGrath, Solter, 1984). В отличие от морских ежей и амфибий у мышей ядра ранних бластомеров (которые, как известно, являются тотипотентными) не способны обеспечить полное развитие. Эти опыты не удаются, по-видимому, из-за того, что ядра бластомеров не могут правильно функционировать в цитоплазме зиготы. Таким образом, вряд ли стоит серьезно относиться к идее (высказанной в сентябре 1984 г. в журнале «National Examiner») о клонировании второго Элвиса Пресли из его дифференцированной клетки. Однако свойства ранних бластомеров не у всех млекопитающих одинаковы; разные виды сильно различаются по времени активации и имплантации зародышей в матку. Недавно появилось сообщение (Willadsen, 1986) о том, что, используя модифицированную методику трансплантации ядер, автор получил ягнят из зигот, в которые были пересажены ядра бластомеров 8-клеточного зародыша. У мыши ядра бластомеров не способны направлять развитие зиготы, а у овцы они, по-видимому, могут это делать. Если указанное сообщение подтвердится, его результаты будут иметь огромное значение для сельского хозяйства.

Случаи несомненной способности ядер клеток взрослого организма обеспечивать развитие другого взрослого организма обнаружены только у растений. Эта способность чрезвычайно четко продемонстрирована на клетках моркови и табака. В 1958 г. Стюард и его коллеги разработали методику, позволившую получить из дифференцированной ткани корня моркови целое новое растение (рис. 9.17). Из корня моркови изолировали маленькие кусочки флоэмы и вращали в больших колбах, содержащих молоко кокосового ореха (которое на самом деле является его жидким эндоспермом). Оно содержит различные факторы и питательные вещества, необходимые для роста растений, а также гормоны, необходимые для их дифференцировки. В этих условиях клетки флоэмы делятся и формируют неорганизованную ткань, называемую **каллусом.** Непрерывное вращение вызывает выталкивание отдельных клеток из каллуса в суспензию. Из этих единичных суспендированных клеток образуются корнеподобные узелки, которые продолжают расти все время, пока остаются в суспензии. Если эти узелки перенести на среду, уплотненную агаром, то из них развиваются остальные части растения; в конце концов образуются целые растения моркови, способные к размножению (Steward et al., 1964; Steward, 1970).

Весь процесс развития от единичной клетки до цветущего растения в условиях вращающейся культуры наблюдать невозможно, однако Вазил и Хильдебрандт (Vasil, Hildebrandt, 1965) проследили эти события, изолировав единичные клетки табака и наблюдая за их развитием или непосредственно, или с помощью цейтраферной киносъемки. Как и из клеток моркови, из клеток табака образовывались растеньица, которые могли расти и давать семена.

Клетки табака дают нам еще один пример тотипотентности ядер. Все гены, необходимые для образования целого растения, имеются в ядре дифференцированной клетки. Однако растения и животные развиваются по-разному. Вегетативное размножение отводками (т. е. частями растения, которые, получая питательные вещества, регенерируют недостающие части) представляет собой обычный прием в практике сельского хозяйства. В отличие от животных (у которых половые клетки обособляются

очень рано в развитии в виде отчетливой клеточной линии) у растений в норме гаметы образуются из соматических клеток. Поэтому нет ничего удивительного в том, что единичная клетка может давать начало другому типу клеток и сформировать генетически однородный клон (от греч. klon, что означает «ветвь»).

Итак, мы можем сделать вывод, что дифференциальная утрата генов не является причиной дифференцировки. Ядра дифференцированных клеток содержат бóльшую часть, а возможно, и все гены зиготы; эти гены экспрессируются в соответствующих условиях. Следовательно, процесс дифференцировки включает в себя селективную экспрессию разных частей генома. Нам предстоит более глубокое исследование проблемы постоянства генома и дифференциальной экспрессии генов с привлечением методов молекулярной биологии и клонирования генов. В следующей главе обсуждение этой проблемы будет продолжено на уровне современной молекулярной биологии.

ЛИТЕРАТУРА

Beermann W. (1952). Chromomeren Konstanz und spezifische modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. Chromosoma **5**, 139–198.

Briggs R. (1979). Genetics of cell type determination. Int. Rev. Cytol. [Suppl.] **9**, 107–127.

Briggs R., King T.J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **38**, 455–463.

Burkholder G.D. (1976). Whole mount electron microscopy of polytene chromosome from *Drosophila melanogaster*. Can. J. Genet. Cytol. **18**, 67–77.

Deuchar E.M. (1975). *Xenopus*: The South African Clawed Frog. Wiley-Interscience, New York.

DiBerardino M.A. (1987). Genomic potential of differentiated cells analyzed by nuclear transplantation. Am. Zool. **27**, 623–644.

DiBerardino M.A., King T.J. (1967). Development and cellular differentiation of neural nuclear transplants of known karyotypes. Dev. Biol. **15**, 102–128.

Dumont J.N., Yamada T. (1972). Dedifferentiation of iris epithelial cells. Dev. Biol. **29**, 385–401.

Fischberg M., Blackler A.W. (1961). How cells specialize. Sci. Am. **205(3)**, 124–170.

Fristrom J.W., Raikow R., Petri W., Stewart D. (1969). In vitro evagination and RNA synthesis in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. In: E.W. Hanly (ed.), Problems in Biology: RNA in Development. University of Utah Press, Salt Lake City, pp. 381–402.

Gehring W.J. (1969). Problems of cell differentiation in *Drosophila*. In: E.W. Hanley (ed.), Problems in Biology: RNA in Development. University of Utah Press, Salt Lake City, pp. 231–244.

Gurdon J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelial cells of feeding tadpoles. J. Embryol. Exp. Morphol. **10**, 622–640.

Gurdon J.B. (1968). Transplanted nuclei and cell differentiation. Sci. Am. **219(6)**, 24–35.

Gurdon J.B. (1977). Egg cytoplasm and gene control in development. Proc. R. Soc. Lond. [Biol.] **198**, 211–247.

Gurdon J.B., Laskey R.A., Reeves O.R. (1975). The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized cells of adult frogs. J. Embryol. Exp. Morphol. **34**, 93–112.

Gurdon J.B., Uehlinger V. (1966). "Fertile" intestinal nuclei. Nature **210**, 1240–1241.

Hadorn E. (1968). Transdetermination in cells. Sci. Am. **219(5)**, 110–120.

Hennen S. (1970). Influence of spermine and reduced temperature on the ability of transplanted nuclei to promote normal development in eggs of *Rana pipiens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **66**, 630–637.

Judd G.H., Young M.W. (1973). An examination of the one cistron–one chromomere concept. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **38**, 573–579.

King T.J. (1966). Nuclear transplantation in amphibia. Methods Cell Physiol. **2**, 1–36.

King T.J., Briggs R. (1956). Serial transplantation of embryonic nuclei. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **21**, 271–289.

Markert C.L., Ursprung H. (1971). Developmental Genetics. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

McGrath J., Solter D. (1983). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. Science **220**, 1300–1302.

McGrath J., Solter D. (1984). Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. Science **226**, 1317–1319.

McKinnell R.G. (1978). Cloning: Nuclear Transplantation in Amphibia. University of Minnesota Press, Minneapolis.

Orr N.H., DiBerardino M.A., McKinnell R.G. (1986). The genome of frog erythrocytes displays centuplicate replications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 1369–1373.

Reyer R.W. (1954). Regeneration in the lens in the amphibian eye. Q. Rev. Biol. **29**, 1–46.

Smith L.D. (1956). Transplantation of the nuclei of primordial germ cells into enucleated eggs of *Rana pipiens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **54**, 101–107.

Steward F.C. (1970). From cultured cells to whole plants: The induction and control of their growth and morphogenesis. Proc. R. Soc. Lond. [Biol.], **175**, 1–30.

Steward F.C., Maples M.O., Smith J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. Am. J. Bot. **45**, 693–703.

Steward F.C., Maples M.O., Kent A.E., Holsten R.D. (1964). Growth and development of cultured plant cells. Science **143**, 20–27.

Swanson C.P., Merz T., Young W.J. (1981). Cytogenetics: The Chromosome in Division, Inheritance, and Evolution. 2nd Ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Tjio J.H., Puck T.T. (1958). The somatic chromosomes of man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **44**, 1229–1237.

Ursprung H., Smith K.D., Sofer W.H., Sullivan D.T. (1968). Assay systems for the study of gene function. Science **160**, 1075–1081.

Vasil V., Hildebrandt A.C. (1965). Differentiation of tobacco plants from single isolated cells in microcultures. Science **150**, 889–892.

Wabl M.R., Brun R.B., DuPasquier L. (1975). Lymphocytes of the toad *Xenopus laevis* have the gene set for promoting tadpole development. Science **190**, 1310–1312.

Willadsen S.M. (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. Nature **320**, 63–65.

Yamada T. (1966). Control of tissue specificity: The pattern of cellular synthetic activities in tissue transformation. Am. Zool. **6**, 21–31.

Глава 10

Тождество геномов и дифференциальная экспрессия генов: молекулярные исследования

Ищи простоту и не верь ей.

АЛЬФРЕД НОРТ УАЙТХЕД (1919)

Для такого исследования необходимо изолировать и накопить в большом количестве не клеточные ядра и даже не отдельные хромосомы, а определенные части определенных хромосом из определенных клеток; только тогда химик сможет анализировать [наследственный материал] более углубленно, чем морфолог.

ТЕОДОР БОВЕРИ (1904)

Введение

Эмбриологи задавались вопросом, идентичны ли наборы генов в клетках разного типа одного и того же организма тому набору генов, который содержится в зиготе? Молекулярные биологи интересовались аналогичным вопросом: не является ли ДНК в клетках разного типа одинаковой, несмотря на различия в белках, синтезируемых этими клетками? Проблема осталась той же, но технические приемы, используемые для ее решения, усложнились. Вместо анализа отдельных органов или зародышей мы можем теперь рассмотреть индивидуальные последовательности ДНК и выяснить, присутствуют ли в клетках одни и те же гены и участвуют ли они в активном синтезе РНК. Прежде чем продолжить рассмотрение этой проблемы, нам следует познакомиться с методами молекулярной биологии.

Методы молекулярной биологии

Гибридизация нуклеиновых кислот

Современные представления о генах эукариот и их РНК-продуктах были сформулированы главным образом на основе опытов по **гибридизации нуклеиновых кислот**. Методика гибридизации включает отжиг одноцепочечных фрагментов РНК и ДНК, позволяющий комплементарным цепям образовывать двухцепочечные гибриды. Например, если нуклеиновые кислоты разрезаны на небольшие фрагменты и каждый фрагмент диссоциирован на отдельные нити (т.е. денатурирован), то каждая нить по прошествии достаточного времени может найти комплементарного партнера и соединиться с ним. Условия ренатурации должны быть таковы, чтобы специфические гибриды комплементарных цепей сохранялись, а неспецифические гибриды диссоциировали. Обычно эти условия обеспечиваются изменением температуры или ионной силы раствора, в котором проходит ренатурация (Wetmur, Davidson, 1968).

Сходным образом следует ожидать, что РНК, синтезируемая на каком-либо участке ДНК, будет связываться с цепью, на которой она синтезирована. Таким образом, предполагается, что РНК специфически гибридизуется с геном, который ее кодирует. Для определения уровня гибридизации одну из цепей нуклеиновой кислоты обычно метят радиоактивным изотопом. Возьмем для примера один эксперимент. Нерадиоактивную ДНК из печени лягушки можно денатурировать (ее цепи разделяются в щелочи) и иммобилизовать на нитроцеллюлозном фильтре. Радиоактивную РНК можно получить при введении радиоактивных предшественников РНК в другую лягушку или в культуру клеток лягушки.

Затем выделяют рибосомы и экстрагируют из них радиоактивную рибосомную 28S-РНК (рРНК), которую добавляют к фильтрам с ДНК. Полагают, что радиоактивная РНК будет связываться только с теми участками ДНК, которые содержат гены для 28S-рРНК. Количество связавшейся РНК можно определить, измерив радиоактивность фильтров после удаления несвязавшейся РНК.

Схема такого опыта и его результаты показаны на рис. 10.1. ДНК выделяли из нормальных головастиков с двумя ядрышками на клетку, а также из гомозиготных мутантов, полностью лишенных ядрышек, и гетерозиготных головастиков с одним ядрышком на клетку (Wallace, Birnstiel, 1966). ДНК, выделенную из каждой группы, денатурировали. По 50 мкг ДНК наносили на каждый из нескольких десятков бумажных фильтров: в одной группе фильтров – денатурированная ДНК из головастиков дикого типа; во второй – ДНК из мутантных головастиков; в третий – ДНК из гетерозиготных головастиков. Затем различные количества радиоактивной 28S-рРНК гибридизовали с тремя типами ДНК на фильтрах. На одни фильтры наносили небольшие количества радиоактивной ДНК, на другие – большие количества. Оказалось, что радиоактивная рРНК хорошо связывается с ДНК из нормальных головастиков, насыщая в конечном счете всю доступную ДНК. С ДНК из клеток головастиков, лишенных ядрышек, рРНК не связывалась, тогда как ДНК из гетерозиготных головастиков связывала лишь половину того количества рибосомной РНК, которое связывалось с ДНК из нормальных головастиков. Таким образом, было показано, что гены 28S-рРНК в геноме головастиков транскрибируются в области ядрышек.

Одна из технических трудностей, связанных с гибридизацией нуклеиновых кислот, заключается в сложности получения молекул РНК с высокой радиоактивностью. Это затруднение можно преодолеть с помощью выделения РНК и получения комплементарной ДНК-копии (кДНК) в присутствии радиоактивных предшественников. Она может быть синтезирована в пробирке, содержащей РНК, короткий фрагмент ДНК, называемый праймером (затравкой), радиоактивные предшественники ДНК и вирусный фермент – обратную **транскриптазу**. Этот фермент способен синтезировать ДНК на РНК-матрице (рис. 10.2). Поскольку ДНК синтезируется in vitro, проблем с разведением радиоактивных предшественников не возникает. Кроме того, такая кДНК может гибридизоваться как с геном, синтезирующим РНК (хотя и с некодирующей цепью), так и с самой РНК. Это оказывается чрезвычайно полезным при регистрации небольших количеств специфических РНК.

Клонирование генов

Сравнительно недавно, используя методы гибридизации нуклеиновых кислот, биологам развития на основе подхода, названного клонированием генов, удалось выделить отдельные гены. Если бы кто-то захотел изолировать, например, отдельный ген человека, то он столкнулся бы с неразрешимыми проблемами. Геном человека содержит ДНК в количестве, достаточном для кодирования примерно 2×10^5 генов размером около 15 000 пар оснований каждый. Обычные биохимические процедуры не позволяют отделить один ген от всех остальных. Однако техника клонирования генов позволяет выделить специфические участки ДНК, а также провести их амплификацию до огромного числа копий.

Первый этап в этой процедуре заключается в разрезании ядерной ДНК на различные фрагменты. Это осуществляется с помощью инкубации ДНК в присутствии **рестрикционной эндонуклеазы** (обычно называемой «рестриктазой»). Эти эндонуклеазы являются, как правило, бактериальными ферментами, которые узнают специфические последовательности ДНК (табл. 10.1) и расщепляют ДНК в этих участках (Nathans, Smith, 1975). Например, если ДНК человека инкубируют с ферментом *Bam*H1 (выделенным из *Bacillus amyloliquifaciens*, штамм H), то ДНК разрезается в каждом участке, где имеется последовательность ГГАТЦЦ. Продуктом реакции являются различные по длине фрагменты ДНК, содержащие Г на одном конце и ГАТЦЦ на другом (рис. 10.3).

Следующий этап – включение полученных фрагментов ДНК в **векторы для клонирования**. Эти векторы представляют собой кольцевые молекулы ДНК, которые реплицируются в бактериальных клетках независимо от бактериальной хромосомы. Обычно используются плазмиды, устойчивые к тем или иным лекарственным препаратам, или специально модифицированные вирусы, которые особенно эффективны в случае клонирования больших фрагментов ДНК. Подобную плазмиду можно сконструировать таким образом, чтобы она содержала только один чувствительный к *Bam*H1 сайт. Ее можно раскрыть при инкубации с данной рестриктазой. После раскрытия она смешивается с фрагментированной ДНК. Во многих случаях нарезанные фрагменты ДНК оказываются включенными в векторы благодаря комплементарности их концов открытым концам вектора. Затем эти фрагменты могут соединяться ковалентно в растворе, содержащем фермент **ДНК-лигазу**. Итогом всей процедуры являются бактериальные плазмиды, каждая из которых содержит одиночный фрагмент ДНК человека. Их называют **рекомбинантными плазмидами** или просто **рекомбинантной ДНК** (Cohen et al., 1973; Blattner et al., 1978).

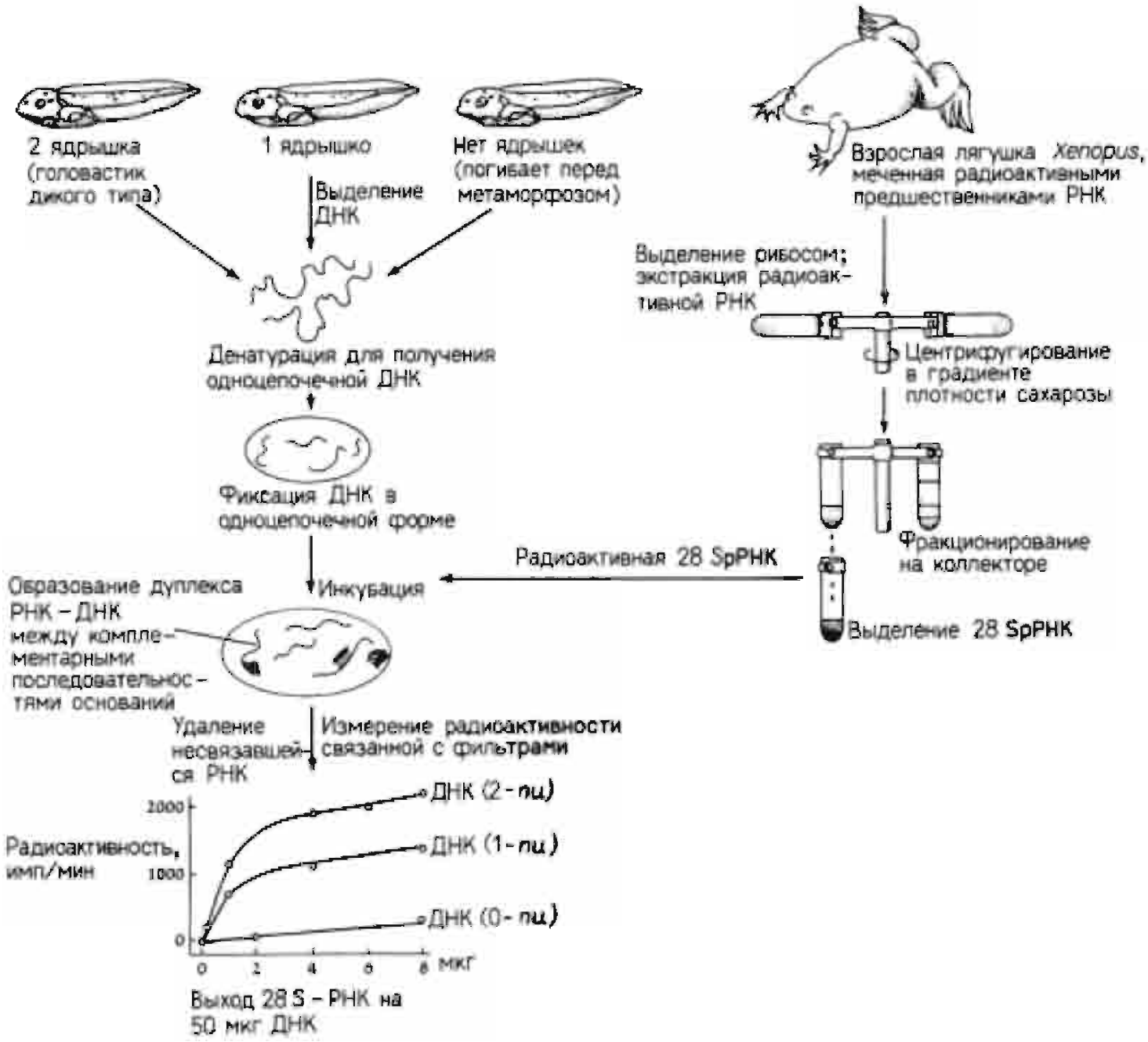


Рис. 10.1. Опыт по гибридизации нуклеиновых кислот, из которого становится ясно, что ядрышко кодирует рибосомную 28S-РНК. Из содержащих 2, 1 и 0 ядрышек клеток головастиков экстрагировали по отдельности ДНК. Полученную ДНК денатурировали (делали одноцепочечной) и определенное количество одноцепочечной ДНК запекали на нитроцеллюлозных фильтрах. Одновременно из клеток взрослых лягушек получали радиоактивную 28S-рРНК путем выделения рибосом и последующего разделения трех основных видов РНК. Радиоактивную 28S-рРНК инкубировали на ДНК-содержащих фильтрах в условиях, когда она могла присоединяться к комплементарным участкам ДНК. Затем измеряли радиоактивность фильтров в сцинтилляционном счетчике.



Рис. 10.2. Метод получения комплементарной ДНК (кДНК). Бо́льшая часть информационных РНК (мРНК) содержит протяженную последовательность из остатков аденозина (AAA_n) на 3'-конце молекул (см. гл. 11); поэтому, экспериментаторы гибридизуют «затравку», состоящую из 15 остатков дезокситимидина ($дT_{15}$), с 3'-концом мРНК. Затем с помощью обратной транскриптазы синтезируют комплементарную цепь ДНК, начиная от затравки $дT_{15}$. кДНК можно выделить с помощью повышения pH раствора, что вызывает денатурацию двухцепочечного гибрида и деградацию РНК.

Таблица 10.1. Широко используемые рестриктазы

Фермент	Источник	Сайт узнавания и расщепления[1]
*Eco*RI	*Escherichia coli*	G↓AATTC CTTAA↑G
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquifaciens*	G↓GATCC CCTAG↑G
*Hind*III	*Haemophilus influenzae*	A↓AGCTT TTCGA↑A
*Sal*I	*Streptomyces albus*	G↓TCGAC CAGCT↑G
*Sma*I	*Serratia marcescens*	CCC↓GGG GGG↑CCC
*Hha*I	*Haemophilus haemolyticus*	GCG↓C C↑GCG
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	GG↓CC CC↑GG
*Alu*I	*Arthrobacter luteus*	AG↓CT TC↑GA

[1] Все сайты узнавания рестриктаз имеют центральную симметрию. Двухцепочечная последовательность, прочитанная в одном направлении, идентична последовательности, прочитанной в обратном направлении.

На рис. 10.3 показана плазмида pBR322, которая часто используется молекулярными биологами в качестве клонирующего вектора. Она несет два гена устойчивости к антибиотикам – tc^R, который обеспечивает устойчивость к тетрациклину, и Ap^R, который делает бактерии устойчивыми к ампициллину. Эти гены устойчивости к антибиотикам, столь нежелательные для медиков, становятся незаменимыми для генных инженеров, поскольку один из *Bam*HI-сайтов в этой плазмиде расположен в середине гена tc^R. Предполагаемые рекомбинантные плазмиды, полученные описанным ранее способом, затем инкубируют с клетками *E. coli* дикого типа, чувствительными к обоим антибиотикам, в условиях, позволяющих бактериям захватить эти плазмиды. При этом не каждая бактерия включает плазмиду и не каждая плазмида включает чужеродный ген, т. к. липкие концы плазмиды в сайте рестрикции могут ренатурировать друг с другом. Для отбора тех бактерий, которые включили плазмиды, обработанные клетки *E. coli* выращивают на агаре в присутствии ампициллина. При этом выживают только те бактерии, которые включили плазмиды. Затем часть каждой жизнеспособной колонии переносится на агар, содержащий тетрациклин. Если бактерии продолжают рост, то, следовательно, ген tc^R плазмиды остался интактным и эта плазмида восстановилась в результате простого соединения собственных концов друг с другом. Если бактерии, выросшие на среде с ампициллином, *не выживают* на среде с тетрациклином, то ген устойчивости к тетрациклину в плазмиде уже не функционирует. Это означает, что ген tc^R разорван фрагментом фермента рестрикции из чужого генома. Со среды, содержащей ампициллин, отбираются те колонии, которые не росли на среде, содержащей тетрациклин. Эти колонии следует проверить на присутствие определенного гена.

Клетки из каждой колонии *E. coli*, содержащей рекомбинантные плазмиды, помещают на нитроцеллюлозный фильтр. После лизиса клеток клеточная ДНК присоединяется к фильтру. Затем цепи ДНК разделяют с помощью нагревания и инкубируют фильтр в растворе, содержащем радиоактивную РНК (или ее кДНК-копию) для гена, выбранного для клонирования. Если плазмида содержит этот ген, то ДНК этого гена должна присутствовать на бумаге и только эта ДНК обладает способностью присоединять радиоактивную РНК или кДНК. Именно поэтому соответствующие места фильтра окажутся радиоактивными. Радиоактивность этих участков регистрируется с помощью радиоавтографии. Для этого чувствительная рентгеновская пленка помещается поверх обработанной бумаги. Электроны с высокой энергией, излучаемые радиоактивной РНК, сенсибилизируют зерна серебра в пленке, вызывая их потемнение при последующем проявлении. В результате над каждой колонией, содержащей рекомбинантную плазмиду с определенным геном, образуется темное пятно (рис. 10.3). Эти колонии изолируют и выращивают вновь. В итоге можно получить многие триллионы клеток, каждая из которых содержит сотни рекомбинантных плазмид.

Рекомбинантные плазмиды можно отделить от хромосомы *E. coli* с помощью центрифугирования. Фрагмент ДНК человека, содержащий интересующий нас ген, высвобождается при инкубации плазмид с *Bam*HI. Этот фрагмент затем отделяют от плазмидной ДНК. Таким образом, экспериментатор получает микрограммы очищенной ДНК, содержащей определенный ген. [Хотя описанная процедура выглядит вполне логичной и простой, число колоний, которые следует скринировать, достигает часто астрономических чисел. Число случайных фрагментов, которые должны быть клонированы, для того чтобы получить интересующий вас ген, возрастает с увеличением сложности генома организма[1]. Чтобы клонировать с 99%-ной надежностью желаемый ген из *E. coli*, необходимо проанализировать примерно 1500 колоний. Для млекопитающих это число возрастет до 800 000; вместо

[1] Сложность в данном случае определяется числом генов различного типа, содержащихся в клеточном ядре.

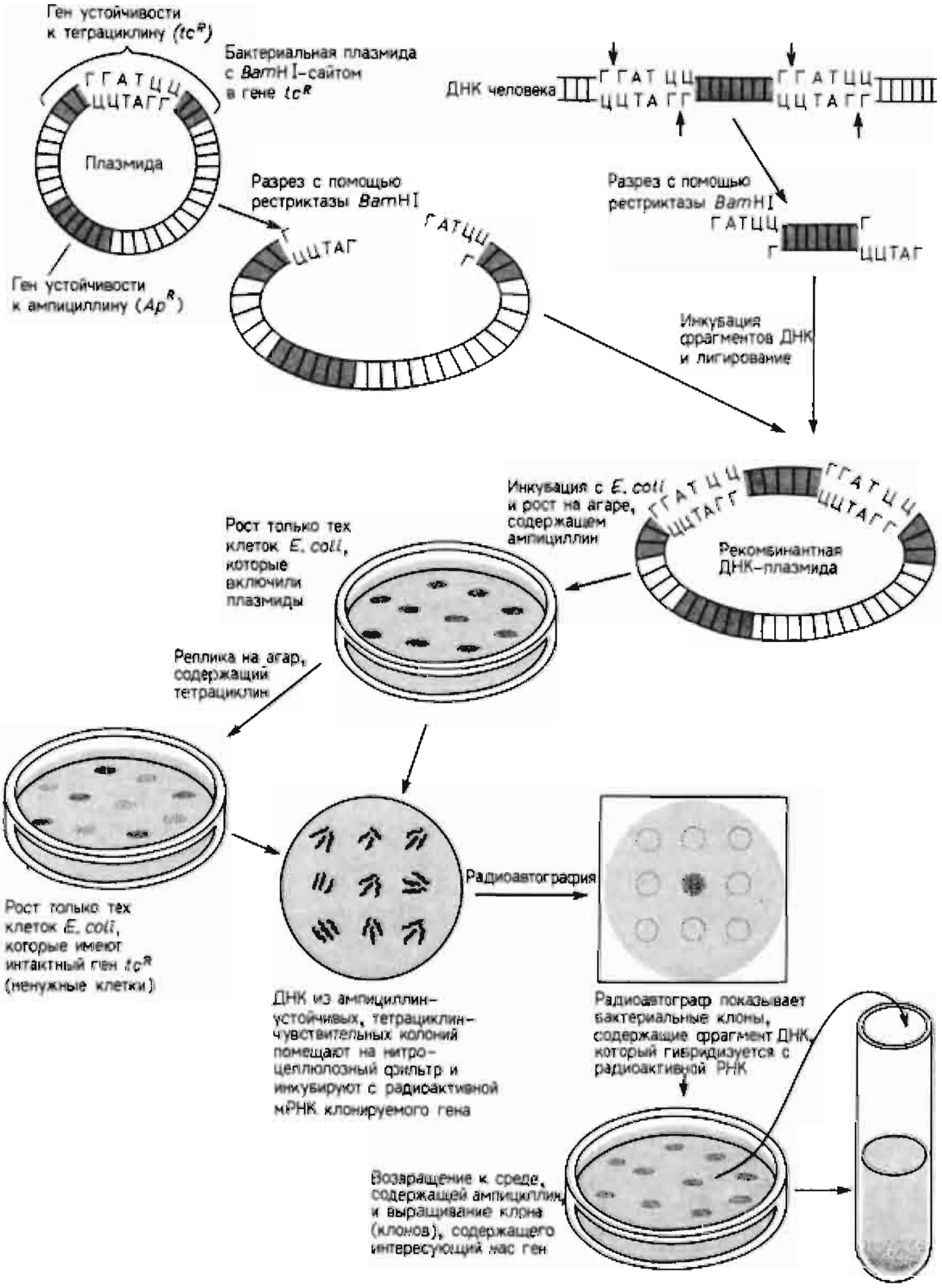


Рис. 10.3. Стандартная схема клонирования ДНК. В качестве примера используется введение последовательности ДНК человека в плазмиду с одним *Bam*HI-чувствительным сайтом.

того чтобы выращивать бактерии в стандартных чашках Петри, колонии зачастую выращивают на подносах из кафетериев (Blattner et al., 1978; Slightom et al., 1980).]

При альтернативном методе клонирования в качестве исходного материала используется цитоплазматическая РНК, а не геномная ДНК. Как показано на рис. 10.2, можно получить цепи ДНК, комплементарные цепям мРНК. На следующем этапе процедуры одноцепочечную ДНК с помощью ДНК-полимеразы можно перевести в двухцепочечную. Полученные цепи ДНК после присоединения к ним подходящих «концов» могут быть встроены в плазмиды. Пришивка фрагментов ГАТЦЦ/Г к срезанным концам фрагмента ДНК создает искусственный рестрикционный *Bam*HI-сайт и позволяет фрагменту ДНК самостоятельно встроиться в плазмиду, разрезанную ферментом.

Такие коллекции клонов, полученных из мРНК, называют обычно **библиотеками**. Можно, например, получить библиотеку для печени мыши, которая будет содержать гены, участвующие в синтезе белков печени. Можно также получить библиотеку для вегетативного полушария ооцита *Xenopus*, которая будет представлять мРНК, содержащуюся только в этой части клетки. Полученные подобным образом гены представляют значительный интерес, поскольку они не содержат интронов. После добавления к бактериальным клеткам эти гены могут транскрибироваться и затем транслироваться в кодируемые ими белки.

Дополнительные сведения и гипотезы

Когда ген клонирован...

... предстоит еще проделать большую работу. В последующих главах будет наглядно показано, что клонированные гены революционизировали наши представления о развитии. Некоторые методы использования рекомбинантных ДНК описаны ниже.

Секвенирование

Результаты секвенирования дают нам представление о структуре кодируемого белка и позволяют идентифицировать регуляторные последовательности ДНК, общие для ряда генов. (Например, в следующей главе мы увидим, что все гены, регулируемые гормоном прогестероном, содержат почти одинаковые последовательности ДНК вблизи начала участков, кодирующих белок.) Простота метода секвенирования с $д_2$НТФ (Sanger et al., 1977) сделала этот метод обычным для многих молекулярно-биологических лабораторий. С использованием фага или плазмиды, несущих клонированный ген, выделяют одну цепь кольцевой ДНК (рис. 10.4). Затем гибридизуют радиоактивную *ДНК-затравку* (примерно из 20 нуклеотидов), которая комплементарна фаговой ДНК в области, непосредственно примыкающей к 5′-концу клонированного гена. (Так как эти последовательности известны, олигонуклеотидные затравки могут быть легко синтезированы или получены из коммерческих источников.) Затравка имеет свободный 3′-конец, к которому можно добавить дополнительные нуклеотиды. ДНК с затравкой и все четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата помещают в четыре пробирки. Каждая из пробирок содержит полимеризующую субъединицу ДНК-полимеразы и один из дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов: одна прибирка содержит дидезокси-Г, другая – дидезокси-А и т. д. Структура дезокси- и дидезоксинуклеотидов представлена на рис. 10.5. Если дезоксинуклеотид лишен гидроксильной (ОН) группы при атоме углерода в 2′-положении сахара, то дидезоксинуклеотид лишен гидроксильных групп при атомах углерода в двух положениях – 2′ и 3′. Поэтому, хотя дидезоксинуклеотид может присоединяться ДНК-полимеразой к растущей цепи ДНК, он останавливает дальнейший рост цепи, поскольку из-за отсутствия 3′-гидроксильной группы к нему не может присоединиться новый нуклеотид. Если ДНК-полимераза синтезирует ДНК от затравки, то новообразованная ДНК будет комплементарна клонированному гену. В пробирке с дидезокси-А каждый раз, когда ДНК-полимераза присоединяет А к растущей цепи, существует возможность, что вместо дезокси-А будет присоединен дидезокси-А. В том случае, когда это происходит, рост цепи останавливается. Аналогичным образом в пробирке с дидезокси-Г рост цепи с некоторой вероятностью останавливается каждый раз, когда присоединяется Г. (Все это напоминает греческий народный танец, где лишь небольшая группа из потенциальных танцоров одновременно участвуют в танце.) Поскольку в каждой пробирке синтезируются миллионы цепей, каждая пробирка будет содержать популяцию цепей, синтез которых остановлен в первом из возможных положений, в последнем и, наконец, – в промежуточных положениях. Например, пробирка с дидезокси-А будет содержать

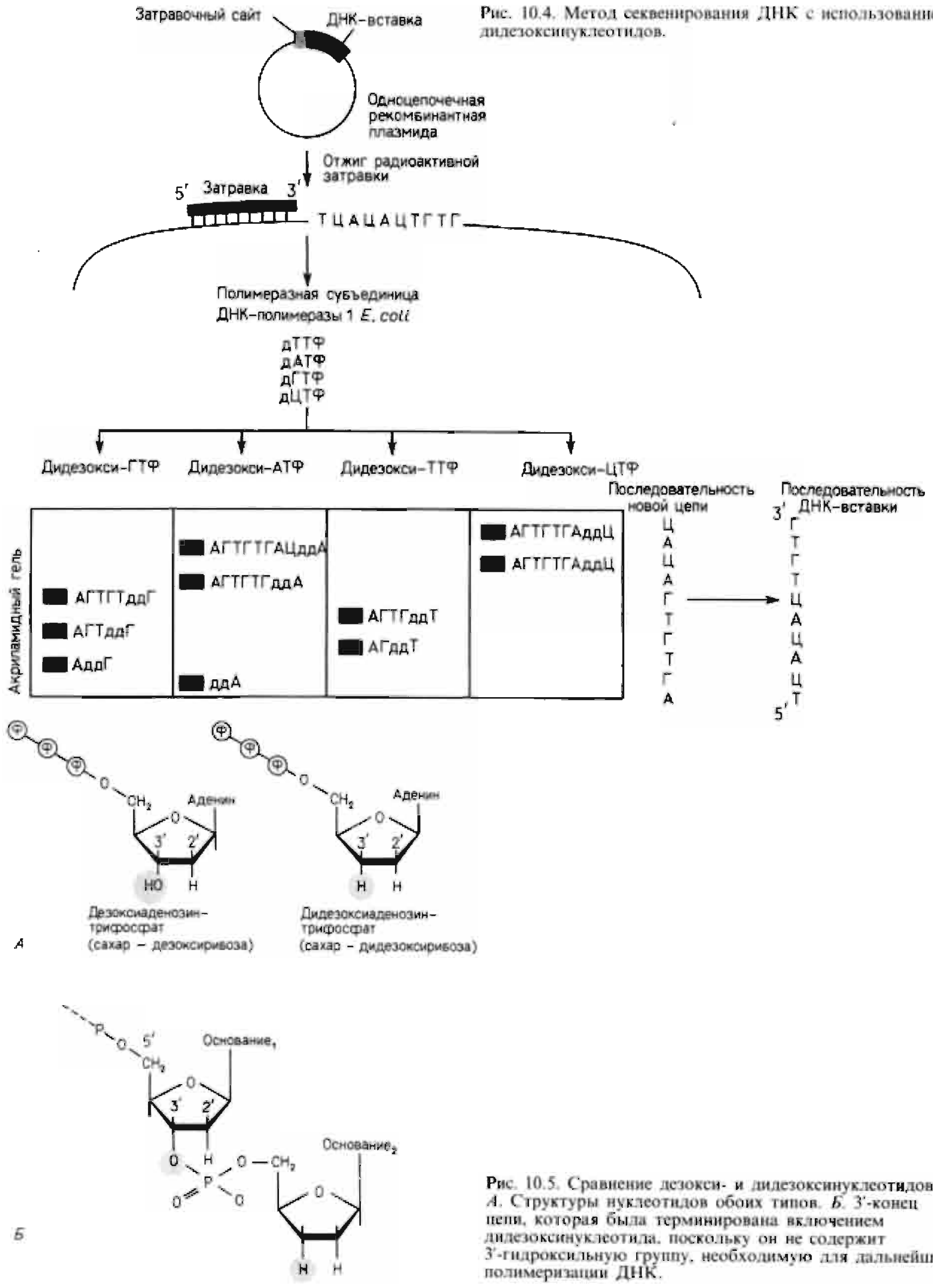


Рис. 10.4. Метод секвенирования ДНК с использованием дидезоксинуклеотидов.

Рис. 10.5. Сравнение дезокси- и дидезоксинуклеотидов. *А*. Структуры нуклеотидов обоих типов. *Б*. 3′-конец цепи, которая была терминирована включением дидезоксинуклеотида, поскольку он не содержит 3′-гидроксильную группу, необходимую для дальнейшей полимеризации ДНК.



Рис. 10.6. Пример секвенирования ДНК с помощью дидезокси-метода. (С любезного разрешения G. Guild.)

цепи различной дискретной длины, каждая из которых оканчивается остатком А.

Полученные радиоактивные фрагменты ДНК разделяют с помощью **электрофореза**. Смеси фрагментов вносят в лунки на одной стороне геля и затем пропускают через гель электрический ток. Отрицательно заряженные фрагменты ДНК мигрируют в направлении положительного полюса, при этом меньшие по размеру фрагменты движутся быстрее, чем крупные. Фрагменты с наименьшим числом нуклеотидов движутся быстрее, чем фрагменты с большим числом нуклеотидов (рис. 10.4 и 10.6). Прочитывая наборы полос, определяют последовательность ДНК, комплементарную клонированному гену.

Перенос генов

Во многих случаях желательно получить ген, модифицировать его и затем вернуть в эукариотический организм. Это осуществляется с помощью **трансфекции** – метода, посредством которого фрагменты ДНК можно ввести в хромосомную ДНК клетки. Клонированную ДНК смешивают с селективным маркерным геном (таким, как ген *тимидинкиназы* вируса *Herpes simplex*) и высокополимерной ДНК из какого-либо другого организма. Эту смесь инкубируют с фосфатом кальция; при этом образуются ДНК-содержащие кристаллы, которые фагоцитируются клетками в культуре. В случае дефицитных по тимидинкиназе клеток можно вырастить культуру в условиях, обеспечивающих выживание лишь тех клеток, которые захватили кристаллы ДНК–фосфат кальция (и потому экспрессируют ген тимидинкиназы) (Perucho et al., 1980; Robins et al., 1981). На рис. 10.7 показан опыт, в котором глобиновые гены человека смешивали с геном тимидинкиназы вируса *Herpes* и большими фрагментами ДНК хомячка. Селекция колоний на



Рис. 10.7. Трансфекция ДНК глобинового гена из генома одного вида в геном другого вида. Клонированные глобиновые гены человека, маркерный ген (ген тимидинкиназы), позволяющий проводить селекцию, и протяженные фрагменты ДНК из генома другого вида соосаждаются в виде кристаллов в фосфате кальция. Кристаллы, содержащие ДНК, захватываются клетками, и при соответствующих внутриклеточных условиях ДНК интегрируется в хромосомы клеток-хозяев. (По Watson et al., 1983.)

присутствие тимидинкиназы выявила наличие в хромосоме мыши многочисленных глобиновых генов человека, чередующихся с ДНК хомячка (Watson et al., 1983). Недавно аналогичный метод был использован для переноса генов в стволовые клетки эмбриональной карциномы мыши. Эти стволовые клетки можно интегрировать в зародышей мыши, где из них впоследствии образуется часть тканей взрослой мыши (гл. 6). При последующем спаривании таких мышей новые гены могут попадать в каждую клетку их потомства (Gossler et al., 1986).

Эффективность метода переноса с фосфатом кальция довольно низка, поэтому были разработаны другие методы. Один из них состоит в микроинъекции ДНК непосредственно в ядро (или пронуклеус) клетки (Capecchi, 1980; рис. 10.8). При хорошем навыке и специальном оборудовании можно инъецировать около 1000 клеток за час (в удачный день); при этом до 50% инъецированной ДНК интегрируется в хромосомы клеток. Этот метод был использован для введения генов β-цепи глобина человека в зиготы мыши, дефицитные по β-цепям. Развившиеся из этих зигот мыши имели функционирующие гены β-цепи глобина человека, компенсировавшие генетическое заболевание (Constantini et al., 1986).

Относительно новым методом является использование ретровирусных векторов. Ретровирусы – это РНК-содержащие опухолеродные вирусы. Внутри клетки-хозяина они синтезируют свою ДНК-копию (используя собственную обратную транскриптазу); затем копия переводится в двухцепочечную форму и интегрируется в хромосому хозяина. Эта интеграция осуществляется благодаря присутствию двух идентичных последовательностей (длинных концевых повторов) на концах ДНК. Ретровирусные векторы получены при помощи удаления генов, обеспечивающих упаковку вируса, из центральной части ретровируса мыши. Благодаря такому удалению создается свободный участок, куда можно поместить другие гены. Гены, которые были клонированы в плазмидах, могут быть выделены из них (с помощью подходящей рестриктазы) и встроены в ретровирусные векторы. Часть этого участка может быть занята селективным маркером (таким, как тимидинкиназа вируса *Herpes simplex*). Такие ретровирусные векторы инфицируют клетки мыши с эффективностью, достигающей 100%. Мышь со стабильными генами, полученными от других организмов (с помощью микроинъекции, вирусной инфекции или включения модифицированных стволовых клеток эмбриональной карциномы), называют **трансгенной мышью.**

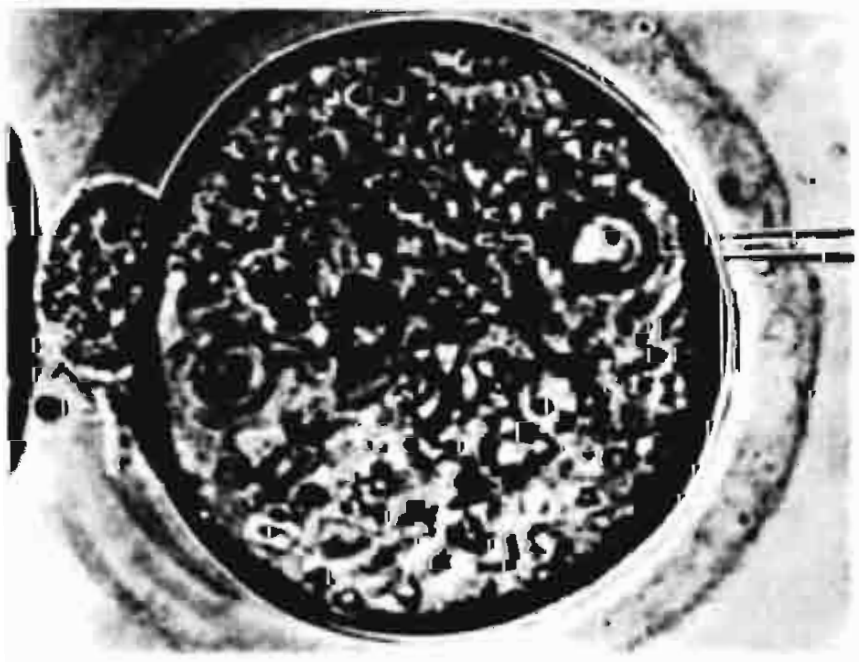


Рис. 10.8. Инъекция ДНК в ядро (в данном случае – в пронуклеус яйцеклетки мыши). (Из Wagner et al., 1981; фотография с любезного разрешения T. E. Wagner.)

ДНК- и РНК-блоттинг

ДНК-блоттинг (называемый также **Саузерн-блоттингом** или гибридизацией по Саузерну) представляет собой метод для выявления определенного гена (Sauthern, 1975) с последующим изучением его функций. С помощью ретровирусного вектора ген фактора, стимулирующего образование колоний гранулоцитов и макрофагов (КСФ-г.м), вводили в клетки, которые в обычных условиях не синтезируют этот фактор, но чувствительны к нему (Lang et al., 1985). Некоторые из клеток, обработанных рекомбинантным вирусом, начинали неконтролируемый рост, образуя после пересадки в мышь злокачественные опухоли. Получили ли все эти клетки дополнительные копии гена КСФ-г.м? Транскрибируют ли эти дополнительные гены мРНК для КСФ-г.м? На первый из этих вопросов ответ был получен с помощью ДНК-блоттинга.

Ланг и его коллеги выделяли ДНК из клеток полученных злокачественных колоний и обрабатывали ее рестриктазой. Затем фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в геле. Помещая гель с фрагментами ДНК в раствор щелочи, добивались денатурации ДНК до отдельных цепей. После нейтрализации гель переносили на влажную фильтровальную бумагу на подложке из пластика (рис. 10.9). Нитроцеллюлозный фильтр (способный связывать одноцепочечную ДНК) помещали прямо на гель и накрывали его несколькими слоями бумажных полотенец. Края фильтровальной бумаги, лежащей под гелем, были опущены в сосуд с буфером высокой ионной силы. Буфер поднимался через гель и далее через нитроцеллюлозный фильтр и полотенца. При этом ДНК задерживалась на нитроцеллюлозном фильтре). После запекания ДНК на фильтре (иначе произойдет ее утечка) фрагменты

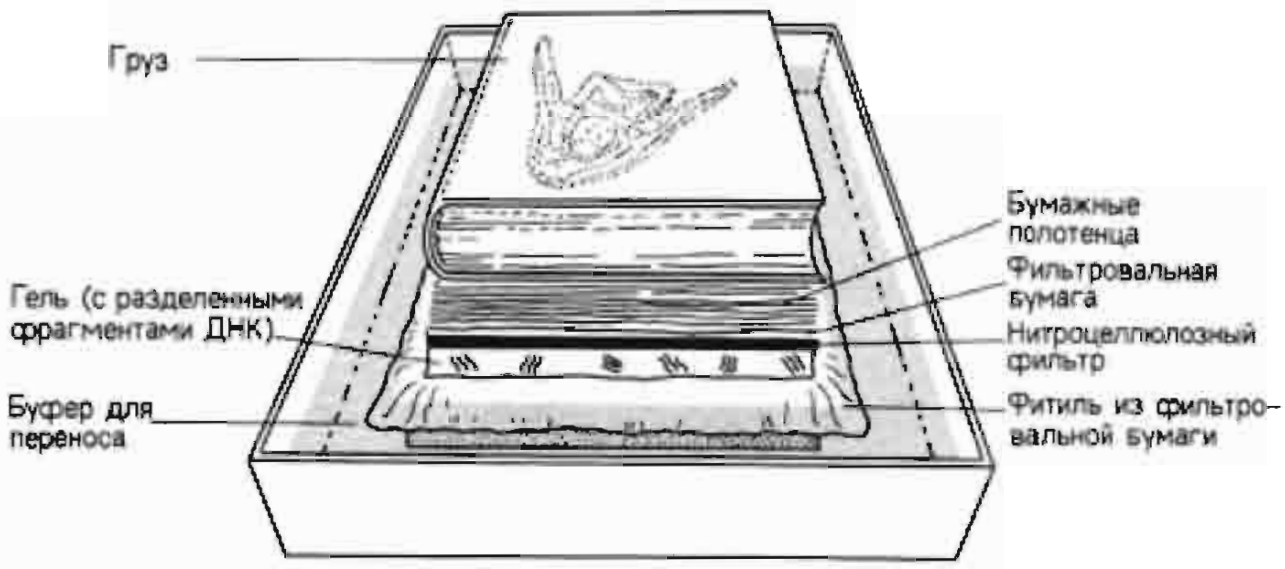


Рис. 10.9. Аппарат для Саузерн-блоттинга. Буфер для переноса проходит через гель, нитроцеллюлозу и бумажные полотенца благодаря капиллярному эффекту, захватывая с собой ДНК. Одноцепочечная ДНК задерживается нитроцеллюлозным фильтром. Положение ДНК на фильтре отражает положение фрагментов ДНК в геле.

ДНК инкубировали с радиоактивной кДНК к соответствующему гену (можно использовать также и мРНК). Радиоавтограф нитроцеллюлозного фильтра показал, где радиоактивная ДНК нашла себе комплементарную ДНК. В итоге Ланг с коллегами показали (рис. 10.10), что помимо двух обычных генов мыши, продуцирующих КСФ-г,м и расположенных в рестрикционном фрагменте длиной 7800 пар оснований, злокачественные клетки имеют ген КСФ-г,м, полученный от вируса (о чем свидетельствует наличие последовательностей вирусной ДНК) и лежащий в рестрикционном фрагменте длиной 5500 пар оснований. Для каждого из клонов злокачественных клеток был получен аналогичный результат.

Экспрессию этих генов можно продемонстрировать с помощью **РНК-блота** (обычно называемого **Нозерн-блотом**). В отличие от Саузерн-блота, при котором из геля на бумагу переносят ДНК, при Нозерн-блоте (название не связано с фамилией исследователя) аналогичным образом из геля на бумагу переносят *РНК*. Нозерн-блоты весьма полезны при изучении накопления специфических мРНК в цитоплазме определенной клетки. В данном случае цитоплазматическую РНК изолируют из злокачественных клеток, инфицированных ретровирусом, содержащим ген КСФ-г,м, и из незлокачественных клеток, инфицированных аналогичным ретровирусом, но лишенным гена КСФ-г,м. РНК из каждого клеточного клона фракционировали в геле и переносили на нитроцеллюлозный фильтр. После инкубации фильтра с кДНК к гену КСФ-г,м было обнаружено, что во всех злокачественных клонах транскрибируется ген КСФ-г,м. Другие клетки его не транскрибируют (рис. 10.11). Ланг с соавторами пришли к выводу, что в клетках транскрибируется искусственно выделенный ген КСФ-г,м, находящийся под контролем вируса. Далее оказалось, что эти клетки, которым требуется КСФ-г,м для роста, приобрели способность синтезировать свой собст-

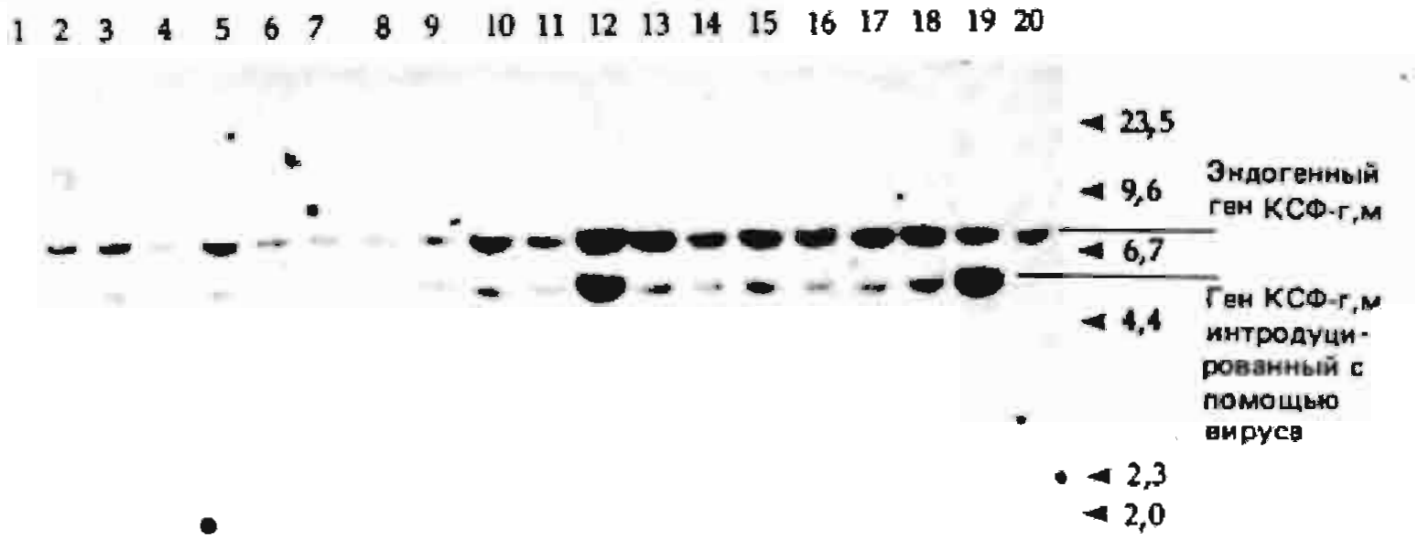


Рис. 10.10. Интеграция ретровируса, содержащего ген КСФ-г,м, в геном клетки мыши. Представлены результаты гибридизации по Саузерну (блот) геномов из 20 клонов. ДНК была выделена из каждого клона, обработана рестриктазой *Sac* I, разделена в геле, подвергнута блоттингу и гибридизована с радиоактивной кДНК к гену КСФ-г,м. Дорожки 2–19 содержат ДНК из злокачественных клеток, инфицированных ретровирусом, содержащим ген КСФ-г,м. Дорожка 1 содержит ДНК из незлокачественного клона, инфицированного аналогичным вирусом без гена КСФ-г,м; дорожка 20 содержит ДНК из неинфицированных зародышей мыши. Верхние зоны представляют ген КСФ-г,м из нормального генома мыши. Нижние зоны представляют ген КСФ-г,м, введенный вирусом. (Из Lang et al., 1985; фотография с любезного разрешения R. A. Lang.)



Рис. 10.11. Обнаружение вирусоспецифических мРНК, кодирующих КСФ-г,м. Представлены результаты Нозери-блоттинга мРНК из 8 клонов клеток, инфицированных ретровирусом, содержащим ген КСФ-г,м мыши (дорожки 2–9), и двух клонов, инфицированных аналогичным вирусом, лишенным ДНК гена КСФ-г,м (дорожки 10 и 11). Транскрипт, кодируемый вирусом, содержит больше РНК в лидерной последовательности между сайтами инициации транскрипции и трансляции. Поэтому он превосходит по размерам обычную КСФ-г,м мРНК мыши (дорожка 1) и остается в верхней части геля. (Из Lang et al., 1985. Фотография с любезного разрешения R. A. Lang.)

венный КСФ-г, м. Таким образом, они стимулируют себя к непрерывному делению, образуя в конечном счете опухоли. [Это наблюдение подтверждало гипотезу Тодаро и др. (Todaro et al., 1977), которые предсказали подобный феномен в 1977 г. Эти опыты по индукции опухолей будут подробно рассматриваться в гл. 20.]

Одним из важных применений Нозери-блота является определение времени начала экспрессии какого-либо конкретного гена. Исследователь может выделить препараты РНК из зародышей на различных стадиях развития и разделить их с помощью электрофореза на параллельных дорожках геля. После переноса расфракционированной РНК на нитроцеллюлозный фильтр методом блоттинга фильтр со связанной РНК инкубируют в растворе, содержащем радиоактивный одноцепочечный фрагмент ДНК исследуемого гена. Эта ДНК будет связываться только с теми участками, где находится комплементарная РНК. Таким образом, если мРНК для данного гена присутствует на определенной стадии эмбриогенеза, то радиоактивная ДНК должна связываться с ней и ее можно зарегистрировать с помощью радиоавтографии. Радиоавтографы этого типа называют **Нозери-блотами развития**. На рис. 10.12 показан Нозери-блот развития для экспрессии гена алкогольдегидрогеназы у *Drosophila*. Можно видеть, что мРНК для этого белка синтезируется на всех стадиях зародышевого развития,

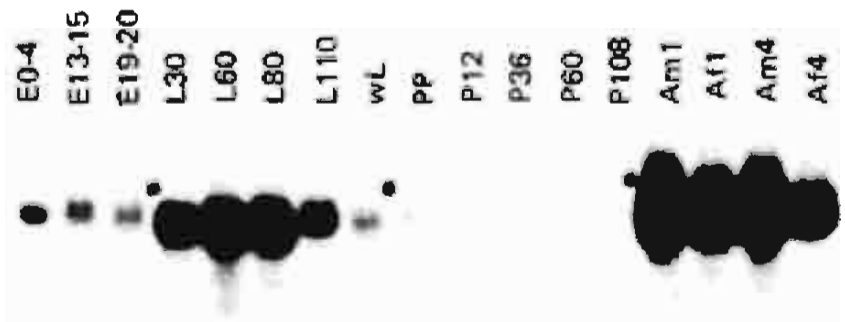


Рис. 10.12. Нозери-блот для гена алкогольдегидрогеназы в процессе развития *Drosophila melanogaster*. Хромосомная локализация этого гена показана на рис. 9.1. РНК экстрагировали на стадиях зародыша (E), личинки (L), предкуколки (PP), куколки (P), имаго (A) и затем равные количества (5 мкг) вносили в карманы геля. После электрофореза РНК переносили блоттингом на нитроцеллюлозный фильтр и инкубировали в растворе, содержащем одноцепочечный фрагмент ДНК гена алкогольдегидрогеназы. Нозери-блот показывает, что в ходе эмбриогенеза накапливается незначительное количество РНК этого гена, тогда как в тканях личинки происходит значительное увеличение количества мРНК алкогольдегидрогеназы. Когда личинки начинают окукливаться, в них прекращается накопление этой мРНК. Однако у взрослых особей отмечается высокое содержание этой мРНК. (Из Savakis, Ashburner, 1985.)

кроме стадии куколки, и у взрослой особи (Savakis, Ashburner, 1985).

Сайт-специфичный мутагенез и трансляция разрыва

Одно из наиболее продуктивных приложений методик с использованием рекомбинантных ДНК связано с возможностью изменить конкретный нуклеотид в клонированном гене и затем выяснить, влияет ли это изменение на функционирование гена. Специфическое мутирование осуществляется с помощью олигонуклеотид-направленного **сайт-специфичного мутагенеза**. Для этого сначала определяют последовательность ДНК и искусственно синтезируют олигонуклеотид, который имеет правильную последовательность, за исключением одной (или нескольких) замен. Затем этот олигонуклеотид длиной от 12 до 15 пар оснований смешивают с одноцепочечной рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательности кДНК к гену дикого типа. Олигонуклеотид будет гибридизоваться с плазмидой, несмотря на то что одна из его пар оснований некомплементарна. Модифицированный олигонуклеотид можно затем использовать в качестве затравки для репликации оставшейся части плазмиды и клонированной ДНК с помощью ДНК-полимеразы I *E. coli*. Далее концы отреплицированных плазмид связываются ковалентно с помощью ДНК-лигазы и плазмиды вводятся в клетки *E. coli*. Половина реплицирующихся плазмид восстанавливает

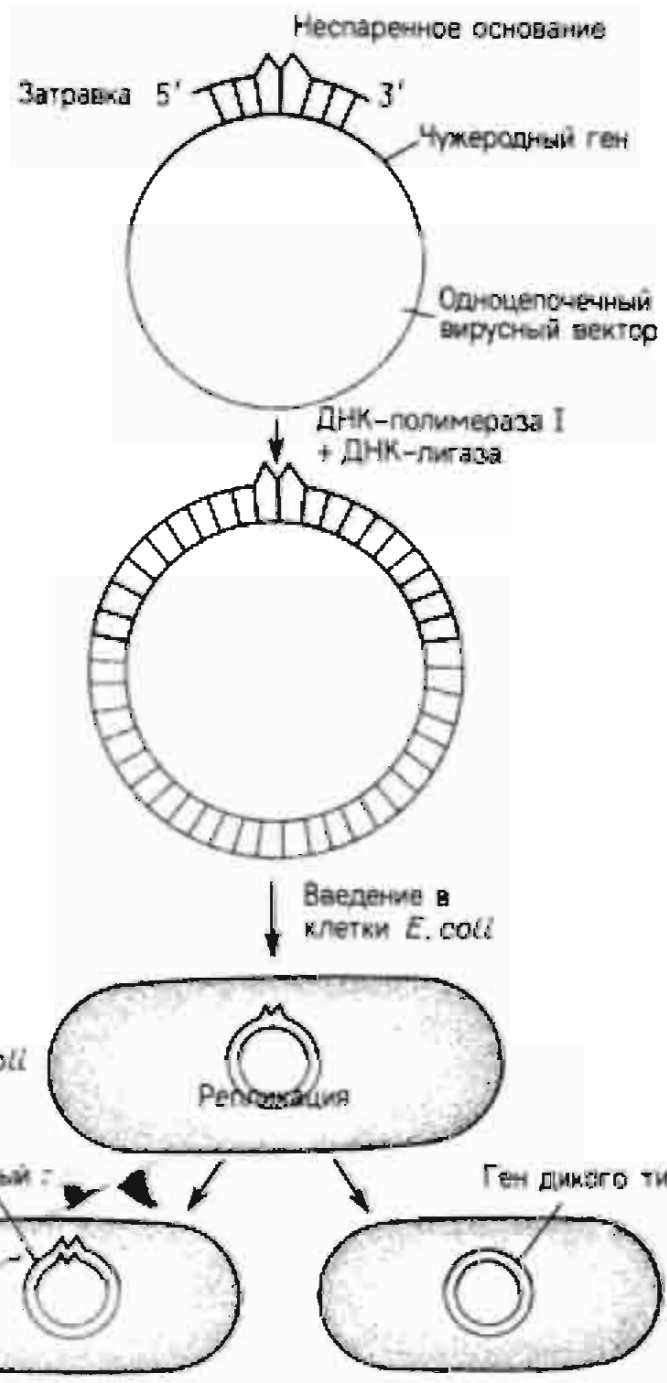


Рис. 10.13. Олигонуклеотид-направленный сайт-специфический мутагенез. Олигонуклеотид с одним замененным основанием гибридизуется с комплементарной цепью клонированной ДНК. Остальная часть цепи может быть синтезирована ДНК-полимеразой I *E. coli*, использующей олигонуклеотид в качестве затравки. Кольцо замыкается ковалентно с помощью лигазы. После введения плазмиды в клетки *E. coli* молекула реплицирует ген дикого типа и мутантный ген. (По Watson et al., 1983.)

последовательность дикого типа, тогда как в половине плазмид возникает мутация с заменой одного основания (рис. 10.13). (Применив дополнительные генетические приемы, можно получить мутантных клонов больше, чем клонов дикого типа.) Мутантные клоны и клоны дикого типа различаются по эффективности гибридизации с точными копиями исследуемого участка (Gillam et al., 1980; Smith, 1985). Мутантный ген может быть изолирован из этих плазмид и транслирован в мутантный белок. Остается выяснить, функционирует ли этот белок, несмотря на замену определенной аминокислоты.

При **трансляции разрыва** (ник-трансляции) также используют ДНК-полимеразу, но несколько иным образом. С помощью этого метода одну из цепей в клонированном гене можно заместить радиоактивными нуклеотидами, создавая таким образом высокорадиоактивные образцы для Саузери-блотов, Нозери-блотов и гибридизации in situ. Клонированный ген изолируют из плазмиды и обрабатывают ДНКазой I в низкой концентрации. Этот фермент надрезает ДНК в случайных местах, образуя свободные 3′-гидроксильные концы, к которым может присоединяться ДНК-полимераза I. Одна из особенностей ДНК-полимеразы I *E. coli* заключается в том, что она добавляет нуклеотиды на одном конце, одновременно удаляя нуклеотиды впереди разрыва (рис. 10.14). В результате происходит «движение» разрыва («трансляция ника») вдоль цепи ДНК (Kelly et al., 1970; Rigby et al., 1977). После замены исходных оснований на радиоактивные удельная радиоактивность фрагментов ДНК может превышать 10^8 имп/мин на 1 мкг ДНК.

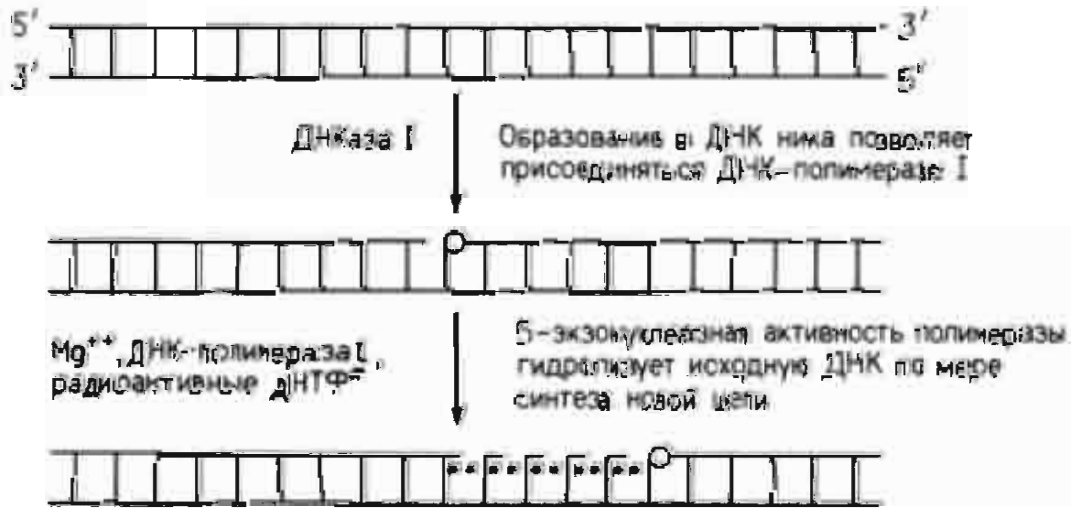


Рис. 10.14. Ник-трансляция. Одноцепочечный разрыв (ник) вводится в двухцепочечную ДНК с помощью ДНКазы I. В ходе репарации разрыва ДНК-полимеразой I *E. coli* этот фермент удаляет основания впереди себя. Если в среде присутствуют радиоактивные нуклеозидтрифосфаты, то они могут быть использованы для репарации образующихся брешей. В результате получается цепь ДНК с высокой удельной радиоактивностью. (По International Biotechnologies, Inc. catalogue, 1985.)

Дифференциальная экспрессия генов

Благодаря разработке таких сложнейших биохимических методик стала возможна проверка гипотезы о дифференциальной экспрессии генов на молекулярном уровне; при этом следует выделить три постулата, которые необходимо подвергнуть проверке.

1. Ядро каждой клетки содержит полный геном, сформированный в оплодотворенном яйце. На молекулярном уровне это означает, что ДНК всех дифференцированных клеток идентична.
2. Неиспользуемые гены в дифференцированных клетках не разрушаются и не мутируют, они сохраняют способность к функционированию.
3. В каждой клетке экспрессируется лишь малая часть генома, при этом синтезируемая фракция РНК специфична для клеток данного типа.

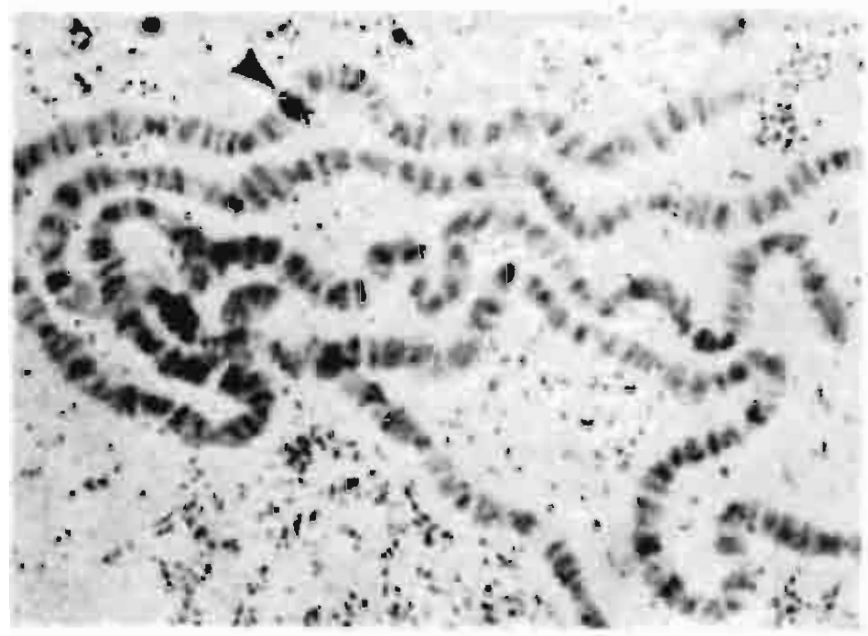


Рис. 10.15. Гибридизация in situ кДНК желточного белка с политенными хромосомами из слюнных желез личинки *Drosophila*. Темные зерна (указаны стрелкой) показывают, где радиоактивная кДНК желточного белка (приготовлена из мРНК желточного белка) связалась с хромосомами. (Из Barnett et al., 1980. Фотография с любезного разрешения P. C. Wensink.)

Идентичность геномов

Мы уже рассмотрели некоторые генетические и эмбриологические данные, свидетельствующие об идентичности геномов. Аналогичные данные были получены также в ряде биохимических работ с использованием гибридизации нуклеиновых кислот.

Первое крупномасштабное молекулярное исследование идентичности ДНК в организме было выполнено в 1964 г. (McCarthy, Hoyer, 1964). Оказалось, что одноцепочечные ДНК, выделенные из мышиных клеток всех типов, с одинаковой эффективностью подавляют гибридизацию одноцепочечной ДНК с генами зародышей мыши. Это с достаточной убедительностью говорит о том, что ДНК в клетках всех типов одинакова по числу и типу последовательностей.

Данные о присутствии в дифференцированных клетках определенных генов, которые не синтезируют специфический для них продукт, были получены с помощью метода, названного **гибридизацией in situ** (Mary Lou Pardue, Gall, 1970). Гибридизация in situ проводится с политенными хромосомами, денатурированными таким образом, что цепи множественных спиралей ДНК уже разделены, однако хромосомы все еще видны на препаратах. Радиоактивную РНК или кДНК добавляют к денатурированной ДНК и затем после соответствующего периода инкубации препарат отмывают. В ходе инкубации РНК способна связаться с кодирующими ее участками ДНК. После промывки препараты покрывают прозрачной фотографической эмульсией. Радиоактивность связанной РНК сенсибилизирует зерна серебра в эмульсии, которые при проявлении эмульсии образуют черные точки над соответствующим диском хромосомы. Следовательно, с помощью РНК для определенного продукта можно выявить диск, в котором она синтезируется. На рис. 10.15 приведен радиоавтограф, который показывает локализацию генов для одного из желточных белков у дрозофилы. ДНК дрозофилы была клонирована и скринирована с помощью частично очищенной мРНК к этому белку; было обнаружено несколько клонов, ДНК которых обладала способностью направлять синтез желточного белка. Эти клоны были выращены и гены желточного белка выделены. Один из этих клонов был использован для получения радиоактивного зонда, который гибридизовали с препаратами политенных хромосом из клеток слюнных желез. Как видно из рисунка, полученная кДНК связывается с одним определенным диском. Однако слюнные железы не синтезируют данный белок. Единственными клетками, синтезирующими желточные белки в норме, являются ооциты и клетки жирового тела взрослой самки. Таким образом, было показано, что ген, активный исключительно в клетках жирового тела взрослой особи и в ооцитах, присутствует в хромосомах слюнных желез личинки.

Стабильность генов

Оказалось возможным показать также, что гены, неиспользуемые в дифференцированных клетках, при определенных условиях могут быть активиро-

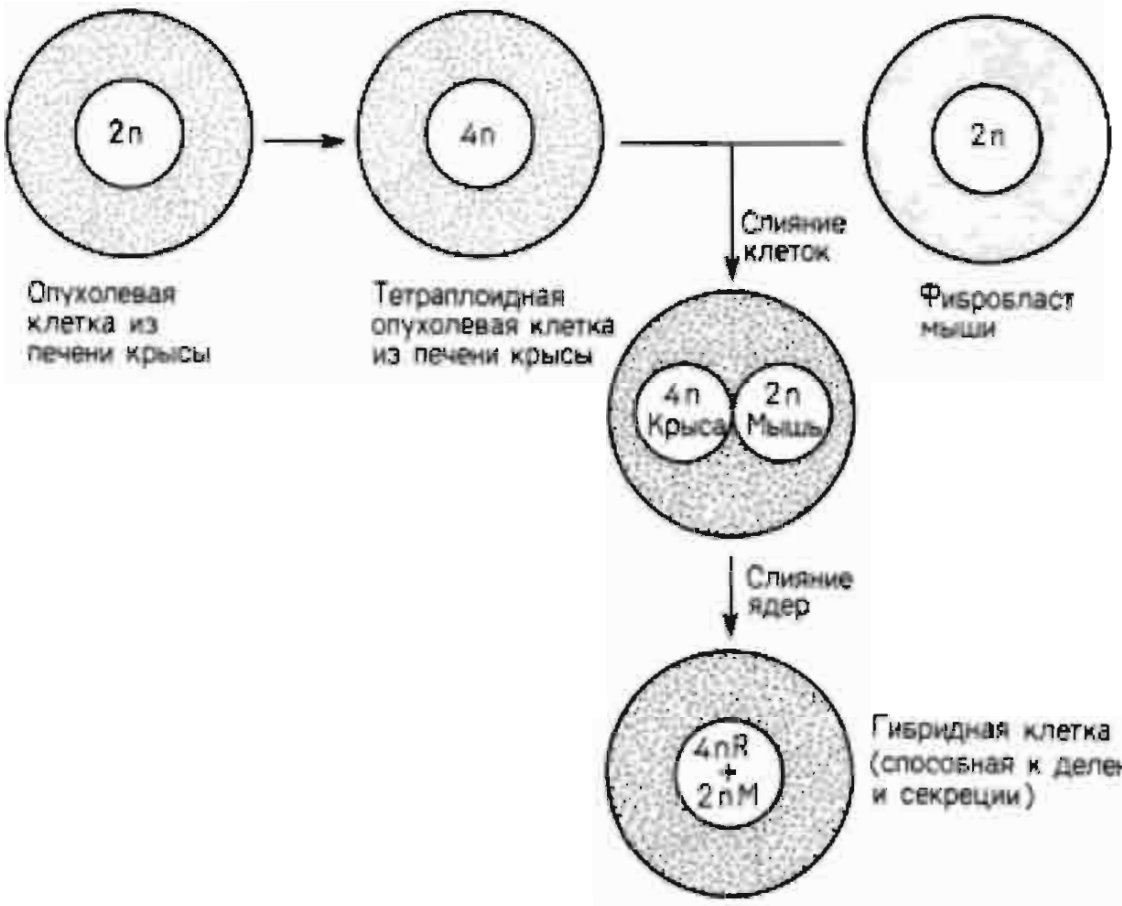


Рис. 10.16. Активация молчащих генов при слиянии соматических клеток. Слияние тетраплоидной опухолевой клетки из печени крысы и диплоидного фибробласта мыши приводит к образованию гибридной клетки, которая экспрессирует гены мыши, специфичные для печени.

ваны и что они могут продуцировать белки, специфичные для клеток других типов. Убедительные данные о реактивации неиспользуемых генов у млекопитающих были получены в лаборатории Мэри Вейс (Peterson, Weiss, 1972; Brown, Weiss, 1975) при использовании методики слияния дифференцированных клеток различных типов. Клетки могут сливаться естественным образом (как в случае развития мышц), или их можно искусственно стимулировать к слиянию, воздействуя такими агентами, как инактивированный вирус Сендай (вирус мышиной кори) или полиэтиленгликоль[1]. При слиянии клеток возникает ситуация, при которой два ядра оказываются в общей цитоплазме (рис. 10.16). В благоприятных условиях оба ядра гибридной клетки одновременно войдут в митоз и в результате образуют гибридное ядро, содержащее хромосомы из родительских клеток обоих типов. В большинстве случаев, когда клетки двух различных типов сливаются друг с другом, полученный гибрид теряет свойства, характерные для родительских клеток. В результате слияния опухолевых клеток из печени крысы с фибробластами мыши Вейс смогла получить гибриды, содержащие два набора хромосом из печени на один набор из фибробластов. Эти клетки сохранили способность синтезировать белки, специфичные для печени крысы, такие, как альбумин, альдолаза и тирозинаминотрансфераза (ТАТ). Более удивительно, что кроме этих белков они синтезировали также мышиные альбумин, альдолазу и ТАТ – три белка, которые никогда не синтезируются фибробластами. Фибробласты мыши сохранили гены, специфичные для печени, в форме, которая допускает их экспрессию в определенных условиях. Эта ситуация соответствует общему правилу развития животных: в процессе дифференцировки клеток необратимых генетических изменений не происходит.

[1] В последнее время широко используется слияние клеток или их фрагментов в электрическом поле. – *Прим. ред.*

Нарушение стабильности геномов: изменения в генах лимфоцитов

Использование методов молекулярной биологии позволило выявить интересное исключение из сформулированного выше правила; исключение это – дифференцировка лимфоцитов. В соответствии с общим правилом неиспользуемые гены присутствуют в дифференцированных клетках и сохраняют способность к функционированию. Набор генов одинаков во всех тканях. Геном же каждого типа лимфоцитов отличается от генома любых других типов клеток в организме, в том числе и от геномов других типов лимфоцитов. Примером такого рода являются В-лимфоциты – клетки, которые синтезируют антитела.

Антитела образуются, когда чужеродный субстрат (**антиген**) приходит в контакт с **В-лимфоцитами**, находящимися в лимфатических узлах и селезенке. Еще до контакта с антигеном в каждом из

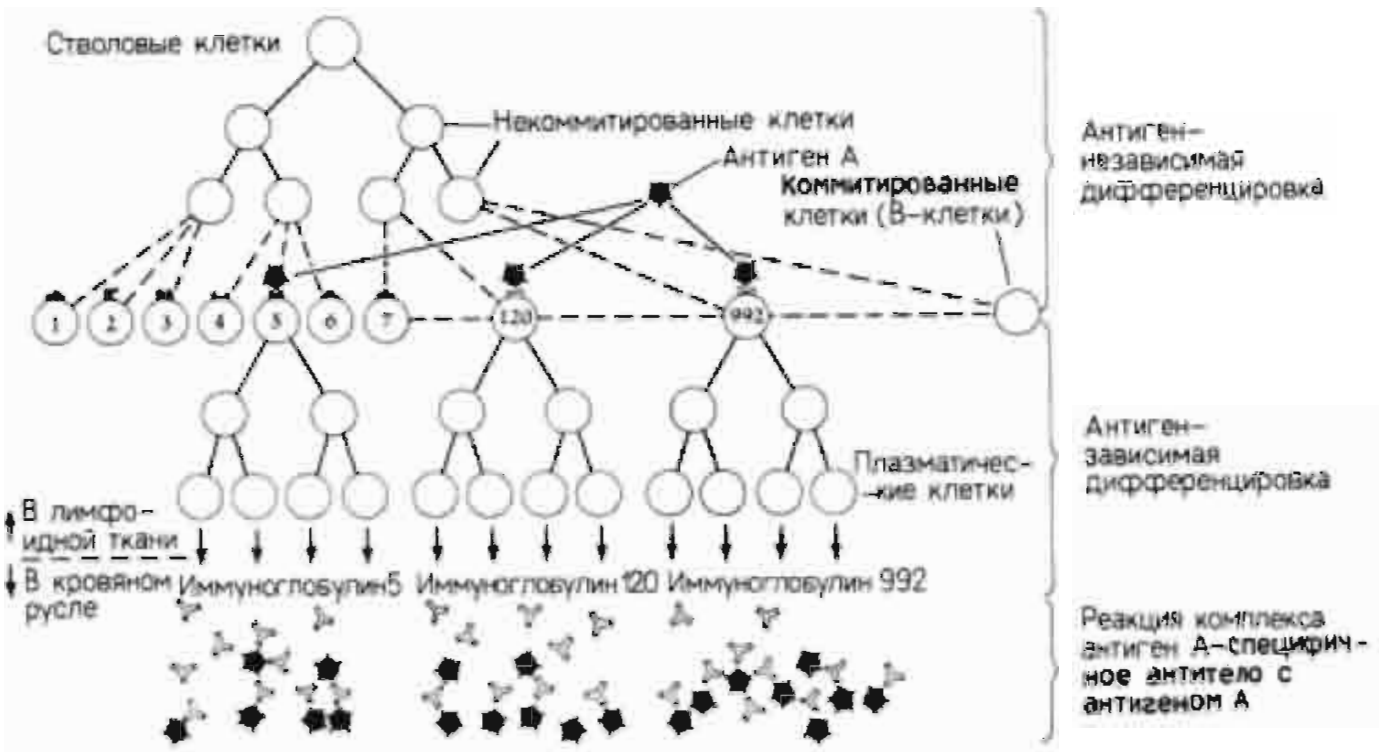


Рис. 10.17. Модель клональной селекции для формирования антител. Поверхность В-лимфоцитов приобретает свою специфичность до контакта с антигеном. В клеточной мембране имеются антитела лишь одного типа. В-лимфоциты, у которых связанные с мембраной антитела присоединили антиген, пролиферируют, продуцируя клоны плазматических клеток, которые секретируют антитела с той же самой специфичностью, что и поверхностные антитела, связавшие антиген. (По Edelman, 1970.)

покоящихся В-лимфоцитов синтезируются молекулы антител, *однако* из клеток они не выделяются, а встраиваются в клеточные мембраны лимфоцитов. Каждый В-лимфоцит продуцирует антитела, которые узнают один и только один антиген. Таким образом, антитела, узнающие белковую оболочку вирусов полиомиелита, не будут узнавать холерный токсин, мембрану клетки *E. coli* или вирус гриппа. После того как связанные с мембраной антитела присоединяют молекулы определенного антигена, В-лимфоцит многократно делится и дифференцируется в **плазматическую клетку**, *секретирующую* антитела (рис. 10.17 *и* 10.18). (Механизм этой дифференцировки будет подробно рассмотрен в гл. 16.) К размножению и секреции антител стимулируются только те В-лимфоциты, которые обладают способ-

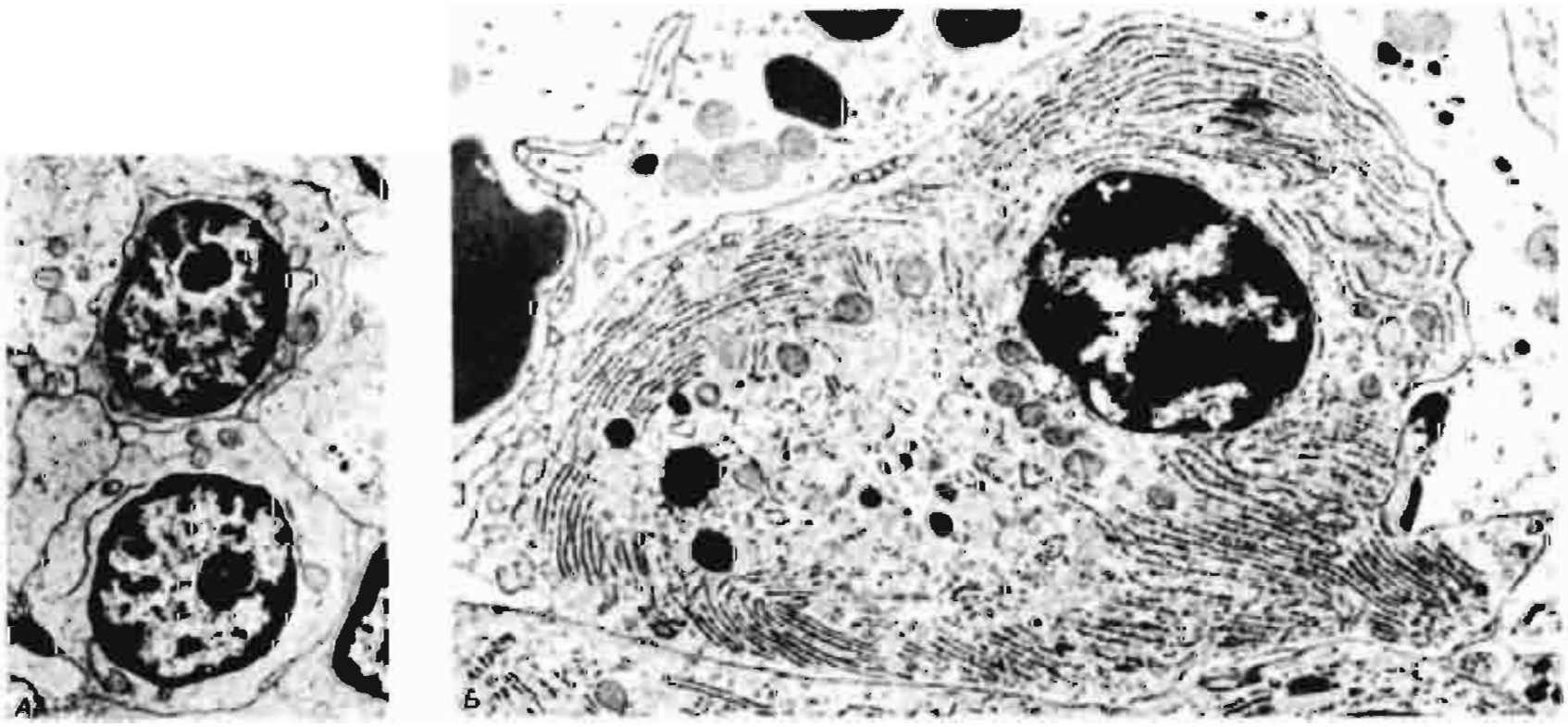


Рис. 10.18. *А*. В-лимфоцит. *Б*. Плазматическая клетка. Обратите внимание на расширение сети шероховатого эндоплазматического ретикулума, когда В-лимфоцит становится плазматической клеткой, секретирующей антитела. (Фотографии с любезного разрешения L. Weiss.)

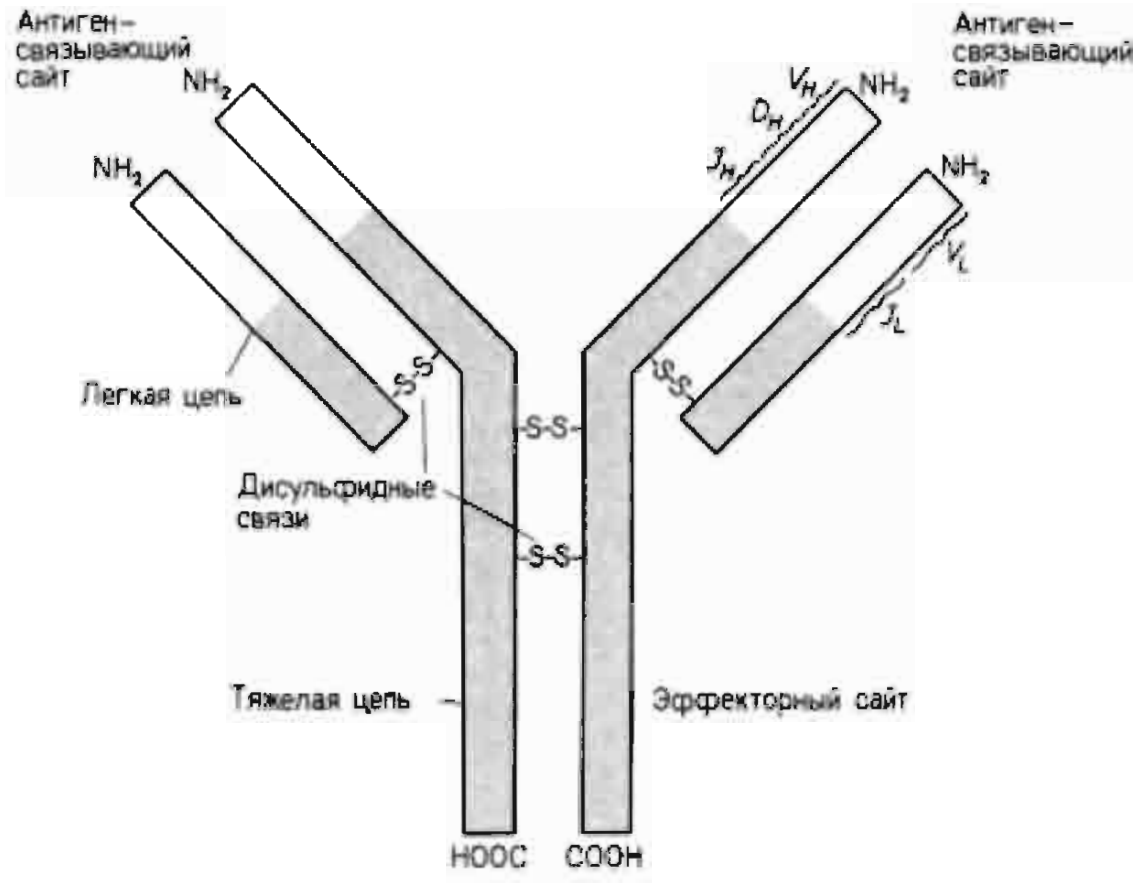


Рис. 10.19. Структура типичного иммуноглобулина (антитела). Две идентичные тяжелые цепи соединены дисульфидными связями. Антиген-связывающий сайт формируется из вариабельных областей (белые) тяжелой и легкой цепей, тогда как эффекторный сайт антитела (контролирующий способность антител агглютинировать с антигенами, присоединяться к макрофагам или входить в состав слизистых секретов) определяется аминокислотной последовательностью константной области (серая) тяжелых цепей.

ностью связывать данный антиген. В соответствии с этой моделью, названной **теорией клональной селекции** (Burnett, 1959), каждый В-лимфоцит приобретает присущую ему специфичность *до контакта* с антигеном. Иными словами, из миллионов различных видов антител, которые каждый В-лимфоцит может производить, он «выбирает» только один вид и размещает антитела этой специфичности на своей клеточной поверхности.

Механизм этой селекции по специфичности антител включает образование новых генов в ходе дифференцировки В-лимфоцитов. Белок антитела на клеточной поверхности состоит из двух пар полипептидных субъединиц (рис. 10.19): двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей. Цепи связаны друг с другом дисульфидными связями. Специфичность молекулы иммуноглобулина (т.е. избирательность связывания с вирусом полиомиелита, клеткой *E. coli* или какими-либо другими молекулами) определяется последовательностью аминокислот в **вариабельной области**. Эта область формируется из амино-концов одной тяжелой цепи и одной легкой цепи. Вариабельные области молекул иммуноглобулинов присоединены к **константным областям**, которые придают антителу его эффекторные свойства. Например, константная область тяжелых цепей молекул поверхностных иммуноглобулинов удерживает эти белки в клеточной мембране.

ФОРМИРОВАНИЕ ГЕНОВ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ АНТИТЕЛ. Гены для легких и тяжелых цепей лимфоцитов разделены на сегменты. Гены легких цепей состоят из трех сегментов (рис. 10.20). Первый сегмент гена кодирует вариабельную (V) область легкой цепи. Она содержит около 300 различных последовательностей, которые кодируют в общей сложности пер-

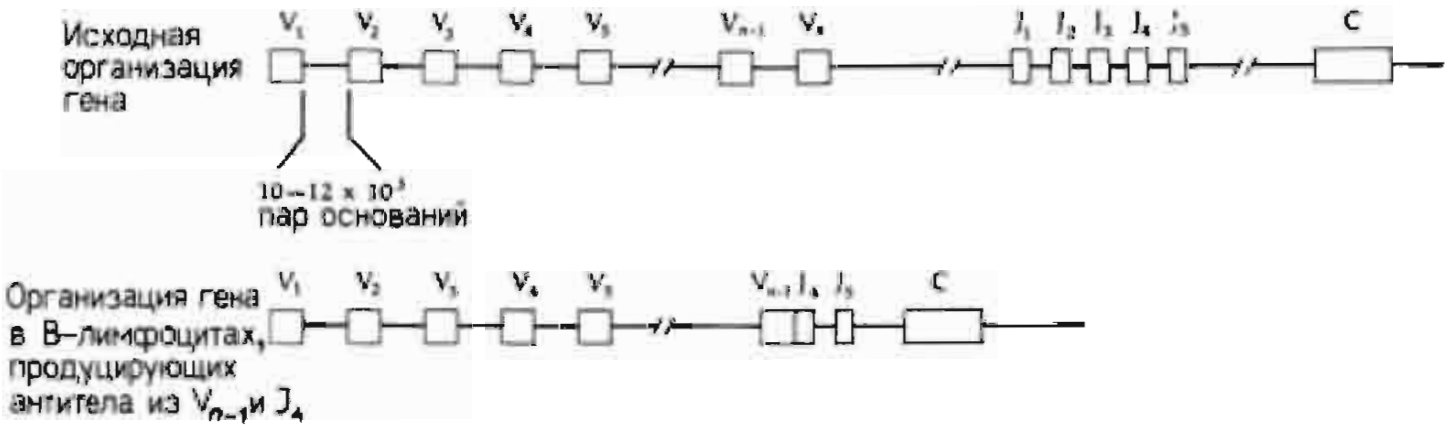


Рис. 10.20. Перестройка генов легких цепей в ходе развития В-лимфоцитов. До стимуляции антигеном один из 300 или большего числа V-сегментов гена объединяется с одним из пяти J-сегментов гена и сближается с константным (С) сегментом гена.

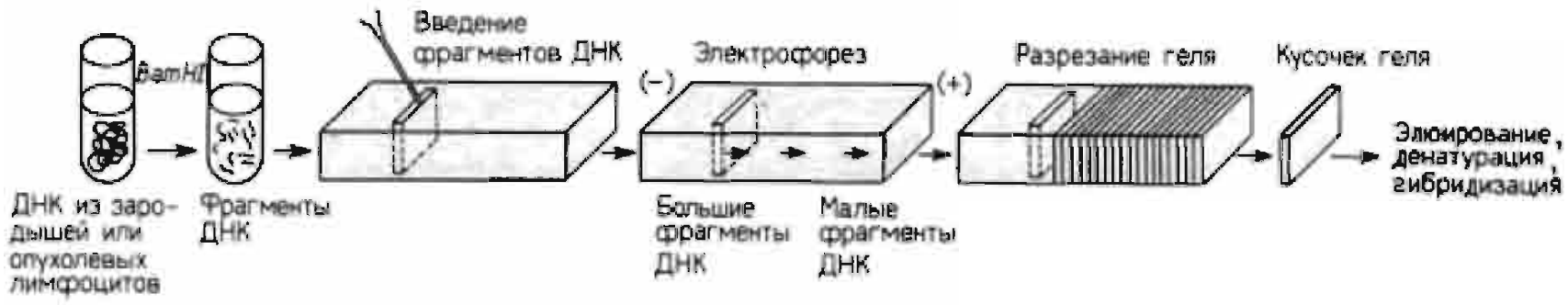


Рис. 10.21. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК. ДНК, разрезанная рестриктазой *Bam* HI, помещается в карман геля. В электрическом поле мелкие фрагменты движутся быстрее, чем крупные. После разделения фрагментов (на основе их размеров) гель разрезают и фрагменты ДНК элюируют для последующей гибридизации.

вые 97 аминокислот легкой цепи антитела. Второй сегмент, J-область, состоит из четырех или пяти возможных последовательностей ДНК для последних 15–17 остатков вариабельной части легкой цепи антитела. Третий сегмент определяет константную (С) область легкой цепи. В ходе развития В-лимфоцита одна из трехсот V-областей и одна из пяти J-областей комбинируются друг с другом и образуют вариабельную часть гена антитела. Это достигается перемещением последовательности V-области к последовательности J-области – перестройки, которая сопровождается удалением промежуточной ДНК.

О такой перестройке гена впервые сообщалось в работе Хозуми и Тонегавы (Hozumi, Tonegawa, 1976). Эти исследователи выделили ДНК из зародышей мыши и опухолевых В-клеток, секрети-

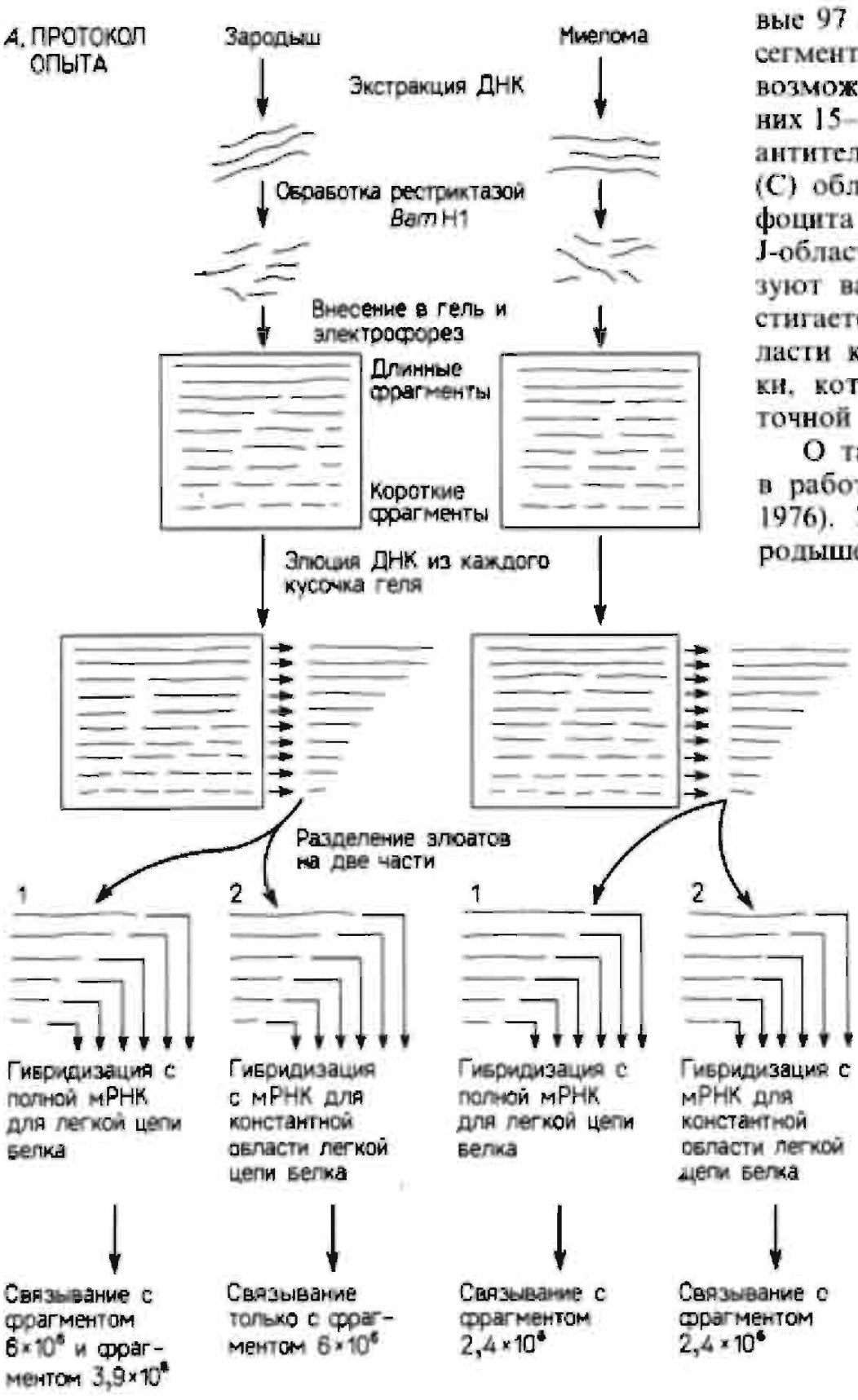


Рис. 10.22. Протокол и результаты опыта Хозуми и Тонегавы. ДНК из эмбриональных клеток мыши и В-клеток по отдельности гидролизовали рестриктазой *Bam* HI, фракционировали с помощью электрофореза и элюировали из гелей. Каждый элюированный препарат ДНК после денатурации гибридизовали или с полной мРНК, кодирующей вариабельную и константную области легкой цепи иммуноглобулина, или с фрагментом мРНК, кодирующим только константную область легкой цепи белка (3'-конца). В случае эмбриональной ДНК вариабельная и константная области легкой цепи белка были обнаружены в двух различных фрагментах ДНК (константная область располагалась на фрагменте с молекулярной массой $3{,}9 \times 10^6$, а вариабельная область – на фрагменте ДНК с массой 6×10^6). В опухолевых лимфоцитах константная и вариабельная области располагались вместе на одном фрагменте ДНК, имеющем молекулярную массу $2{,}4 \times 10^6$. (По Hozumi, Tonegawa, 1976.)

рующих легкие цепи [1]. Каждый из двух препаратов ДНК обрабатывали рестриктазой *Bam*HI, которая расщепляет в ДНК последовательность ГГАТЦЦ, где бы она ни находилась. В результате были получены серии фрагментов ДНК. Размеры каждого фрагмента определялись длиной участка ДНК между двумя сайтами расщепления.

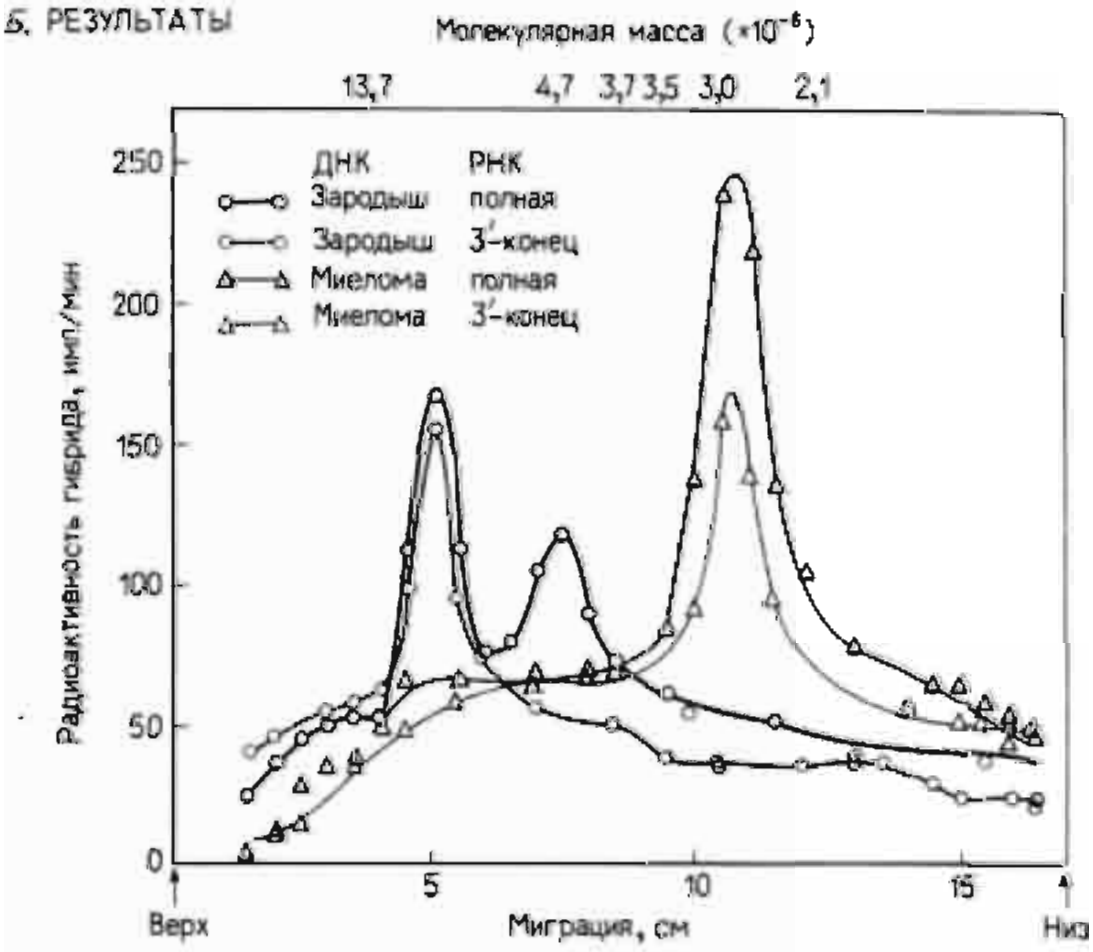
Полученные фрагменты ДНК наносили на край желеобразного плоского геля, через который пропускали электрический ток (рис. 10.21). При миграции ДНК к положительному электроду меньшие по размеру фрагменты двигались быстрее, чем ее крупные фрагменты, за счет чего достигалось эффективное разделение фрагментов по размерам. Гель с распределенной по нему ДНК разрезали на кусочки, каждый из которых содержал фрагменты ДНК определенного размера [2]. Из каждого кусочка элюировали ДНК и денатурировали ее. Часть этой ДНК гибридизовали с радиоактивной РНК, которая кодирует полную легкую цепь и была изолирована из исходных опухолевых В-клеток. Другую часть гибридизовали с радиоактивной РНК, которая кодирует лишь С-область легкой цепи (фрагмент мРНК с 3'-конца). ДНК из клеток зародышей связывалась с мРНК легкой цепи в двух зонах геля. ДНК в первой зоне имела молекулярную массу около 6 млн. дальтон, тогда как ДНК во второй зоне – 3,9 млн. дальтон. При гибридизации ДНК зародышей мыши с мРНК для С-области легкой цепи эта РНК связывалась лишь с ДНК из зоны с молекулярной массой 6 млн. Таким образом, в зародышах мыши С-область кодируется внутри фрагмента ДНК с молекулярной массой 6 млн. (между сайтами *Bam*HI), тогда как V-область кодируется внутри фрагмента с массой 3,9 млн. (рис. 10.22).

Принципиально иной результат был получен для ДНК из опухолевых лимфоцитов. Единственная зона ДНК, связывающая мРНК легкой цепи, имела молекулярную массу 2,4 млн. Кроме того, эта зона связывала фрагмент мРНК, кодирующий С-область легкой цепи. Оказалось, что обе области, С и V, кодируются одним и тем же фрагментом ДНК! Простейшее объяснение, которое было многократно подтверждено в других лабораториях и с помощью иных методов (см. Brack et al., 1978; Bernard et al., 1978; Seidman et al., 1979), заключается в том, что два фрагмента гена, один из которых кодирует С-область легкой цепи и другой – специфичную V-область легкой цепи, соединились вместе, *образовав новый ген*. Новый ген возник в ходе развития лимфоцита. Предложенная авторами схема образования такого гена показана на рис. 10.23.

ФОРМИРОВАНИЕ ГЕНОВ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ АНТИТЕЛ. Гены тяжелых цепей антител содержат даже боль-

[1] Опухолевые клетки были использованы потому, что они синтезируют огромное количество определенного иммуноглобулина (и мРНК для этого иммуноглобулина).

[2] Размер ДНК в каждом кусочке геля определяли по миграции фрагментов ДНК с известной длиной на параллельной дорожке.



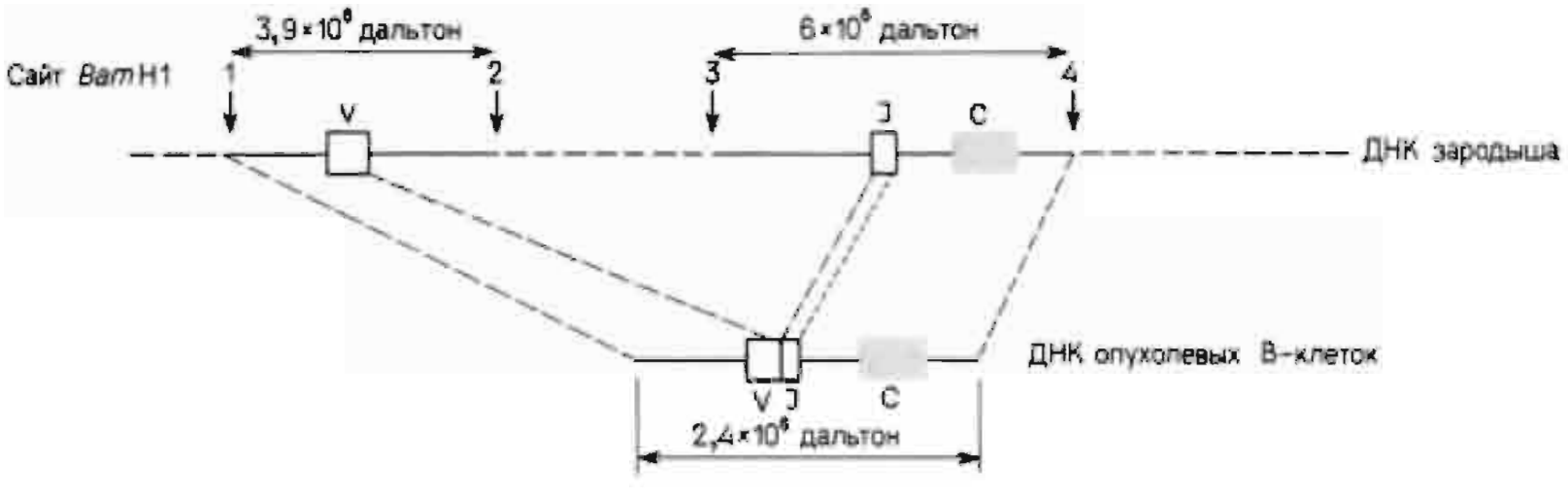


Рис. 10.23. Модель перестроек в ДНК при переходе от эмбриональных клеток к В-лимфоцитам по данным Хозуми и Тонегавы. (Hozumi, Tonegawa, 1976.)

шее число сегментов, чем гены легких цепей. Сегменты гена тяжелой цепи включают V-область (200 различных последовательностей для первых 97 аминокислот), D-область (10–15 различных последовательностей для 3–14 аминокислот) и J-область (четыре последовательности для последних 15–17 аминокислот V-области). Следующий фрагмент – это C-область. Вариабельная область тяжелой цепи формируется в результате присоединения одной V-последовательности и одной D-последовательности к одной из J-последовательностей (рис. 10.24, *А*, *Б*). Эта VDJ-последовательность вариабельной час-

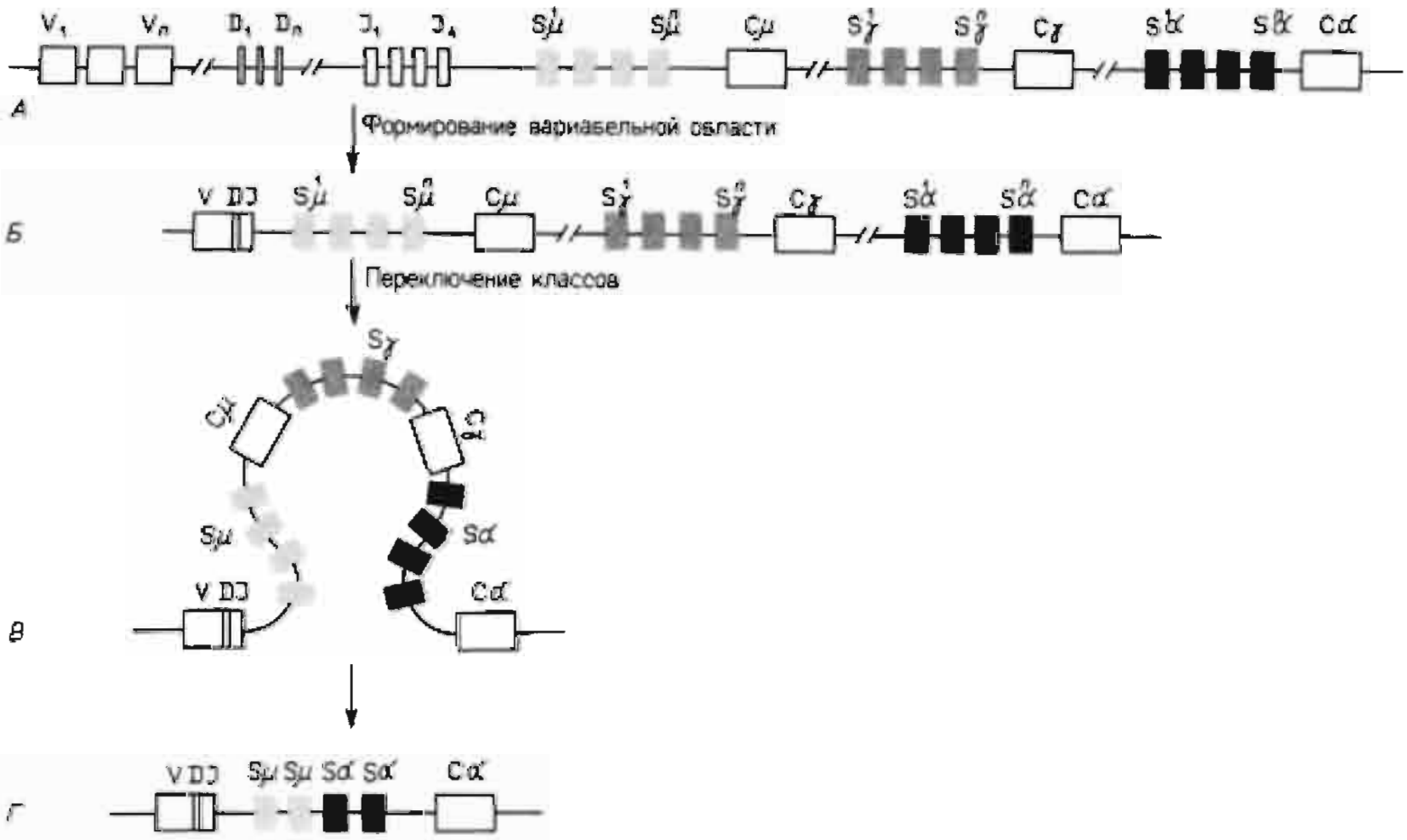


Рис. 10.24. Формирование вариабельной области гена и переключение классов при синтезе тяжелых цепей иммуноглобулинов. Ген тяжелой цепи содержит три области, которые объединяются вместе для формирования вариабельной области (V, D и J), и константную область (C). Четыре главных класса антител различаются по константной области (IgA содержит Cα; IgM – Cμ; IgG – Cγ; IgE – Cε). До встречи с антигеном вариабельная область формируется объединением V-, D- и J-сегментов. Этот VDJ-сегмент гена сближается с константной μ-областью, и полученное антитело встраивается в клеточную мембрану. После встречи с антигеном участок ДНК может образовать петлю таким образом, что VDJ-сегмент сближается с другой константной областью (в данном случае с константной α-областью, которая позволяет антителам войти в состав слизистых секретов). В этом переключении классов участвуют группы последовательностей-переключателей (Si, прилежащих к каждой из константных областей. (По Davis et al., 1980a, b.)

ти далее присоединяется к первой С-области тяжелой цепи, специфичной для антител, которые могут быть встроены в плазматическую мембрану. Таким образом, молекулы антител формируются двумя генами, возникающими в ходе антигеннезависимой стадии развития В-лимфоцита. Эти молекулы встраиваются в клеточную мембрану и служат рецепторами антигенов.

ПЕРЕКЛЮЧЕНИЕ КЛАССОВ В ГЕНАХ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ. После стимуляции антигеном В-клетка делится и дифференцируется в **плазматическую клетку**, секретирующую антитела. Вначале антитела, синтезируемые этими клетками, содержат ту же С-область, что и ранее. Однако при дальнейшем синтезе антител С-область может измениться. Исходную С-область называют константной мю-областью (Сμ). Следующая С-область – та, что содержится в секретирующих антителах, – может остаться μ-областью (хотя и с модификацией, которая обеспечивает секрецию), но может также стать гамма(γ)-, эпсилон(ε)- или альфа(α)-константной областью. Таким образом, один и тот же вариабельный участок тяжелой цепи может соединяться вначале с константной μ-областью, а позже, например, с константной γ-областью. Это явление называется **переключением классов**. (Класс тяжелых цепей антител определяет характер их функционирования: μ- и γ-цепи стимулируют лизис, агглютинацию или разрушение антигена макрофагами; ε-цепи вызывают воспалительный процесс, а α-цепи обеспечивают выделение антител в слизь, слезы, слюну и молоко.) Переключение классов осуществляется транслокацией полного сегмента вариабельной области гена (VDJ) из положения перед константной μ-областью в участок, примыкающий к константной γ-, ε- или α-области (рис. 10.24, *B*, *Г*). Этот процесс заключается в делеции сегмента константной μ-области гена из генома (Davis et al., 1980; Cory et al., 1980; Rabbits et al., 1980; Yaoita, Honjo, 1980).

Таким образом, геном плазматической клетки существенно отличается от генома любой другой клетки. Во-первых, в нем была создана последовательность вариабельной области гена посредством объединения различных сегментов ДНК. В клетках всех других органов эти сегменты ДНК разделены, а в В-лимфоцитах и плазматических клетках они собраны вместе. Во-вторых, во многих плазматических клетках часть генома (а именно ДНК из константной μ-области тяжелых цепей) элиминируется из ядер. Определенная часть генома утрачивается в ходе развития плазматической клетки; создаются новые гены, тогда как другие – разрушаются.

Какие выводы можно сделать? Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что ядра дифференцированных клеток действительно сохраняют основную часть своей генетической информации в форме, которая допускает ее экспрессию в соответствующих условиях. Тем не менее очевидно, что по крайней мере при дифференцировке клеток одного типа происходит некоторая утрата генетического материала. Пока у нас нет возможности выяснить, каково разнообразие необратимых генетических изменений, которые могут происходить в процессе развития животных. Однако известные нам сведения о перестройке генов в лимфоцитах указывают на то, что необратимые генетические потери являются следствием клеточной дифференцировки, а не ее причиной.

Дополнительные сведения и гипотезы

Изменения генов

Геном плазматических клеток дефицитен по определенным последовательностям ДНК, которые необходимы для дифференцировки. Клетки иммунной системы другого типа – Т-лимфоциты – также утрачивают часть генома при формировании рецепторов своего антигена (Fujimoto, Yamagishi, 1987). Но это лишь одна из форм генетической нестабильности. Известны и другие примеры (Borst, Greaves, 1987). Геном паразитического простейшего *Trypanosoma brucei*, вызывающего сонную болезнь, может меняться, чтобы продуцировать разные гликопротеины клеточной поверхности (благодаря этому паразит ускользает от иммунной системы хозяина). Сходный механизм, по всей вероятности, ответствен за изменение типа скрещивания у дрожжей (Hoeijmakers et al., 1980; Haber et al., 1980; Strathern et al., 1979). В этом случае каждая гаплоидная клетка содержит оба гена, определяющие тип скрещивания. Выбор типа скрещивания зависит от того, какой из этих генов занимает определенную позицию на хромосоме. Эти позиции переключаются в процессе деления клеток. Так, если в одном поколении ген типа скрещивания *a* находится в локусе «включено», то в следующем поколении в этом положении находится ген *α*, а ген *a* дожидается своей очереди по соседству.

В каждом из этих трех примеров фигурируют гены, ответственные за узнавание клеточной по-

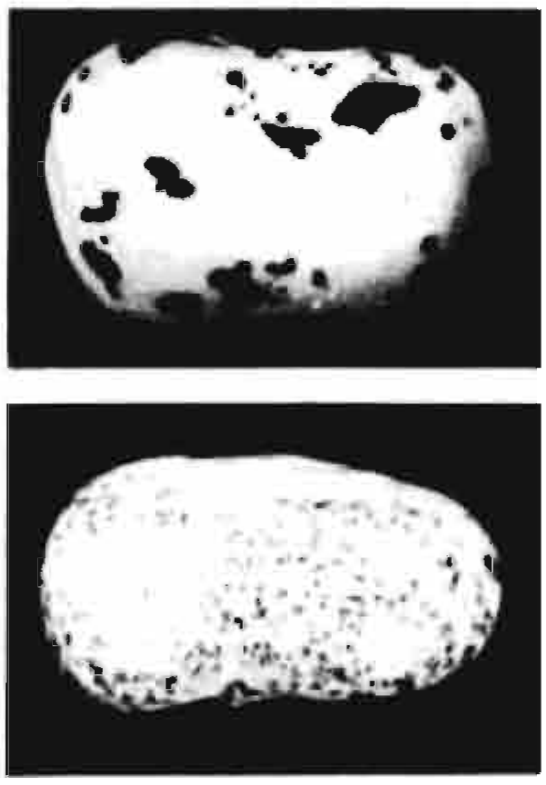


Рис. 10.25. Зерна кукурузы с пигментированными участками, сформированными клетками, в которых транспозон покинул область генов, образующих пигмент. Клетки в неокрашенных зонах не способны синтезировать пигмент, так как присутствующий транспозон продолжает инактивировать ген, ответственный за синтез пигмента. (По Peterson, 1977; фотографии с любезного разрешения R. A. Peterson.)

верхностью. Это явление наблюдается в ходе всего развития позвоночных (часть III), поэтому не следует удивляться тому обстоятельству, что утрата тотипотентности была вызвана необратимыми изменениями генома.

В дополнение к уже описанным рекомбинантным событиям разнообразие антител может создаваться также в результате соматических мутаций. Было показано, что при дифференцировке В-клетки в плазматическую клетку происходит значительное количество точковых мутаций (Crews et al., 1981).

Мутации другого типа являются следствием встраивания в ген **мобильных элементов** (или **транспозонов**). Транспозоны представляют собой подвижные фрагменты ДНК, которые могут интегрироваться в различные части генома. Если мобильный элемент разрывает структурный ген, то ген инактивируется. Такая ситуация наиболее хорошо изучена на примере бактерий, кукурузы и дрозофилы. У кукурузы транспозон, встроившийся в ген окраски зерен или рядом с этим геном, вызывает образование бесцветных зерен (McClintock, 1952; Peterson, 1980). Однако после удаления транспозона из гена синтез пигмента восстанавливается. В результате наблюдается мозаичный фенотип (рис. 10.25). У дрозофилы мутация *white-apricot* вызывается встраиванием мобильного элемента в область гена *white* (см. цветную таблицу на внутренней стороне обложки; Green, 1980; Gehring, Paro, 1980). До сих пор неизвестны случаи, когда подобные изменения в положении транспозонов управляют какими-либо процессами развития. Транспозоны могут встраиваться в геномную ДНК подобно тому, как встраиваются ретровирусы, и они могут быть использованы, подобно ретровирусам, для введения нового генетического материала в клетки дрозофилы (Spradling, Rubin, 1982).

Итак, ясно, что геном представляет собой динамическое целое и не является абсолютно стабильной структурой. Способность ядер к изменению явилась сюрпризом для многих биологов, однако она была предсказана основоположником генной теории Томасом Хантом Морганом. В 1927 г. Морган письменно свидетельствует, что «наиболее общим генетическим допущением является то, что гены остаются неизменными в продолжение всего времени [развития]». Он разъясняет, что «основа строения гена остается всегда одной и той же, а постулируемые добавления или изменения гена являются событиями такого порядка, которые происходят в протоплазме. Если последняя может изменяться при дифференцировке в новой окружающей среде, не утрачивая своих фундаментальных свойств, то почему этого не могут делать гены? Совершенно очевидно, что этот вопрос выходит за пределы имеющихся данных, но в качестве возможности его не следует отбрасывать. С ответом на этот вопрос следует подождать до того времени, пока не удастся получить экспериментальные данные».

Дифференциальный синтез РНК

Третий постулат – то, что лишь небольшая часть генома участвует в создании тканеспецифических продуктов, – был проверен также для многих организмов. Цитоплазматическая РНК насекомых и позвоночных гибридизовалась менее чем с 10% возможных доступных сайтов ДНК, хотя были получены данные, что эта РНК содержит все тканеспецифические последовательности. При изучении дрозофилы (Becker, 1959) и личинок комара *Chironomus* (Beermann, 1952) было обнаружено, что в хромосомах существуют «раздутые» участки. Такие участки, или пуфы, обнаруживались в различных областях хромосом из разных тканей, и их расположение менялось в ходе развития клеток (рис. 10.26). Кроме того, образование некоторых пуфов можно было индуцировать или подавить изменени-

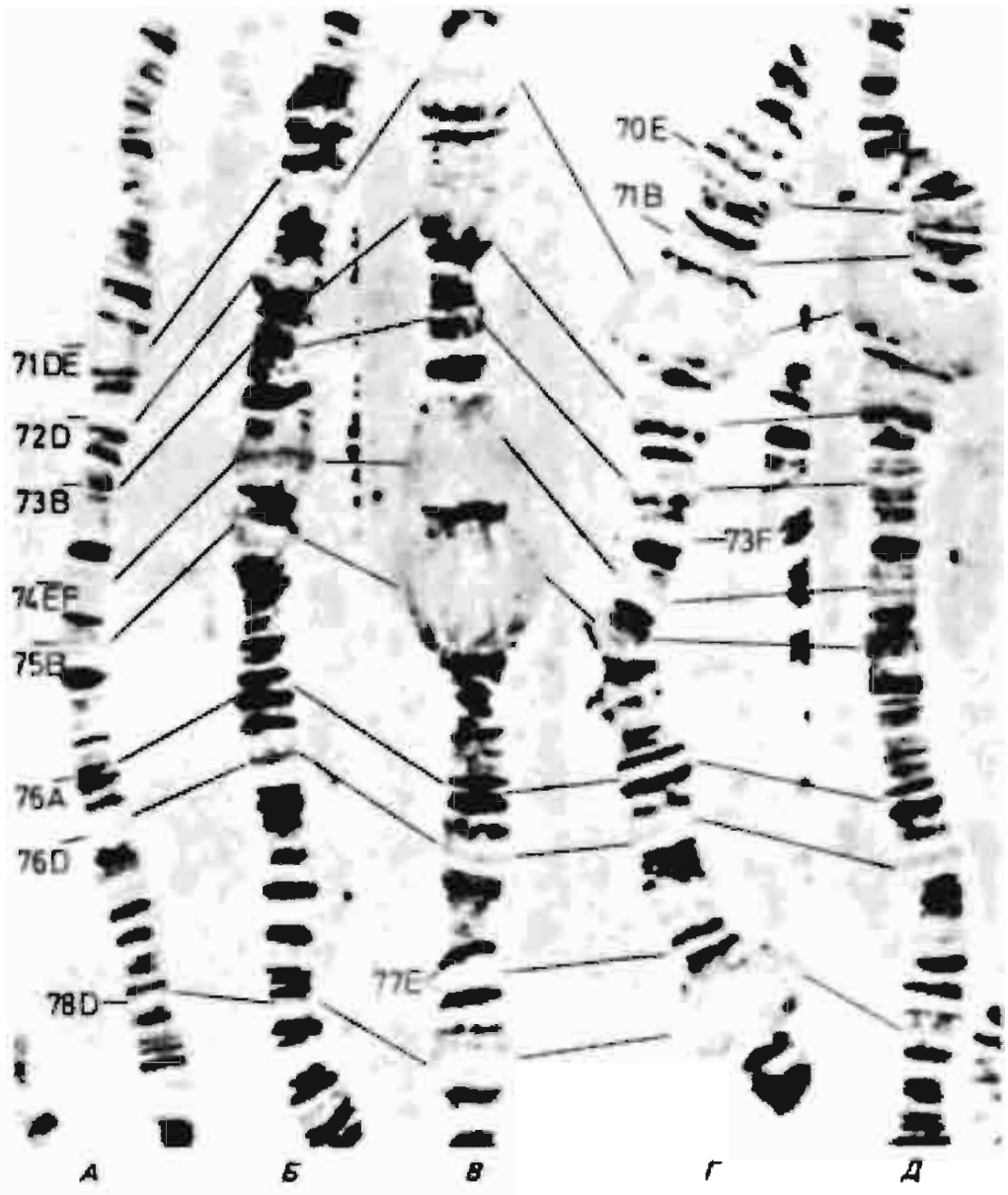


Рис. 10.26. Последовательность пуфов на участке хромосомы III в слюнной железе личинки *Drosophila melanogaster*. *А, Б.* Личинка в возрасте 110 ч. *В.* Личинка в возрасте 115 ч. *Г, Д.* Стадии предкуколки, разделенные 4 ч. Обратите внимание на пуфинг и регрессию дисков 74EF и 75B. Другие диски (71DE, 78D) образуют пуфы позже, однако большинство дисков совсем не образуют пуфы в этот период. (Фотография с любезного разрешения M. Ashburner.)

ем физиологических условий, например при тепловой или гормональной обработке (Clever, 1966; Ashburner, 1972; Ashburner, Berendes, 1978).

В настоящее время известно, что эти пуфы представляют собой расплетание политенной хромосомы в менее компактную структуру (рис. 10.27). Впервые данные о том, что такие пуфы являются местом активного синтеза мРНК, были получены Бирманом (Beermann, 1961). Этот автор обнаружил два скрещивающихся между собой вида *Chironomus*, один из которых продуцировал мажорный белок слюны, а другой не продуцировал (рис. 10.28). У продуцента в определенной зоне политенных хромосом из клеток слюнной железы личинки имелся большой пуф (кольцо Бальбиани); этот пуф отсутствовал у непродуцентов. У гибридной личинки, полученной в результате скрещивания продуцента с непродуцентом, синтезировалось промежуточное количество белка слюны. После скрещивания двух гибридных особей способность продуцировать белок слюны сегрегировала в соответствии с правилом Менделя (1 хороший продуцент:2 промежуточных продуцента:1 непродуцент). Кроме того, оказалось, что хороший продуцент имеет два пуфа (по одному на каждой гомологичной хромосоме), тогда как промежуточный продуцент имеет лишь один пуф. Исследователь пришел к выводу, что генетическая информация, необходимая для синтеза данного белка слюны, представлена в этом дистальном диске хромосомы и что синтез данного продукта зависит от превращения этого диска в пуф.

Дополнительные данные о том, что хромосомные пуфы синтезируют мРНК, были получены при исследовании пуфов кольца Бальбиани 2 из клеток *Chironomus tentans*. Исключительно большие размеры кольца Бальбиани 2 (BR2) позволяют изолировать его с помощью методов микрохирургии. Для анализа продуктов его активности используют электрофорез и радиоавтографию (Lambert, Daneholt, 1975). На рис. 10.29 показано выделение BR2 из хромосомы IV *Ch. tentans*. Чтобы проследить судьбу РНК кольца Бальбиани, из клеток слюнных желез можно выделить также нуклеоплазму и цитоплазму. Транскрипцию в кольце Бальбиани 2 выявляют, инкубируя изолированные слюнные железы с радиоактивными предшественниками РНК и затем экстрагируя радиоактивную РНК из участка BR2 рассеченной хромосомы (Lambert, 1972). Коэффи-

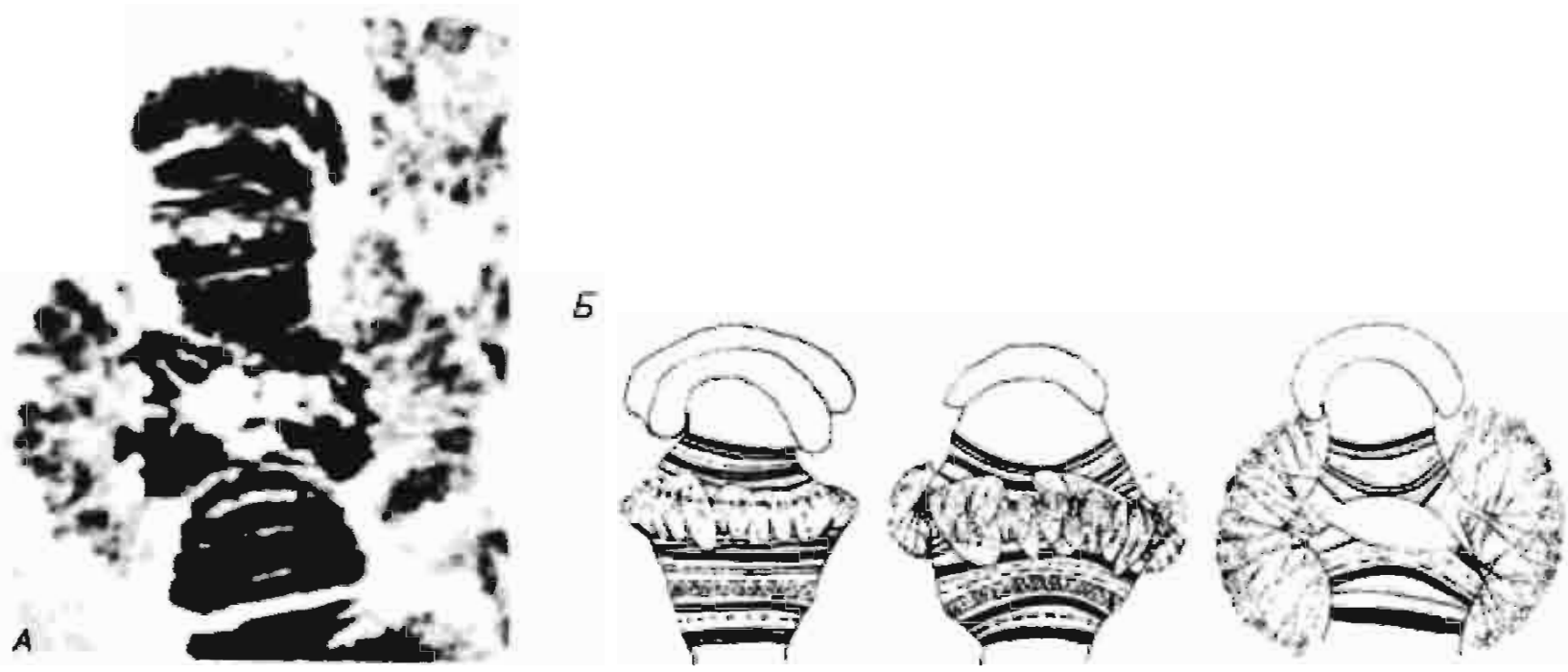


Рис. 10.27. Проксимальный конец хромосомы IV из слюнной железы *Chironomus pallidivitatus*, содержащий гигантский пуф BR2. *А*. Микрофотография в фазовом контрасте окрашенного препарата, на которой виден гигантский пуф на политенной хромосоме. *Б*. Схематическое изображение участка BR2, претерпевающего пуфинг. (*А* по Grossbach, 1973; фотография с любезного разрешения U. Grossbach. *Б* по Beermann, 1963.)

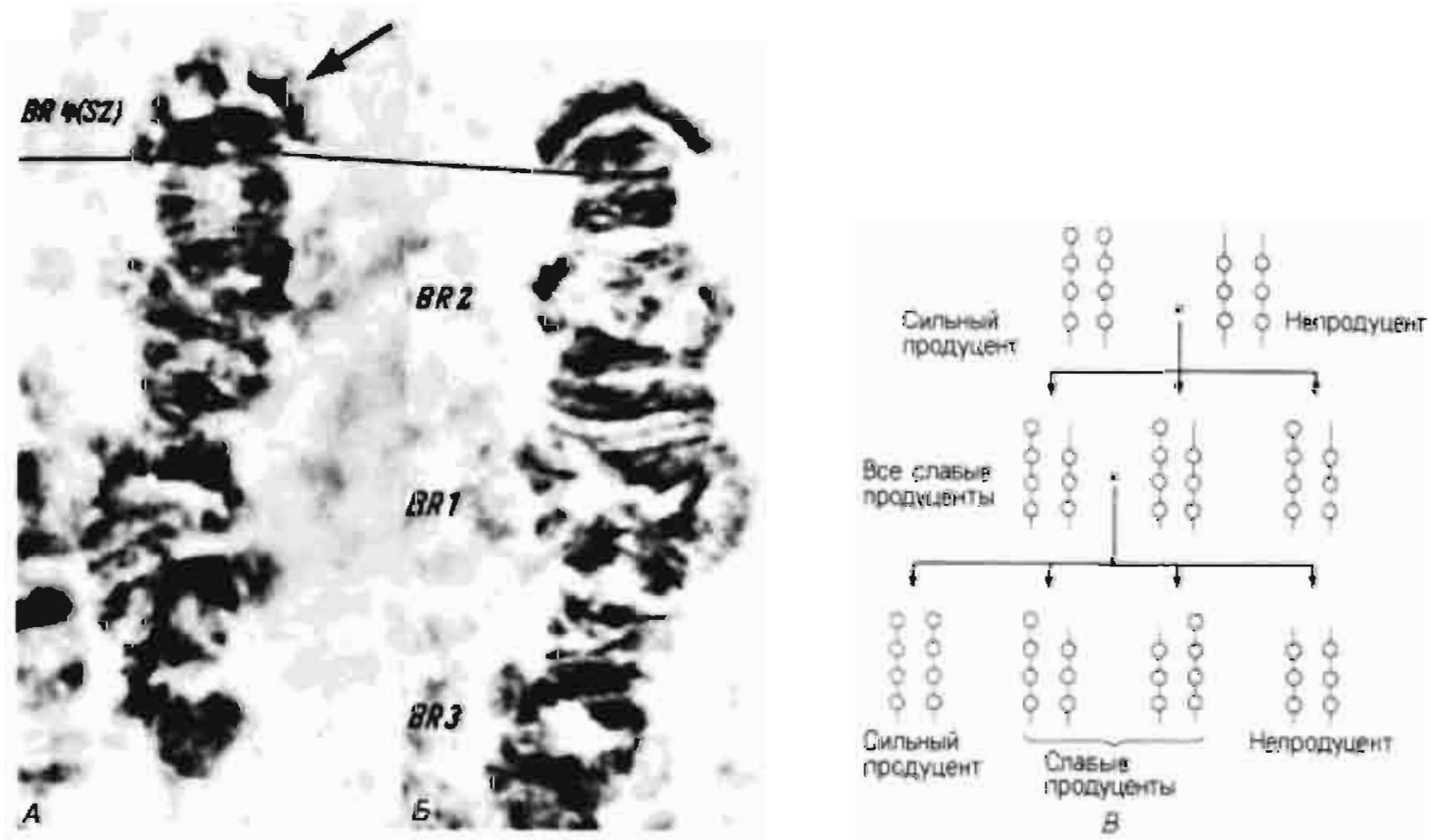


Рис. 10.28. Корреляция пуфинга со специализированными функциями клеток слюнной железы *Chironomus pallidivitatus*. *А*. Хромосома IV из клетки слюнной железы, продуцирующей зернистый секрет, имеет дополнительное кольцо Бальбиани [BR 4(SZ)]. *Б*. В хромосоме IV из прозрачной слюнной клетки обнаруживаются только кольца Бальбиани 1, 2 и 3 (BR1, BR2, BR3). *В*. Генетические данные, свидетельствующие о том, что синтез основного белка слюны зависит от формирования пуфа BR4(SZ). У личинок, синтезирующих большие количества зернистого секрета, обе хромосомы IV в клетке слюнных желез имеют пуфы BR4(SZ), тогда как у личинок, не синтезирующих этот секрет, в хромосомах не имеется таких пуфов. Промежуточные продуценты имеют лишь одну хромосому IV с пуфом BR4(SZ) в каждой слюнной клетке, синтезирующей этот секрет. (*Б* по Beermann, 1961; фотографии с любезного разрешения W. Beermann.)

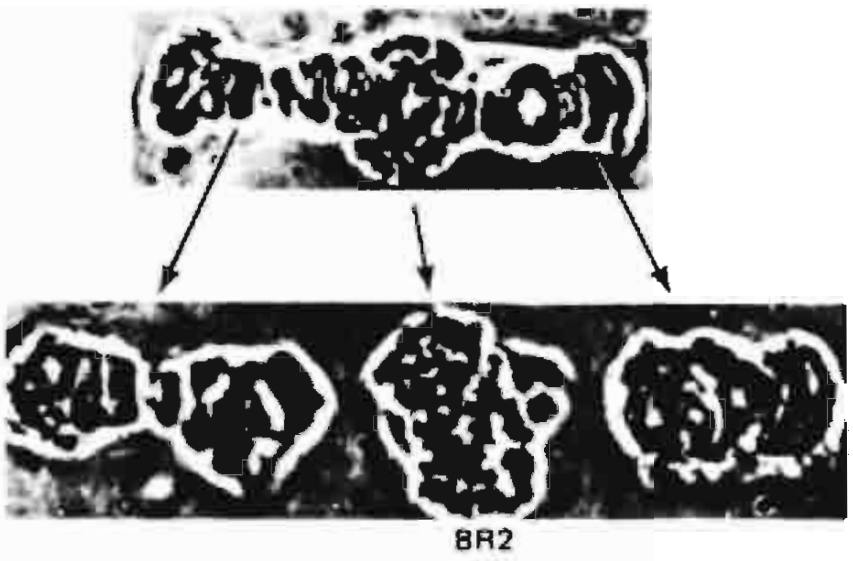


Рис. 10.29. Выделение участка BR2 *Chironomus tentans* с помощью микроманипуляций. Интактная хромосома IV может быть разделена на три фрагмента, один из которых содержит BR2. (Из Lambert, Daneholt, 1975; фотография с любезного разрешения B. Lambert.)

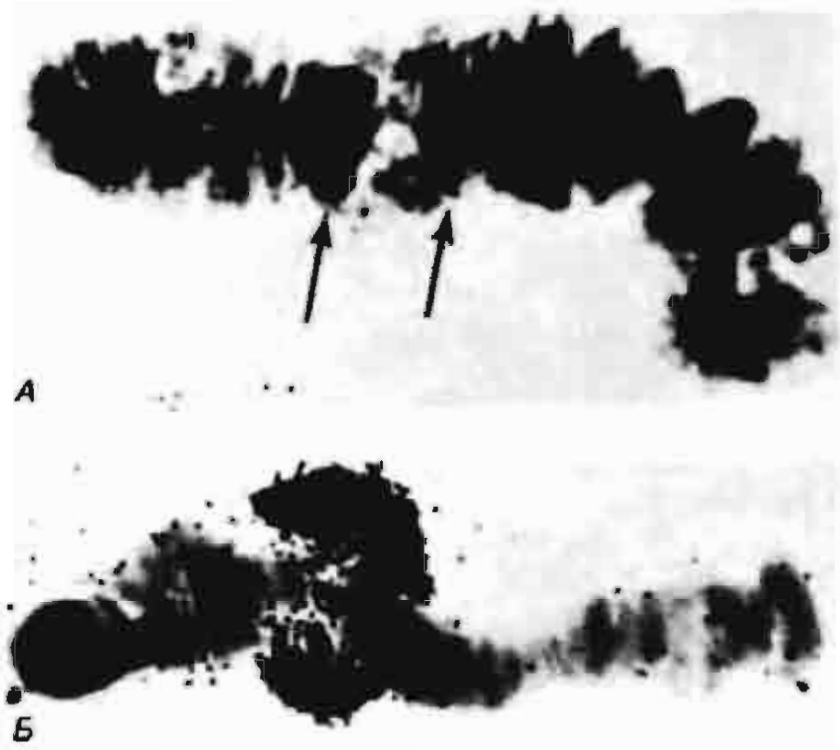


Рис. 10.30. Транскрипция на участке BR2 хромосомы IV из клеток слюнной железы *Chironomus tentans*. *А*. Препарат хромосомы, окрашенный толуидиновым синим. Стрелками указаны точки, в которых хромосома была разрезана для последующего синтеза РНК in vitro. *Б*. Радиоавтограф после гибридизации in situ BR2-РНК с препаратом хромосом. (Из Lambert, 1972; фотографии с любезного разрешения B. Lambert.)

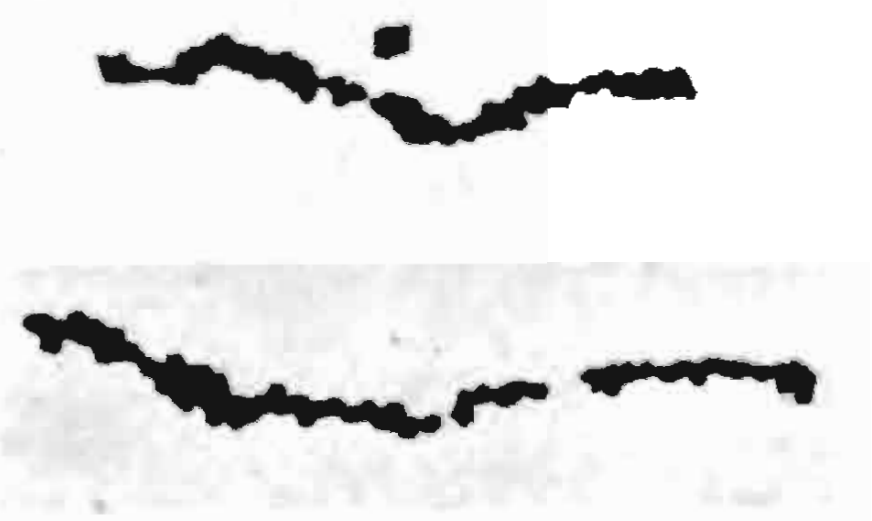


Рис. 10.31. Электронная микрофотография быстроседиментирующих полисом из участка BR2 хромосомы IV *C. tentans*. Полисомы синтезируют гигантский секреторный белок, специфичный для слюнных желез. (Из Daneholt et al., 1976; фотографии с любезного разрешения B. Daneholt.)

циент седиментации этой РНК составляет 75 S, что указывает на исключительно большие размеры РНК (примерно 50 000 оснований). Эта 75S-РНК гибридизовалась исключительно с областью BR2 на хромосоме; следовательно, ее активная транскрипция проходила на ДНК пуфа, а не в каком-либо ином локусе (рис. 10.30). В отличие от большинства других РНК размеры 75S-РНК из кольца Бальбиани заметно не уменьшались при ее перемещении через ядро в цитоплазму. Отмеченное свойство делает эту РНК особенно ценной, поскольку если она кодирует белок, то из-за большого количества связывающихся с ней рибосом должен образовываться комплекс с исключительно высокой молекулярной массой. Поэтому слюнные железы вновь инкубировали с радиоактивными предшественниками РНК и комплексы цитоплазматических полисом осаждали в градиенте сахарозы. Некоторые полисомы характеризовались очень высоким коэффициентом седиментации. Этот результат указывает на присутствие РНК, способной связать большое количество рибосом, что и наблюдалось в действительности (рис. 10.31). Из этих гигантских полисом экстрагировали РНК (удаляя рибосомы с помощью ЭДТА) и в итоге получали 75S-РНК, которая гибридизовалась исключительно с областью BR2 хромосомы (Wieslander, Daneholt, 1977). Таким образом, РНК, транскрибируемая в области, где образуется пуф в слюнной железе личинки, затем участвует в синтезе белков на цитоплазматических рибосомах. Следовательно, пуфы на хромосомах слюнных желез активно синтезируют мРНК.

Боннер и Пардью (Bonner, Pardue, 1977) на молекулярном уровне получили данные, свидетельствующие о том, что по крайней мере некоторые пуфы отражают регулируемую в развитии транскрипцию отдельных генов. Учитывая классическое наблюдение, что экдистерон вызывает появление одних пуфов и исчезновение других (рис. 10.32, *А*), эти исследователи инкубировали слюнные железы дрозофилы в среде с радиоактивными предшественниками РНК. Некоторые культуры содержали экдистерон, а другие – не содержали. Из этих культур выделяли РНК, которую затем связывали с хромо-



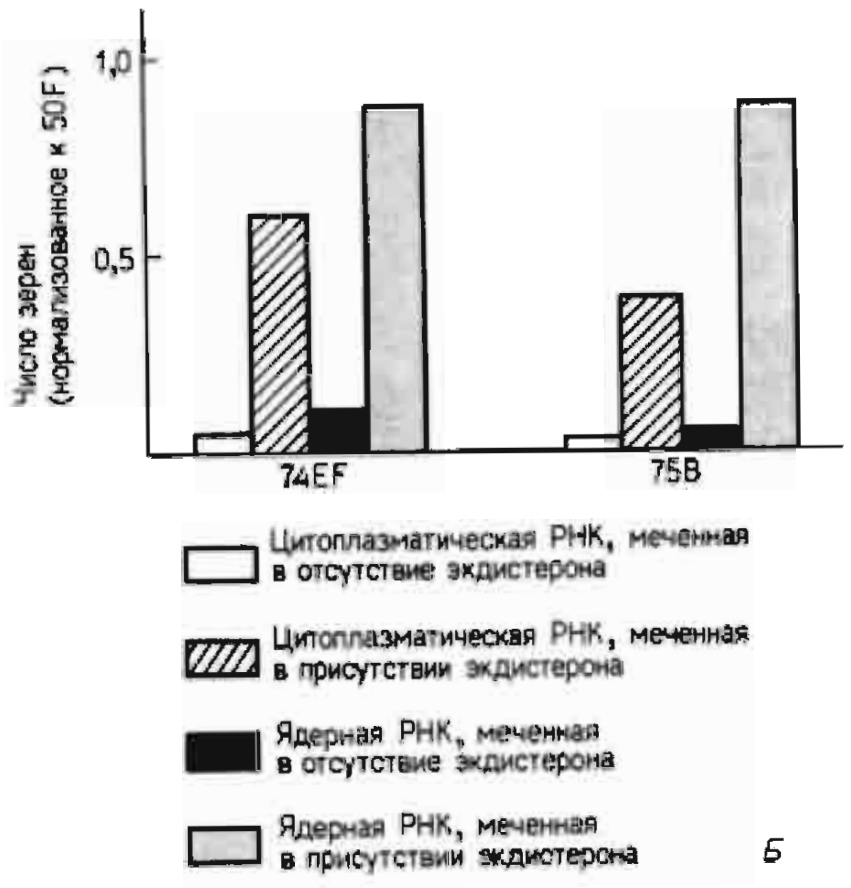


Рис. 10.32. Пуфы, индуцированные экдистероном, в культивируемых клетках слюнной железы *D. melanogaster*. Показан тот же участок хромосомы, что и на рис. 10.26. *А*. Цикл пуфинга, индуцированный экдистероном. *I* – неинкубированный контроль; *II* – *V* – хромосомы, стимулированные экдистероном соответственно через 25 мин, 1, 2 и 4 ч. *Б*. Гибридизация радиоактивной РНК in situ показывает, что хромосомы из культивируемых клеток слюнной железы после стимулирования экдистероном транскрибируют РНК в специфических участках (74EF и 75B). (*А* – с любезного разрешения M. Ashburner; *Б* – по Bonner, Pardue, 1977.)

сомами слюнных желез с помощью гибридизации in situ. Гибридизация РНК с пуфами, индуцированными экдистероном, наблюдалась только в случае, если РНК была мечена в присутствии экдистерона (рис. 10.32, *Б*). Гибридизация с пуфами, подавляемыми экдистероном, проходила наилучшим образом, когда использовали РНК из тех желез, которые культивировали без экдистерона. Кроме того, РНК из имагинальных дисков, стимулированных экдистероном, не гибридизовалась со стимулированными экдистероном пуфами слюнных желез. Благодаря этому выяснилось, что эти пуфы являются тканеспецифичными, они меняются при изменении клеточной активности и в них синтезируются тканеспецифичные РНК.

Дифференциальная активность генов регулируется во времени и в пространстве. Для определения времени транскрипции определенных генов весьма ценными оказались клонированные гены. Сарджент и Дэвид (Sargent, Dawid, 1983) из зародышей *Xenopus* на стадии гаструлы выделили мРНК, которая отсутствовала в яйце. К этой мРНК были получены кДНК-копии. Эти кДНК из клеток гаструлы исследователи смешивали с избытком мРНК из ооцитов. Если мРНК ооцита гибридизуется с комплементарной ДНК гаструлы, то это означает, что данная кДНК получена для фракции мРНК, которая присутствует как в ооците, так и в зародыше на стадии гаструлы. Полученные двухцепочечные гибридные молекулы удаляли с помощью фильтрации, оставляя, таким образом, популяцию молекул кДНК, специфичных для гаструлы. Затем эти кДНК делали двухцепочечными (с помощью ДНК-полимеразы) и вводили в векторы для клонирования. Этот метод называют **клонированием с вычитанием**. Он позволяет получить стадиоспецифичную библиотеку клонов, мРНК для которых обнаруживается на одних стадиях и отсутствует на других (рис. 10.33).

Затем исследователи брали зародышей на разных стадиях развития от зиготы до головастика и для каждой стадии изолировали РНК. Эту РНК наносили в точки на нитроцеллюлозные фильтры так, чтобы на каждом фильтре была РНК со всех стадий. После того как РНК запекли на фильтре, одноцепочечную ДНК, полученную из отдельных клонов, метили радиоактивностью и инкубировали с фильтрами. В случае если ген транскрибируется на данной стадии, радиоактивная кДНК для этого гена

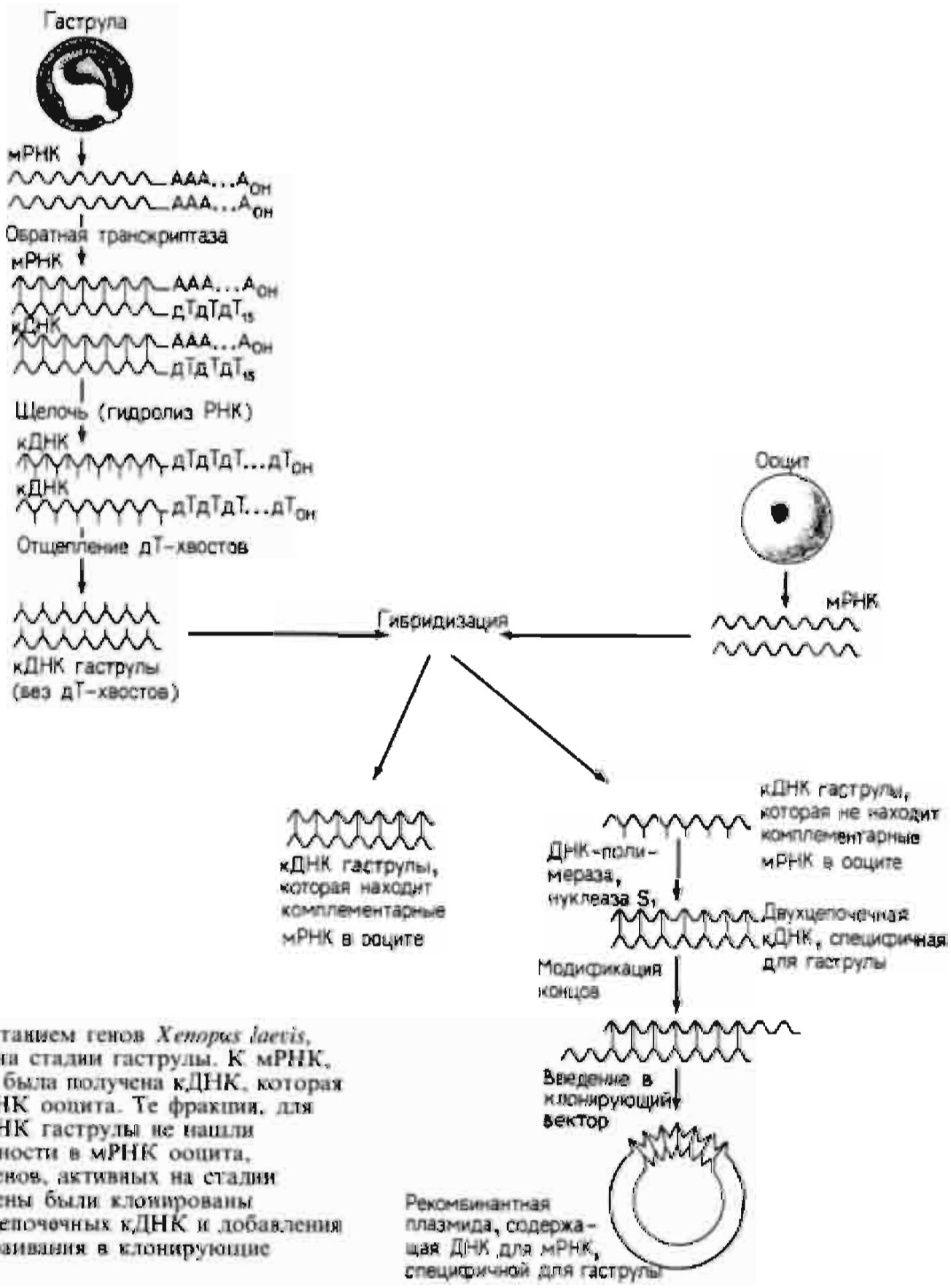


Рис. 10.33. Клонирование с вычитанием генов *Xenopus laevis*, экспрессирующихся специфично на стадии гаструлы. К мРНК, выделенной на стадии гаструлы, была получена кДНК, которая затем была гибридизована с мРНК ооцита. Те фракции, для которых последовательности кДНК гаструлы не нашли комплементарные последовательности в мРНК ооцита, представляют собой продукты генов, активных на стадии гаструлы, но не в ооците. Эти гены были клонированы с помощью приготовления двухцепочечных кДНК и добавления линкеров, необходимых для встраивания в клонирующие векторы.

должна найти на фильтре свой комплемент среди мРНК данной стадии. Затем несвязавшуюся кДНК отмывали, а связавшуюся радиоактивную кДНК регистрировали с помощью радиоавтографии. Этот метод называют **дот-блоттингом**. На рис. 10.34 показаны временные зависимости экспрессии для 17 генов, которые функционируют на разных этапах гаструляции. Ни один из них не экспрессируется ранее средней бластулы на седьмом часу развития. Некоторые гены (DG64, DG39) экспрессируются сразу после этого, тогда как другие гены (например, DG72 или DG81) начинают транскрибироваться на стадии средней гаструлы примерно семью часами позже. После активации уровень активности некоторых генов (DG76, DG81) сохраняется, тогда как у других (DG56 или DG21) он существенно изменяется.

Если с помощью дот-блоттинга можно выявить *временну́ю* специфичность экспрессии генов, то *пространственную* специфичность, т. е. тканеспецифический характер экспрессии генов, можно продемонстрировать с помощью модифицированного метода

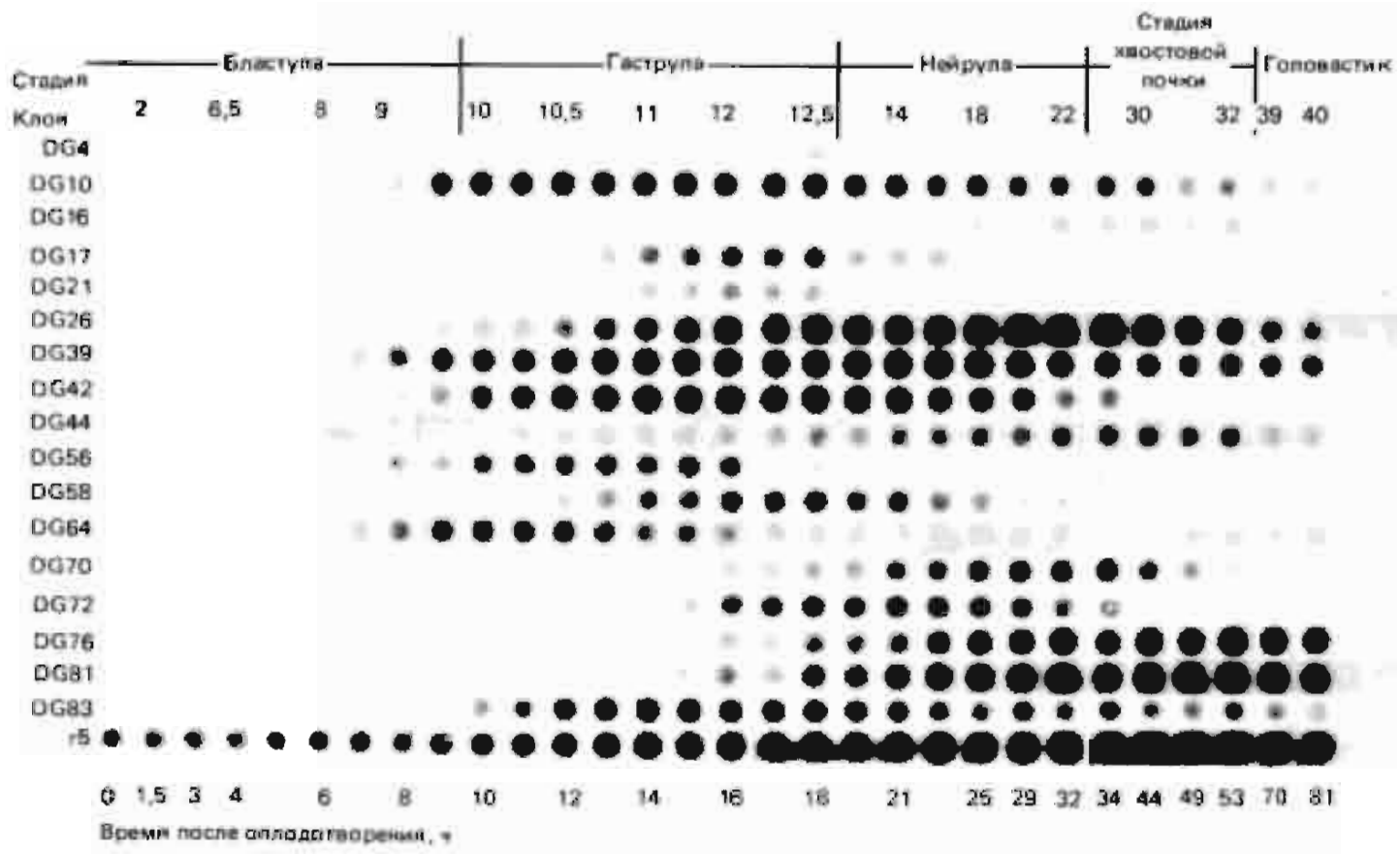


Рис. 10.34. «Дот-блот»-гибридизация, демонстрирующая периоды транскрипционной активности 17 генов в развитии *Xenopus*. Накопление специфичных мРНК в цитоплазме определяли с помощью запекания всей мРНК с последовательных стадий эмбриогенеза и инкубации приготовленной бумажной полоски с радиоактивной ДНК, полученной из кДНК-клона, специфичного для гаструлы. При совмещении этих полосок получается картина динамики активности специфичных генов в развитии. (Из Jamrich et al., 1985; фотография с любезного разрешения I. Dawid, M. Sargent.)

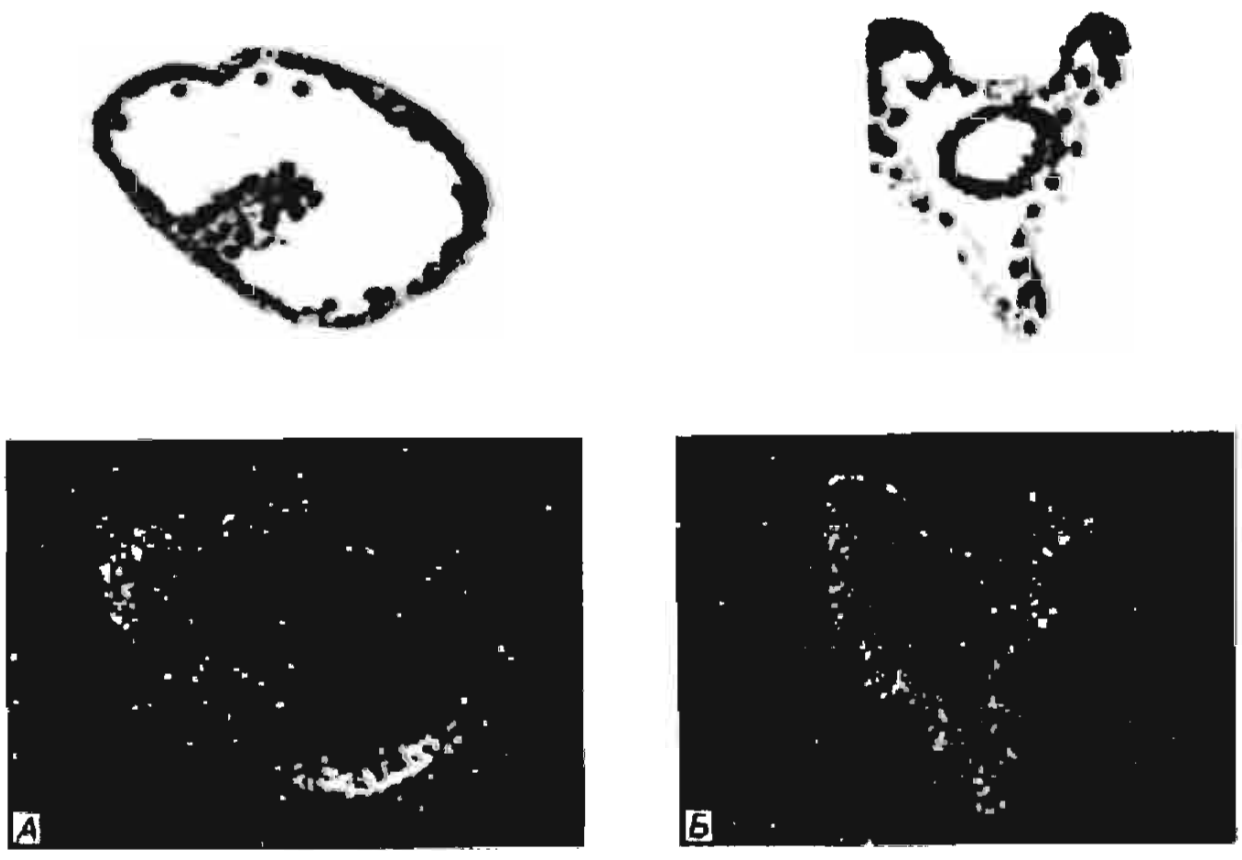


Рис. 10.35. Визуализация мРНК, специфичной для эктодермы, у морского ежа *S. purpuratus* с помощью гибридизации in situ. На верхних фотографиях представлены срезы личинок на стадии средней гаструлы (*А*) и плутеуса (*Б*) при фазово-контрастной микроскопии. В нижнем ряду показаны те же срезы, гибридизованные с радиоактивной кДНК к мРНК, специфичной для эктодермы, при негативном контрасте. Гибридизация с РНК (выявляется как белые точки) происходит только в тех клетках, которые вошли или войдут в состав дорсальной эктодермы. (Из Lynn et al., 1983; фотографии с любезного разрешения R. Angerer, L. Angerer.)

гибридизации in situ. Этот метод был использован для демонстрации тканеспецифичности экспрессии определенных генов у зародышей морского ежа (Lynn et al., 1983). ДНК морских ежей разрушали с помощью рестриктазы, и ее фрагменты встраивали в плазмиды. Было обнаружено, что некоторые из этих клонов содержат ДНК, которая гибридизуется исключительно с *мРНК*, изолированной из эктодермы зародыша морского ежа. Затем эти специфичные для эктодермы плазмиды метили радиоактивностью с помощью ник-трансляции. Полученную радиоактивную ДНК денатурировали до отдельных цепей и гибридизовали со срезами зародышей морских ежей. На рис. 10.35 показано, что радиоактивная ДНК этих плазмид узнает РНК только в тех клетках гаструлы, которые дают начало дорсальной эктодерме плутеуса. Эта ДНК узнает также дорсальную эктодерму самой личинки. Известно, что соответствующие РНК синтезируют набор кислых белков, характерных для эктодермы. Таким образом, мы можем использовать гибридизацию in situ для визуализации пространственного распределения дифференциального синтеза РНК.

РЕЗЮМЕ

На основе данных, представленных в этой главе, мы можем сделать следующие выводы:

1. В дифференцированных клетках большинства типов неиспользуемые гены сохраняются в форме, которая допускает их экспрессию при соответствующих условиях.
2. В особых случаях, таких, как образование плазматических клеток, клеточная дифференцировка сопровождается утратой генетического материала. (Даже в этих примерах утрата специфических последовательностей ДНК является следствием, а не причиной дифференцировки.)
3. Существуют виды мРНК, синтез которых регулируется в ходе развития. Можно сказать, что эта мРНК продуцируется только определенными клетками на определенных стадиях развития (это не означает, что *все виды* мРНК регулируются подобным образом или что *все развитие* определяется дифференциальной транскрипцией генов).

В итоге мы получаем парадигму дифференциальной экспрессии генов: дифференцированные клетки содержат одни и те же гены, но экспрессия этих генов регулируется таким образом, что разные клетки синтезируют разные белки. В оставшихся главах этой части будут рассмотрены механизмы, с помощью которых дифференциальная экспрессия генов осуществляется во времени и пространстве.

ЛИТЕРАТУРА

Ashburner M. (1972). Patterns of puffing activity in the salivary glands of *Drosophila*. IV. Induction by ecdysone in salivary glands of *D. melanogaster* cultured in vitro. Chromosoma **38**, 255–281.

Ashburner M., Berendes H.D. (1978). Puffing of polytene chromosomes. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*, Vol. 2B. Academic Press, New York, pp. 316–395.

Barnett T., Pachl C., Gergen J.P., Wensink P.C. (1980). The isolation and characterization of *Drosophila* yolk protein genes. Cell **21**, 729–738.

Becker H.J. (1959). Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Beobachtungen zum Verhalten des Puffmusters im Normalstamm und bei zwei Mutanten, giant- und lethal-giant larvae. Chromosoma **10**, 654–678.

Beermann W. (1952). Chromomerenkonstanz und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. Chromosoma **5**, 139–198.

Beermann W. (1961). Ein Balbiani-ring als Locus einer Speicheldrüsen-Mutation. Chromosoma **12**, 1–25.

Beermann W. (1963). Cytological aspects of information transfer in cellular differentiation. Am. Zool. **3**, 23–28.

Bernard O., Hozumi N., Tonegawa S. (1978). Sequences of mouse immunoglobulin light chain genes before and after somatic change. Cell **15**, 1133–1144.

Blattner F.R., Blechl A.E., Denniston-Thompson K., Faber H.E., Richards J.E., Slightom J.L., Tucker P.W., Smithies O. (1978). Cloning human fetal γ globin and mouse α type globin DNA: Preparation and screening of shotgun collections. Science **202**, 1279–1283.

Bonner J.T., Pardue M.L. (1977). Ecdysone-stimulated RNA synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Assay by in situ hybridization. Cell **12**, 219–225.

Borst P., Greaves D.R. (1987). Programmed gene rearrangements altering gene expression. Science **235**, 658–667.

Brack C., Hirama M., Lenhard-Schuller R., Tonegawa S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. Cell **15**, 1–14.

Brown J.E., Weiss M.C. (1975). Activation of production of mouse liver enzymes in rat hepatoma–mouse lymphoid hybrids. Cell **6**, 481–493.

Burnett F.M. (1959). The Clonal Selection Theory of Immunity. Vanderbilt Press, Nashville.

Capecchi M.R. (1980). High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. Cell **22**, 479–488.

Clever U. (1966). Induction and repression of a puff in *Chironomus tentans*. Dev. Biol. **14**, 421–438.

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

Constantini F., Chada K., Magran J. (1986). Correction of murine β-thalassemia by gene transfer into the germ line. Science **233**, 1192–1194.

Cory S., Jackson J., Adams J.M. (1980). Deletions in the constant region locus can account for switches in immunoglobulin heavy chain expression. Nature **285**, 450–456.

Crews S., Griffin J., Huang H., Calame K., Hood L. (1981). A single V_H gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: Somatic mutation is correlated with the class of the antibody. Cell **25**, 59–66.

Daneholt B., Case S.T., Hyde J., Nelson L., Weislander L. (1976). Production and fate of Balbiani ring products. Prog. Nucleic Acid Res. **19**, 319–334.

Davis M.M., Calame K., Early P.W., Livant D.L., Joho R., Weissman I.L., Hood L. (1980a). An immunoglobulin heavy

chain gene is formed by at least two recombinational events. Nature **283**, 733–739.
Davis M.M., Kim S.K., Hood L. (1980b). Immunoglobulin class switching: Developmentally regulated DNA rearrangements during differentiation. Cell **22**, 1–2.
Edelman G.M. (1970). The structure and function of antibodies. Sci. Am. **223(2)**, 34–42.
Fujimoto S., Yamagishi H. (1987). Isolation of an excision product of T-cell receptor α-chain gene rearrangements. Nature **327**, 242–243.
Gehring W.J., Paro R. (1980). Isolation of a hybrid plasmid with homologous sequences to a transposing element of *Drosophila melanogaster*. Cell **10**, 897–904.
Gillam S., Astell C.R., Smith M. (1980). Site specific mutagenesis using oligodeoxyribonucleotides: Isolation of a phenotypically silent φX174 mutant, with a specific nucleotide deletion, at a very high frequency. Gene **12**, 129–137.
Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., Kemler R. (1986). Transgenesis by means of blastocyst-derived stem cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 9065–9069.
Green M.M. (1980). Transposable elements in *Drosophila* and other diptera. Annu. Rev. Genet. **14**, 109–120.
Grossbach U. (1973). Chromosome puffs and gene expressions in polytene cells. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **38**, 619–627.
Haber J.E., Rogers D.T., McCusker J.H. (1980). Homothallic conversions of yeast mating types occur by intrachromosomal recombination. Cell **22**, 277–289.
Hoeijmakers J.H.J., Frasch A.C.C., Bernards A., Borst P., Cross G.A.M. (1980). Novel expression-linked copies of the genes for variant surface antigens in trypanosomes. Nature **284**, 78–80.
Hozumi N., Tonegawa S. (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 3628–3632.
Jaenrich J., Sargent T.D., Dawid I. (1985). Altered morphogenesis and its effects on gene activity in *Xenopus laevis* embryos. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **50**, 31–35.
Kelly R.G., Cozarelli N., Deutscher M.P., Lehman I.R., Kornberg A. (1970). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. **245**, 39.
Lambert B. (1972). Repeated DNA sequences in a Balbiani ring. J. Mol. Biol. **72**, 65–75.
Lambert B., Daneholt B. (1975). Microanalysis of RNA from defined cellular components. Methods Cell Biol. **10**, 17–47.
Lang R.A., Metcalf D., Gough N.M., Dunn A.R., Gonda T.J. (1985). Expression of a hemopoietic growth factor cDNA in a factor-dependent cell line results in autonomous growth and tumorigenicity. Cell **43**, 531–542.
Lynn D.A., Angerer L.M., Bruskin A.M., Levin W.H., Angerer R.C. (1983). Localization of a family of mRNAs in a single cell type and its precursors in sea urchin embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 2656–2660.
McCarthy B.J., Hoyer B.H. (1964). Identity of DNA and diversity of messenger RNA molecules in normal mouse tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **52**, 915–922.
McClintock B. (1952). Chromosome organization and genic expression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **16**, 13–47.
Morgan T.H. (1927). Experimental Embryology. Columbia University Press, New York.
Nathans D., Smith H.O. (1975). Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. Annu. Rev. Biochem. **44**, 273–293.
Pardue M.L., Gall J.G. (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. Science **168**, 1356–1358.
Perucho M., Hanahan D., Wigler M. (1980). Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. Cell **22**, 309–317.
Peterson J.A., Weiss M.C. (1972). Expression of differentiated functions in hepatoma cell hybrids: Induction of mouse albumin production in rat hepatoma–mouse fibroblast hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 571–575.
Peterson R.A. (1977). The position hypothesis for controlling elements in maize. In A.I. Buckhari, J.A. Shapiro and S.L. Adhya (eds.), DNA Insertion Elements, Plasmids, and Episomes. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p. 429.
Peterson R.A. (1980). Instability among the components of a regulatory element transposon in maize. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **45**, 447–455.
Rabbitts T.H., Forster A., Dunnick W., Bentley D.L. (1980). The role of gene deletion in the immunoglobulin heavy chain switch. Nature **283**, 351–356.
Rigby P.W.J., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. (1977). Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity by in vitro nick-translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. **113**, 237–251.
Robins D.M., Ripley S., Henderson A.S., Axel R. (1981). Transforming DNA integrates into the host chromosome. Cell **23**, 29–39.
Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463–5467.
Sargent T.D., Dawid I. (1986). Differential gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. Science **222**, 135–139.
Savakis C., Ashburner M. (1985). A simple gene with a complex pattern of transcription: The alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **50**, 505–514.
Seidman J.G., Max E.E., Leder P. (1979). A k-immunoglobulin gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation. Nature **280**, 370–375.
Slightom J.L., Blechl A.E., Smithies O. (1980). Human fetal $^{G}\gamma$ and $^{A}\gamma$ globin genes: Complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. Cell **21**, 627–638.
Smith M. (1985). In vitro mutagenesis. Annu. Rev. Genet. **19**, 423–462.
Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. **98**, 503–517.
Spradling A.C., Rubin G.M. (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. Science **218**, 341–347.
Strathern J.N., Newton C.S., Herskowitz I., Hicks J.B. (1979). Isolation of a circular derivative of yeast chromosome. III. Implications for the mechanism of mating type interconversion. Cell **18**, 309–319.
Todaro G.J., DeLarco J.E., Nissley S.P., Rechler M.M. (1977). MSA and EGF receptors on sarcoma virus-transformed cells and human fibrosarcoma cells in culture. Nature **267**, 526–528.
Wagner T.E., Hoppe P., Jollick J.D., Scholl D.R., Hodinka R.L., Gault J.B. (1981). Microinjection of rabbit β-globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and offspring. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 6376–6380.
Wallace H., Birnstiel M.O. (1966). Ribosomal cistrons and the nucleolar organizer. Biochim. Biophys. Acta **14**, 296–310.
Watson J.D., Tooze J., Kurtz D.T. (1983). Recombinant DNA: A Short Course. Freeman, New York.
Weistander L., Daneholt B. (1977). Demonstration of Balbiani ring RNA sequence in polysomes. J. Cell Biol. **73**, 260–264.
Wetmur J.G., Davidson N. (1968). Kinetics of renaturation of DNA. J. Mol. Biol. **31**, 349–370.
Yaoita Y., Honjo T. (1980). Deletion of immunoglobulin heavy chain genes from expressed allelic chromosome. Nature **286**, 850–853.

Глава 11

Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции: изменение транскрипции в ходе развития

В то время как мой спутник с важностью и удовлетворением созерцал великолепный вид предметов, я наслаждалась исследованием их сущности... Любопытство, искренние попытки изучить скрытые законы природы, радость, близкая к восторгу, когда они раскрывались передо мной, – одни из самых ранних впечатлений, которые сохранились в моей памяти.

МЭРИ УОЛСТОНКРАФТ ШЕЛЛИ (1817)

Следовательно, мы не можем с категоричностью отрицать, что в конце концов нам удастся измельчать гены в ступке и готовить их в стакане.

Г. МЕЛЛЕР (1922)

Введение

Любую научную дисциплину определяют проблемы, которыми она занимается. До двадцатых годов эмбриология и генетика представляли собой одну науку и многие исследователи, которых мы считаем теперь пионерами генетики, исходно занимались эмбриологией. Однако в двадцатых годах генетики начали формулировать свои проблемы как имеющие отношение к *передаче* наследственных потенциалов, тогда как эмбриологи видели свои проблемы в том, что касается *выражения* этих наследственных черт. Две научные дисциплины разделились и создали свои собственные методики получения данных, наборы проблем, журналы и терминологию.

Многие биологи считали такое деление неестественным, однако не было теории, которая связывала бы эти области науки. Ф. Лилли, чьи работы произвели революцию в изучении оплодотворения (область, где сходились интересы и генетиков, и эмбриологов!), признавал с сожалением, что объединение вновь этих двух дисциплин невозможно до тех пор, пока мы не сможем понять, каким образом ядра, содержащие идентичные гены, обеспечивают развитие различных типов клеток. «Дилемма, к которой мы пришли, представляется в настоящее время неразрешимой» (Lillie, 1927).

Но так ли было в действительности? Ганс Дриш в 1894 г. предложил гипотезу взаимодействия ядер (которые, как он считал, содержат наследственные потенциалы) и цитоплазмы. Согласно этой гипотезе (представленной в гл. 8), цитоплазма активирует ядро, которое в результате этого образует новые материалы для цитоплазмы. Эта новая цитоплазма будет по-иному взаимодействовать с ядром, и таким образом цикл будет продолжаться.

Следующим летом Дриш осуществил серию экспериментов совместно с Т. Морганом, молодым эмбриологом из Америки, который приехал в Европу для работы с ним. В 1934 г. после принесших ему славу открытий в генетике Морган по-новому изложил идеи Дриша. Вместо общепринятого представления о том, что каждый ген должен быть активен в каждой клетке, Морган высказал предположение, что в клетках различных типов цитоплазма активирует разные «батареи генов». При дроблении яйцо делится таким образом, что разные ядра попадают в разные области цитоплазмы яйца. «Исходные различия областей протоплазмы могут, предположительно, влиять на активность генов. Гены в свою очередь будут влиять на протоплазму, которая даст начало новой серии реципрокных реакций. Подобным образом мы можем представить себе постепенное усложнение и дифференцировку различных частей зародыша».

В шестидесятых годах в пользу этой гипотезы было накоплено достаточно много данных и активация генов стала рассматриваться в основном как процесс избирательной транскрипции генов. Кроме того, изучение дифференциальной экспрессии генов у бактерий, казалось, подтверждает, что при дифференцировке клеток транскрипционно активируются разные наборы генов. Однако сегодня мы знаем, что регуляция экспрессии генов осуществляется разнообразными путями и что контроль может происходить на уровнях транскрипции, процессинга РНК, трансляции и модификации белка. В этой главе мы познакомимся с некоторыми генами, активность которых контролируется дифференциальной транскрипцией. Среди них – гены, активные в большинстве клеток (такие, как рибосомные гены), и гены, продукты которых характеризуют только определенные типы клеток (такие, как гены овальбумина и глобулинов). В следующей главе основное внимание мы уделим механизмам контроля транскрипции, чтобы выяснить, каким образом одни участки хроматина активируются, тогда как другие остаются репрессированными.

Гетерохроматин

Различают два основных типа хроматина в зависимости от степени его конденсации в интерфазном ядре. Бóльшая часть хромосомного материала во время интерфазы находится в деконденсированном состоянии и утрачивает способность окрашиваться; именно эта способность позволяет наблюдать его в виде индивидуальных хромосом. Такой слабоконденсированный материал называют **эухроматином**. Однако некоторые хромосомные области не подвергаются деконденсации, а сохраняют свою плотную упаковку и способность к окрашиванию на протяжении всей интерфазы. Этот материал называют **гетерохроматином**. Гетерохроматин обнаруживается у всех представителей животных и растений и помимо сродства к красителям обладает рядом других свойств, которые отличают его от эухроматина. Во-первых, гетерохроматин относительно, если не полностью, неактивен в синтезе РНК. Во-вторых, гетерохроматин представляет собой фракцию ДНК, которая реплицируется последней в ходе клеточного цикла. И, в-третьих, гетерохроматин подавляет кроссинговер между хроматидами в ходе мейоза.

Существуют два типа гетерохроматина: конститутивный и факультативный. **Конститутивный гетерохроматин** располагается всегда в одних и тех же положениях на обеих хромосомах из пары гомологов. Обычно его обнаруживают в центромерах, и он часто состоит из высокоповторяющихся последовательностей ДНК. **Факультативный гетерохроматин** формируется при конденсации хроматина на определенных стадиях жизненного цикла организма и обычно присутствует лишь в одной хромосоме из пары гомологов. Иными словами, на каком-либо этапе развития определенные области ДНК становятся неактивными в транскрипции благодаря их конденсации в гетерохроматин. Было показано, что образование факультативного гетерохроматина отражает широкораспространенный механизм регуляции генов. Мы рассмотрим его особенности у насекомых и млекопитающих.

Отцовский гетерохроматин у мучнистого червеца

Один из наиболее впечатляющих примеров факультативной гетерохроматизации обнаружен у самцов мучнистого червеца *Planococcus citri* (рис. 11.1). У самок этого вида нет факультативного гетерохроматина. У самцов, напротив, весь отцовский гаплоидный набор хромосом целиком становится гетерохроматином. Даже если у отца данный набор хромосом был эухроматиновым, он становится гетерохроматиновым, когда передается самцу следующего поколения. В итоге самец *Planococcus* имеет эухроматиновый набор хромосом, полученный от матери, и гетерохроматиновый гаплоидный набор, полученный от отца. В ходе мейоза у самца гетерохроматиновые хромосомы дезинтегрируются, оставляя для упаковки в спермии только эухроматиновые хромосомы. Если потомок окажется самцом, то эти хромосомы конденсируются.

В результате этого у самцов червеца экспрессируются только материнские гены (за исключением тех немногих тканей самца, в которых гетерохроматизация носит обратимый характер). Эта генетическая инертность отцовского набора хромосом у самцов была изящно показана в работе, в которой самцов и самок червеца облучали и затем скрещивали с необлученными особями (Brown, Nelson-Rees, 1961). При скрещивании облученных самок в потомстве наблюдалась высокая смертность и среди самцов, и среди самок. Этот результат свидетельствовал о том, что γ-лучи способны вызывать летальные мутации. В потомстве же облученных самцов наблюдалась низкая смертность самцов и высокая – самок. Гетерохроматизация облученных хромосом у мужского потомства предотвращала экспрессию доминантных летальных мутаций.

Инактивация Х-хромосомы у млекопитающих

У млекопитающих факультативный гетерохроматин проявляется в феномене инактивации Х-хро-

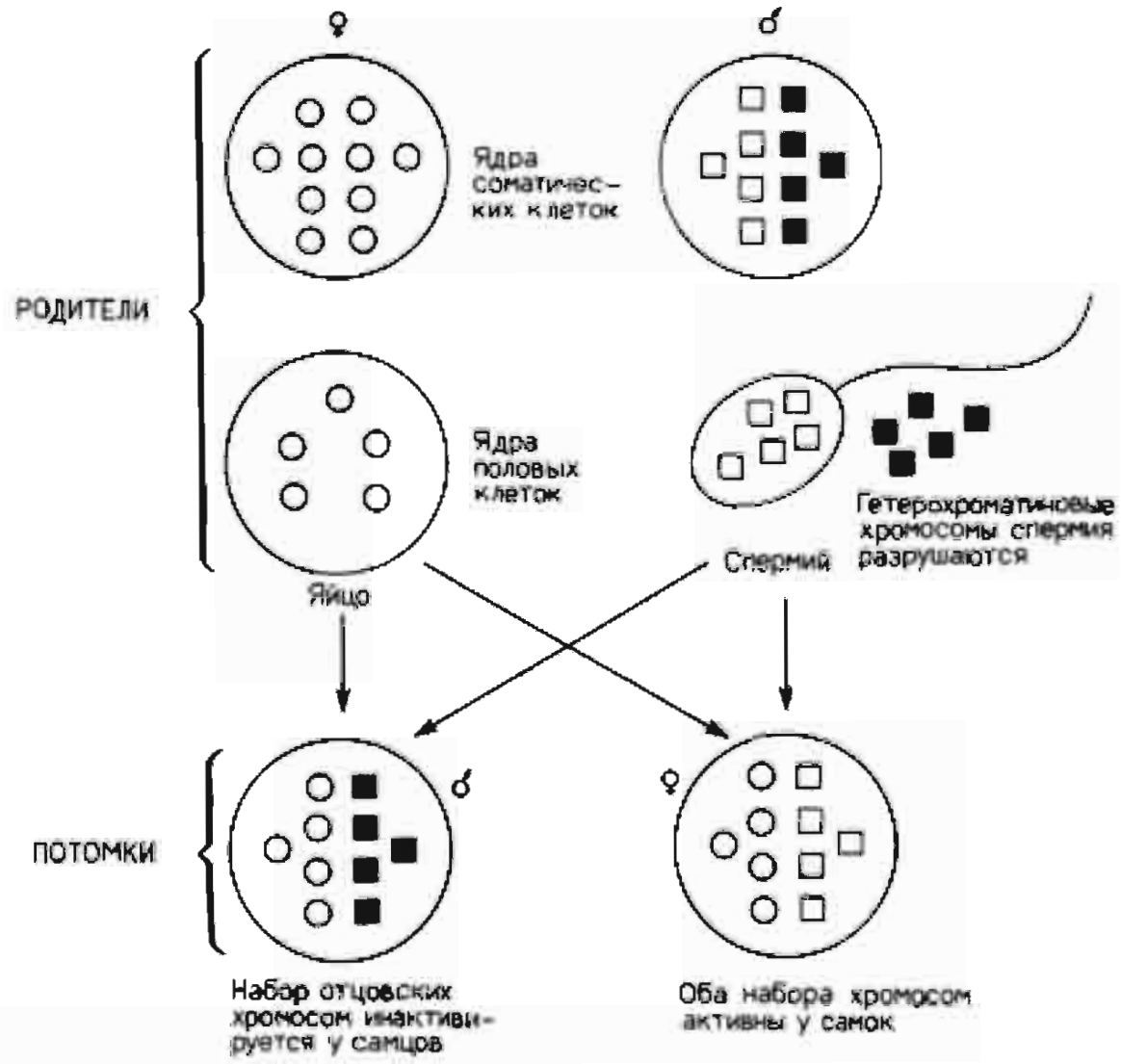


Рис. 11.1. Гетерохроматизация отцовских хромосом у самцов мучнистого червеца. Самец мучнистого червеца становится функционально гаплоидным, и в сперматозоиде оказываются только эухроматиновые хромосомы. Эти хромосомы становятся гетерохроматиновыми, если потомок окажется самцом.

мосомы. В 1949 г. Барр и Бертрам (Barr, Bertram, 1949) обнаружили в ядрах нейронов кошки интенсивно окрашенные тельца, расположенные вблизи ядерной оболочки. Позже эти тельца, названные **тельцами Барра**, были обнаружены у самок многих млекопитающих, в том числе и у человека; было показано, что они представляют собой неактивную Х-хромосому (рис. 11.2). Это означает, что, хотя в клетках самок содержатся две Х-хромосомы, а в клетках самцов – только одна, у самок транскрипционно активна может быть лишь одна Х-хромосома. Этот феномен называют **компенсацией дозы гена**.

В одной из наиболее ранних работ по инактивации Х-хромосомы изучали закономерности окраски мышей (Mary Lyon, 1961). Если пигментация волосяного покрова определяется аутосомным геном, то окраска мыши будет либо такой, как у одного из родителей, либо промежуточной. В любом случае мышь будет одноцветной. Однако если самка мыши гетерозиготна по Х-сцепленному гену окраски, то результат будет совершенно иной: она будет пятнистой (рис. 11.3). Для объяснения этого феномена исследовательница предложила следующую гипотезу: 1) В ходе раннего развития самок млекопитающих обе Х-хромосомы активны. 2) Впоследствии

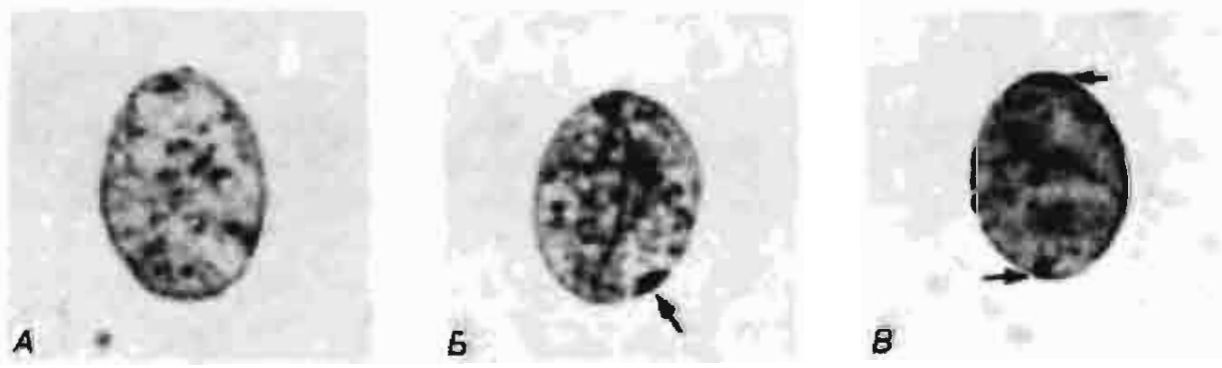


Рис. 11.2. Ядра эпителиальных клеток гортани человека, окрашенные фиолетовым крезилом. *А*. Клетка нормального самца XY не содержит тельца Барра. *Б*. Клетка нормальной самки XX содержит одно тельце Барра (указано стрелкой). *В*. Клетка самки с тремя Х-хромосомами. Можно видеть два тельца Барра; только одна Х-хромосома активна в клетке. (Из Moore, 1977.)

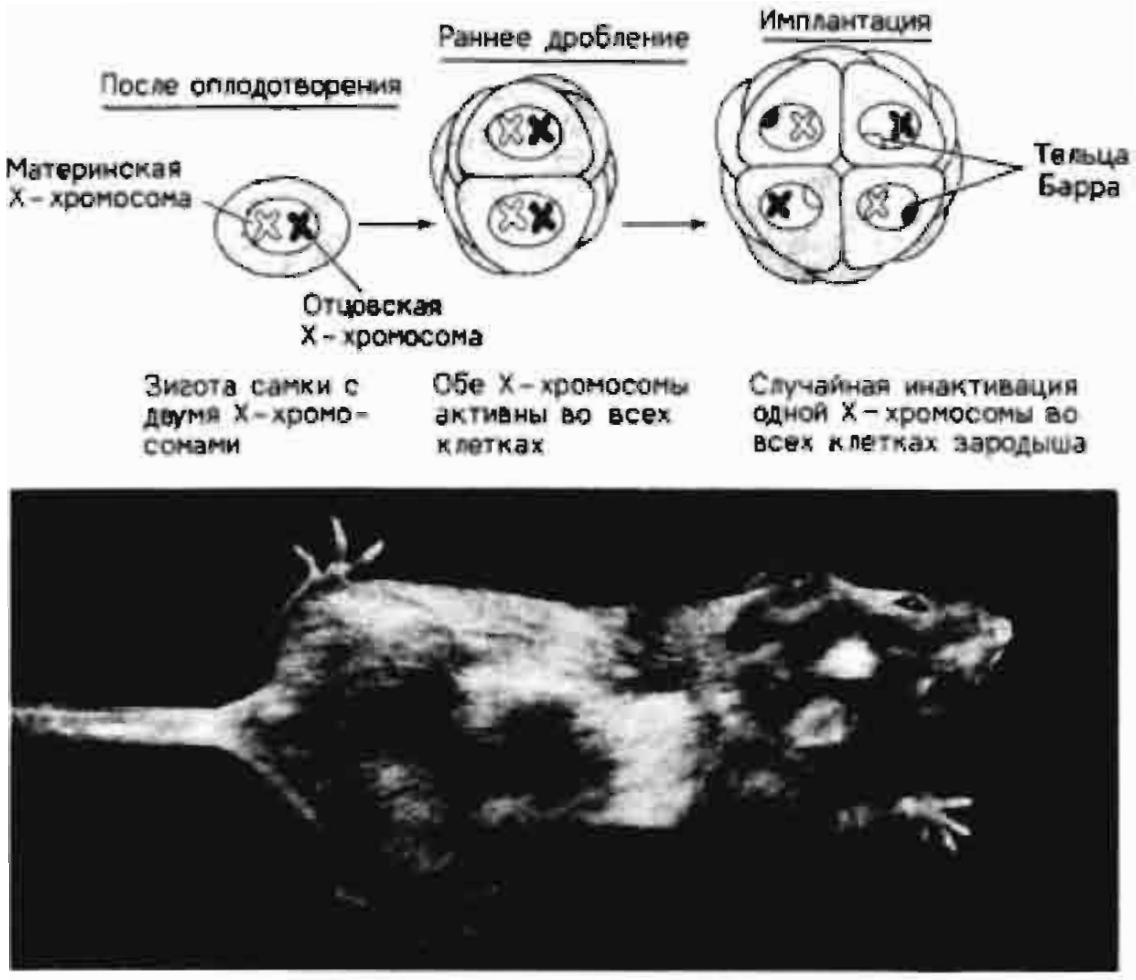


Рис. 11.3. Инактивация Х-хромосомы у млекопитающих. *А*. Схема, иллюстрирующая случайную инактивацию Х-хромосомы. Предполагается, что инактивация происходит в период имплантации. *Б*. Самка мыши, гетерозиготная по гену окраски *dappled*, связанному с Х-хромосомой. Видны участки с резко различающейся пигментацией. (Фотография с любезного разрешения M. F. Lyon.)

одна из Х-хромосом в каждой клетке выключается. 3) Эта инактивация происходит случайным образом. В одних клетках инактивируется отцовская Х-хромосома, тогда как в других – материнская. 4) Этот процесс является необратимым. Коль скоро Х-хромосома инактивировалась, она будет неактивной у всех потомков этой клетки. (Участки пигментации у этих мышей достаточно большие.) Таким образом, все ткани у самок млекопитающих являются мозаиками из клеток двух типов.

Некоторые из наиболее убедительных данных в пользу этой модели были получены в биохимических экспериментах с клонами клеток человека. Существует наследственная болезнь человека, называемая синдромом Леша – Найхана; эта болезнь характеризуется отсутствием фермента гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (ГФРТ), синтез которого контролируется Х-хромосомой. Синдром Леша – Найхана передается с Х-хромосомой. Это означает, что мужчины, несущие соответствующую мутацию в своей единственной Х-хромосоме, заболевают и умирают от этой болезни. У женщин присутствие мутантного гена ГФРТ может маскироваться другой Х-хромосомой, которая несет аллель дикого типа. Женщина, у которой имеются сыновья, страдающие этой болезнью, является переносчиком, поскольку у нее имеется мутантный ген ГФРТ на одной Х-хромосоме и ген ГФРТ дикого типа на другой Х-хромосоме. Если представленная выше гипотеза правильна, то у такой женщины клетка должна синтезировать либо активный, либо неактивный фермент ГФРТ в зависимости от того, какая Х-хромосома функционирует. Для проверки этого положения индивидуальные клетки кожи, взятые от женщины, гетерозиготной по гену ГФРТ, помещали в культуральную жидкость (Barbara Migeon, 1971). Каждая из этих клеток делилась, образуя клон. При окрашивании этих клонов на присутствие ГФРТ дикого типа было выявлено, что примерно половина клонов содержала этот фрагмент, а половина – нет (рис. 11.4).

Еще один ген Х-хромосомы кодирует глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФДГ). У этого фермента имеются обычно два электрофоретических варианта: Г6ФДГ-А и Г6ФДГ-В. Для мужчин характерен вариант А либо В, тогда как женщины в отношении фенотипа по этому ферменту могут быть А, В или АВ. В клетках кожи гетерозиготных женщин обнаруживаются оба варианта Г6ФДГ (рис. 11.5). Однако изолированные клоны, полученные после клонирования индивидуальных клеток кожи от этих гетерозигот, экспрессируют только один из двух возможных вариантов. Ни один из клонов не экспрессировал оба варианта (Davidson et al., 1963).

Гипотеза об инактивации Х-хромосомы прекрасно объясняет дифференциальную инактивацию генов на уровне транскрипции. О ее важности дополнительно свидетельствовали некоторые интересные исключения из общих правил. Во-первых, гипотеза оказалась справедливой в отношении *сома-*

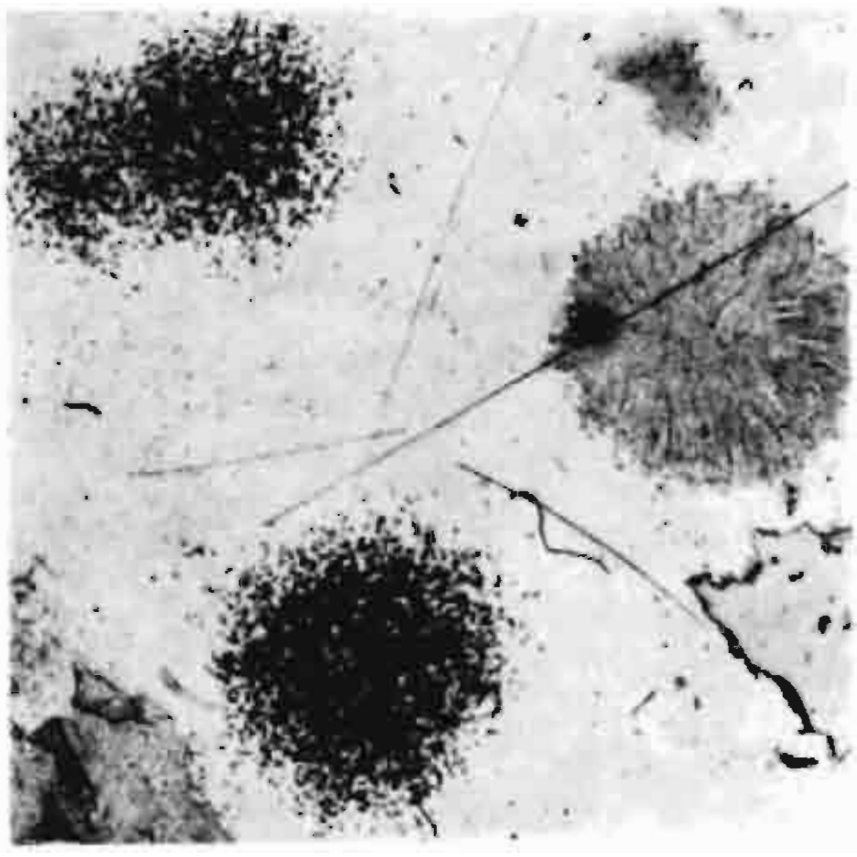


Рис. 11.4. Устойчивая инактивация Х-хромосомы. Приблизительно 30 клеток от женщины, гетерозиготной по гену, обусловливающему недостаточность фермента ГФРТ, помещали в чашку Петри для культивирования. Клетки визуализировали с помощью радиоавтографии после инкубации в среде, содержащей радиоактивный гипоксантин. Клетки, содержащие ГФРТ, включают радиоактивные соединения в свою РНК и засвечивают фотографическую эмульсию, нанесенную поверх них. Клоны клеток без ГФРТ выглядят более светлыми, так как их клетки не могут включать радиоактивные соединения. (Из Migeon, 1971; фотография с любезного разрешения B. Migeon.)

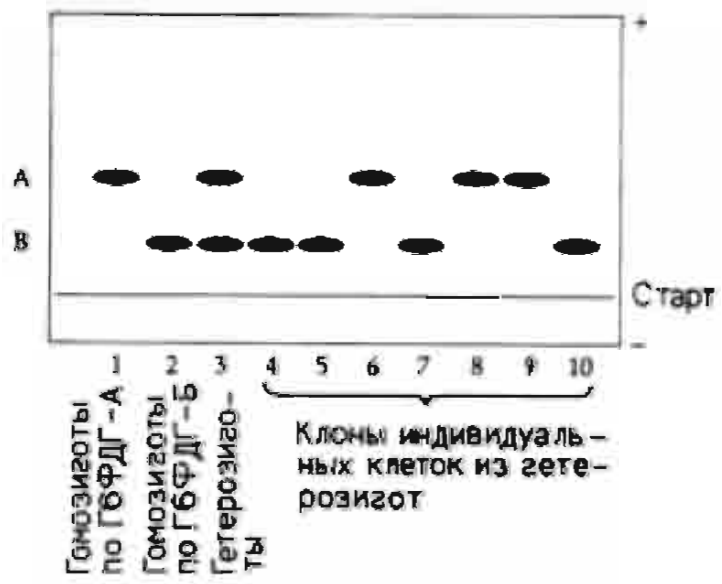


Рис. 11.5. Две популяции клеток у женщин. Электрофорез препаратов, полученных из клеток кожи женщин, гетерозиготных по гену Г6ФДГ, показывает, что синтез происходит на обеих хромосомах, но на разных хромосомах в различных клетках. В культивированных гетерозиготных клетках кожи (дорожка 3) содержатся ферменты обоих типов. Однако в каждом клоне индивидуальных клеток кожи (дорожки 4–10) наблюдается только одна форма фермента.

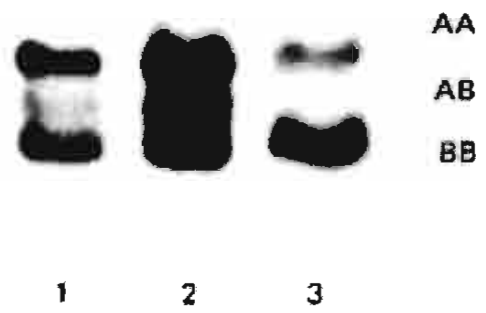


Рис. 11.6. В ооцитах млекопитающих обе Х-хромосомы активны. Электрофорез клеток из яичников (дорожки 1 и 2) и легкого (дорожка 3) 14-недельного плода человека, гетерозиготного по Г6ФДГ. Клетки легкого экспрессируют А (АА)- и В (ВВ)-формы фермента, тогда как клетки яичника содержат также гетеродимер (АВ). Выраженные А- и В-зоны в случае яичников отражают тот факт, что клетки собственно яичников экспрессируют только А- и В-формы фермента, а гетеродимер экспрессируется только в ооцитах. (Фотография с любезного разрешения B. Migeon.)

тических клеток. В женских *половых* клетках неактивная Х-хромосома реактивируется незадолго до вхождения клеток в мейоз (Kratzer, Chapman, 1981; Gartler et al., 1980). Таким образом, в зрелых ооцитах обе Х-хромосомы оказываются активными. Это показано на рис. 11.6. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является димерным ферментом, поэтому каждая соматическая клетка содержит ферменты, построенные из двух А-субъединиц или из двух В-субъединиц. У гетерозиготной самки в одних клетках будет содержаться фермент, состоящий из двух А-субъединиц, тогда как в других – состоящий из двух В-субъединиц (в зависимости от того, какая Х-хромосома активна в конкретной клетке). Однако если в одной и той же клетке активны *обе* Х-хромосомы, то следует ожидать появления молекул этого фермента, состоящих из одной А-субъединицы и одной В-субъединицы. Именно это наблюдается в ооцитах (Gartler et al., 1973; Migeon, Jalalian, 1977). В них обнаруживается *АВ-гетеродимер*, что свидетельствует о транскрипционной активности в одной и той же клетке обеих Х-хромосом.

Вторая группа исключений касается случайного характера инактивации Х-хромосом. Правило случайности справедливо, однако иногда наблюдается предпочтительная инактивация отцовской Х-хромосомы. В тканях трофобласта самки мыши (у человека наблюдается иная ситуация) экспрессия материнской Х-хромосомы доминирует в такой степени, что отцовская Х-хромосома практически не экспрессируется. У сумчатых отцовская Х-хромосома также предпочтительно инактивируется во всех тканях зародыша (Sharman, 1971; Cooper et al., 1971). Мы пока не знаем, почему так происходит, но выяснение этого вопроса может оказаться ключе-

Дополнительные сведения и гипотезы

Определение времени инактивации Х-хромосомы

Инактивация одной из двух Х-хромосом млекопитающих в разных тканях происходит в разное время. В пределах зародыша эта инактивация происходит во всех клетках эпибласта до дифференцировки тканей (Nesbitt, 1974; Gartler, Riggs, 1983). Такая инактивация Х-хромосомы наблюдается также в клетках тератокарциномы. Как упоминалось в гл. 6, эти клетки напоминают ранние бластомеры внутренней клеточной массы тем, что являются тотипотентными и могут дифференцироваться в клетки других типов. В стволовых клетках тератокарциномы обе Х-хромосомы активны, но при дифференцировке этих клеток одна из Х-хромосом в каждой клетке становится поздно реплицирующейся и транскрипционно инертной (McBurney, Strutt, 1980).

В отличие от этого во внезародышевых тканях инактивация Х-хромосомы может происходить неслучайным образом и в различное время. Впервые инактивацию Х-хромосомы наблюдали в трофической эктодерме мыши, где специфически инактивируется Х-хромосома, полученная от отца (Tagaki, 1974; West et al., 1977). Этот пример напоминает ситуацию у самок сумчатых, у которых отцовская Х-хромосома инактивируется во всем зародыше (Cooper et al., 1971; Samollow et al., 1987). У мыши последующая инактивация Х-хромосомы происходит в тканях гипобласта и затем, наконец, в эпибласте зародыша (Monk, Harper, 1979). На рис. 11.7 показан цикл инактивации Х-хромосомы у мыши.

То, что инактивация Х-хромосомы происходит подобным образом в плаценте мыши, вовсе не означает, что аналогичным образом она происходит в плаценте всех других млекопитающих.[1] В ворота

[1] Оказался в заблуждении даже Леонардо да Винчи. На его известном рисунке человеческого плода изображена плацента теленка, а не человека. Как отметил один исследователь (Renfree, 1982), этот рисунок служит предостережением тем, кто склонен к некритичной экстраполяции данных от одного вида млекопитающих к другому.

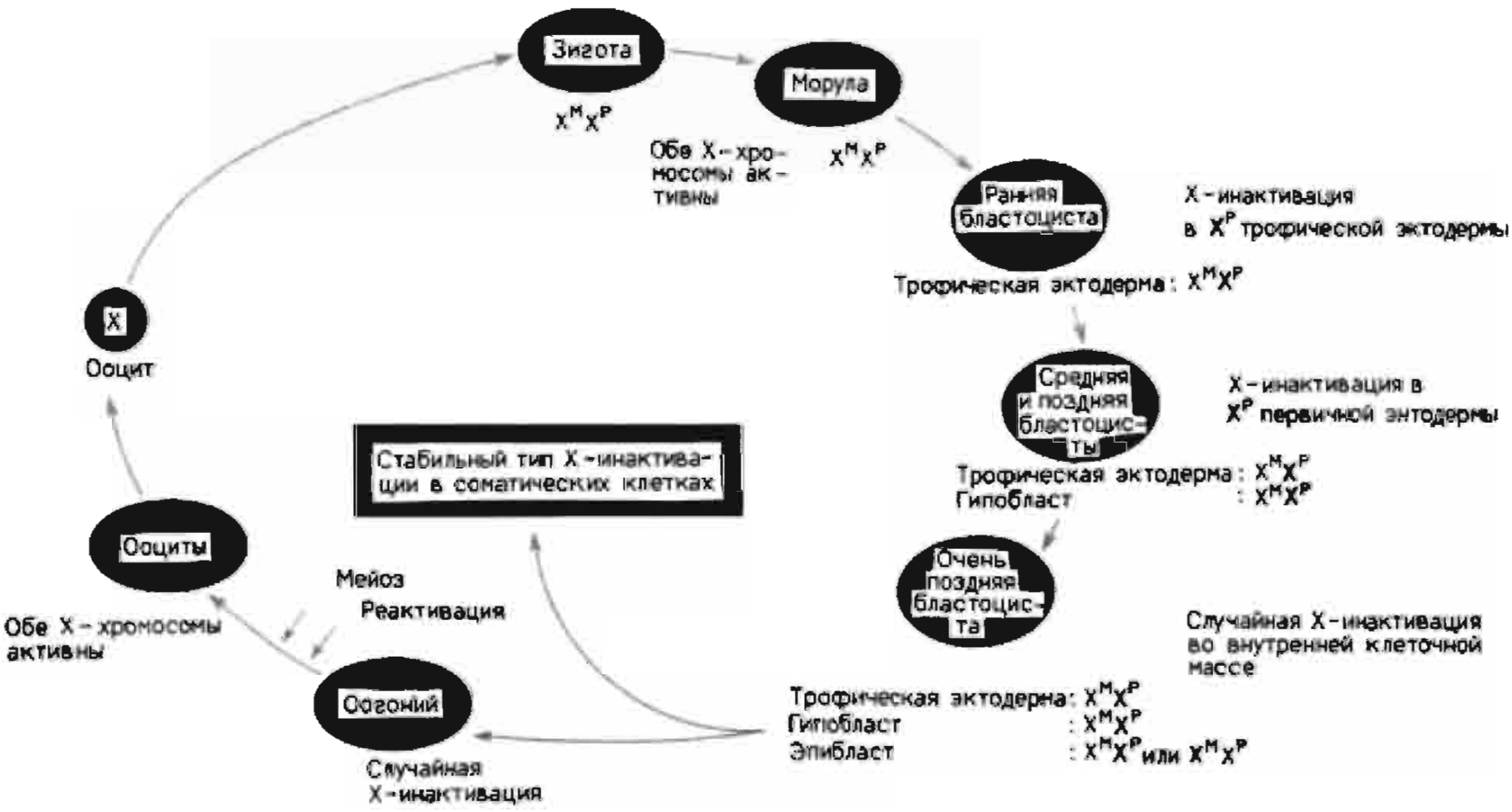


Рис. 11.7. Цикл инактивации Х-хромосомы у мыши. X^M и X^P – соответственно материнская и отцовская Х-хромосомы. Неактивное состояние обозначено жирным символом. Примордиальные первичные половые клетки перед тем, как они мигрируют в гонады, имеют конденсированную Х-хромосому (предположительно инактивированную); обе Х-хромосомы становятся активными вскоре после того, как первичные половые клетки мигрируют в гонады (Witschi, 1957; Kratzer, Chapman, 1981). (По Gartler, Riggs, 1983.)

синках хориона человека некоторые клетки содержат две активные Х-хромосомы, а те Х-хромосомы, которые инактивированы, могут реактивироваться (Migeon et al., 1985, 1986). Кроме того, инактивация Х-хромосом в плаценте человека носит случайный характер; может быть выключена любая Х-хромосома – отцовская или материнская.

В следующей главе мы обсудим молекулярный механизм поддержания транскрипционной инертности одной из двух Х-хромосом.

вым этапом на пути к пониманию механизма инактивации Х-хромосомы.

В-третьих, инактивация Х-хромосомы может не распространяться на всю длину хромосомы. Почти все известные гены Х-хромосомы картированы на ее длинном плече. Однако у человека ген сульфатазы стероидов расположен на коротком плече Х-хромосомы. Оказалось, что этот локус не инактивируется (Mohandas et al., 1980). Таким образом, гетерохроматизация может не распространяться целиком на всю Х-хромосому.

Четвертое исключение на самом деле подтверждает правило. Окраску волосяного покрова у самцов некоторых млекопитающих можно объяснить лишь в том случае, если у этих животных происходит инактивация Х-хромосомы. К числу таких примеров относятся мозаичные и черепаховые коты. Характерная пятнистая окраска наблюдается обычно у кошек, и это рассматривается как следствие описанных выше правил. Но в редких случаях пятнистая окраска обнаруживается также у котов. Как это может происходить? Оказалось, что такие коты имеют генотип XXY. Имеющаяся Y-хромосома обусловливает их мужской пол (см. гл. 21), но, как и у кошек, одна Х-хромосома у этих котов инактивируется (Centerwall, Benirschke, 1973). Таким образом, в клетках этих котов содержатся тельца Барра, сохраняющиеся после случайной инактивации одной из Х-хромосом. Исходя из всего сказанного, становится очевидным, что один из механизмов регуляции генов на уровне транскрипции заключается в переводе большого числа генов в гетерохроматин и, следовательно, в транскрипционно инертное состояние.

Амплифицированные гены

Амплификация генов рибосомной РНК

Одна из стратегий для транскрипции огромного количества определенной РНК заключается в образовании существенно большего количества копий данного гена. Этой стратегией пользуются лишь в редких случаях и главным образом для амплификации генов рибосомной РНК у насекомых и амфибий, а также генов хориона (оболочки яйца) у некоторых насекомых, например у дрозофилы. Во многих отношениях рибосому можно рассматривать как продукт дифференцированной клетки – ооцита. Это особенно справедливо для амфибий, ооциты которых содержат приблизительно в 200 000 раз больше рибосом, чем обычные соматические клетки. Такое число рибосом для одной клетки – феномен действительно впечатляющий. В самом деле, зиготы, в которых отсутствуют ядрышковые организаторы, осуществляющие синтез рибосомной РНК, продолжают развитие, используя запасенные рибосомы вплоть до стадии самостоятельно питающегося головастика (на этой стадии личинки все же погибают из-за отсутствия необходимых для роста рибосом).

В ооцитах амфибий синтез рибосомной РНК происходит в течение продолжительной профазы первого деления мейоза, а именно на длящейся многие месяцы стадии диплотены после спаривания и репликации гомологичных хромосом.

Наиболее изучены гены рибосомной РНК *Xenopus laevis*. Эти гены изображены на рис. 11.8. За 5′-лидерной последовательностью расположена последовательность, кодирующая 18S-рРНК. Далее следуют транскрибируемый спейсер, ген для 5,8S-рРНК, другой транскрибируемый спейсер и затем ген для 28S-рРНК. Внутри этих генов нет интронов, и весь этот набор транскрибируется в 40S-предшественник рРНК, который подвергается затем процессингу с образованием трех рРНК (5S-рРНК синтезируется на другом участке генома; гены 5S-рРНК представлены в геноме тысячами копий и не амплифицированы[1]).

Механизм амплификации рибосомных генов

В диплоидной клетке лягушки имеются две гомологичные области генов больших рРНК. Каждая область содержит примерно 450 копий единиц

[1] *Повторяющиеся гены* – это гены, которые всегда присутствуют в геноме в большом числе копий; этот признак наследуется. Гены 5S-рРНК, представленные тысячами копий на геном, составляют набор повторяющихся генов. *Амплифицированные* гены – это гены, присутствующие в количестве многих копий только в определенных клетках. Эта множественность не наследуется. Гены для 28S-, 18S- и 5,8S-рРНК – повторяющиеся (около 900 раз на 1 клетку) и амплифицированные (в ооците).

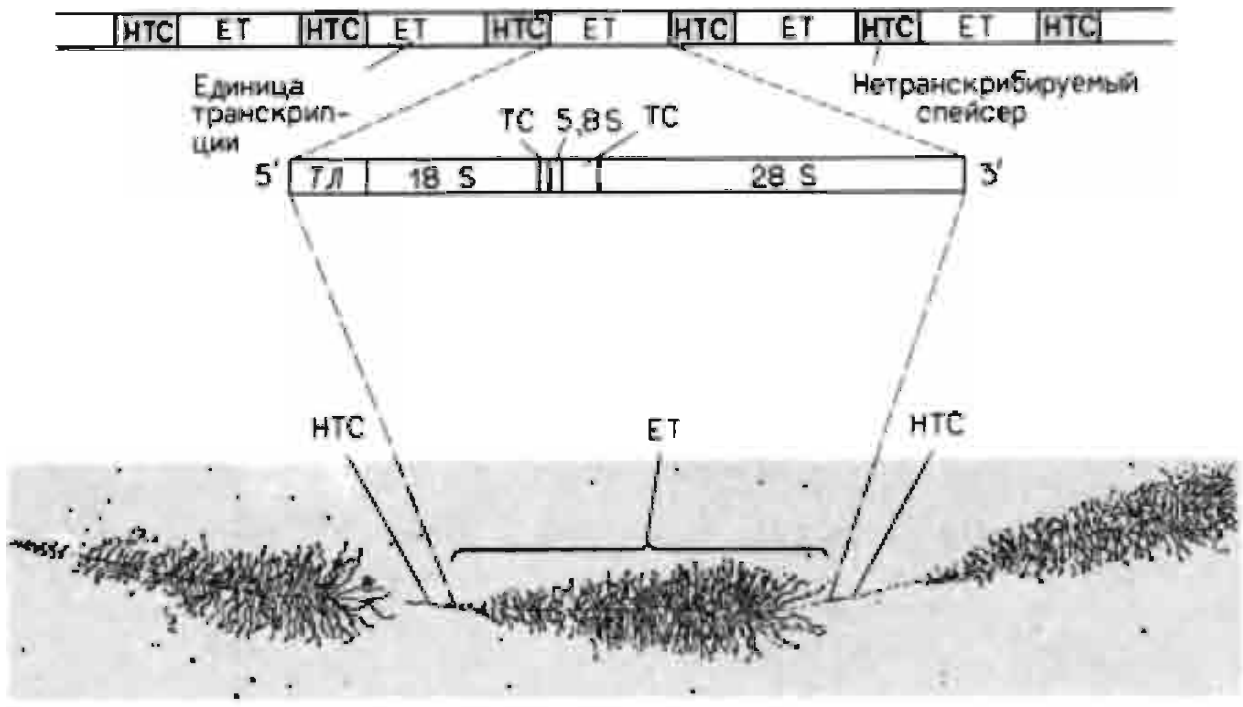


Рис. 11.8. Организация генов для рибосомных 18S-, 5,8S- и 28S-РНК у амфибий. Каждая единица транскрипции (ЕТ) фланкирована участками нетранскрибируемых спейсеров (НТС). Единица транскрипции содержит транскрибируемую лидерную последовательность (ТЛ), ген 18S-рРНК, транскрибируемый спейсер (ТС), ген 5,8S-рРНК, другой транскрибируемый спейсер и ген 28S-рРНК. Под диаграммой показана электронная микрофотография тандемно расположенных генов рРНК, активно транскрибируемых в ооците тритона. В ходе транскрипции размер РНК постепенно увеличивается и одновременно синтезируется большое количество транскриптов. (По Watson, 1976; фотография с любезного разрешения O. L. Miller, Jr.)

транскрипции, описанных в предыдущем разделе, и внутри каждой области эти копии разделены нетранскрибируемыми спейсерами. Все наборы генов рРНК на хромосоме идентичны, а нетранскрибируемые спейсеры даже на одной хромосоме разные по длине на разных участках. Можно было бы ожидать, что ооцит на стадии диплотены (когда репликация ДНК уже закончилась) будет содержать всего 4×450, или приблизительно 1800 генов, кодирующих рРНК. Но этого явно недостаточно! Вместо нескольких тысяч копий обнаруживается около миллиона генов рРНК. Видны не четыре ядрышка, а тысячи (рис. 11.9). Эти добавочные ядрышки лежат внутри ядра, но не присоединены к какой-либо хромосоме, как обычные ядрышки.

Сравнивая эффективность гибридизации радиоактивной 28S-рРНК ооцита с ДНК соматической клетки, исследователи определили, что в ооците генов рРНК в 1500 раз больше, чем обычно. Если каждое ядрышко содержит 450 копий генов, то общее число генов для предшественников больших рРНК в ооците амфибий можно оценить как $6{,}8 \times 10^5$. Амплификацию можно изучать также с помощью метода центрифугирования в градиенте хлорида цезия. При центрифугировании фрагментированной ДНК в таком градиенте фрагменты седиментируют в соответствии со своей плавучей плотностью. Плавучая плотность ДНК из соматических клеток *X. laevis* составляет в среднем 1,699 $г \cdot см^{-3}$. Распределение по плотности для фрагментированной ДНК из ооцитов несколько отличается (рис. 11.10). В этом случае наблюдается второй или «сателлитный» пик, обусловленный содержанием ДНК из амплифицированных генов рРНК. Состав осно-

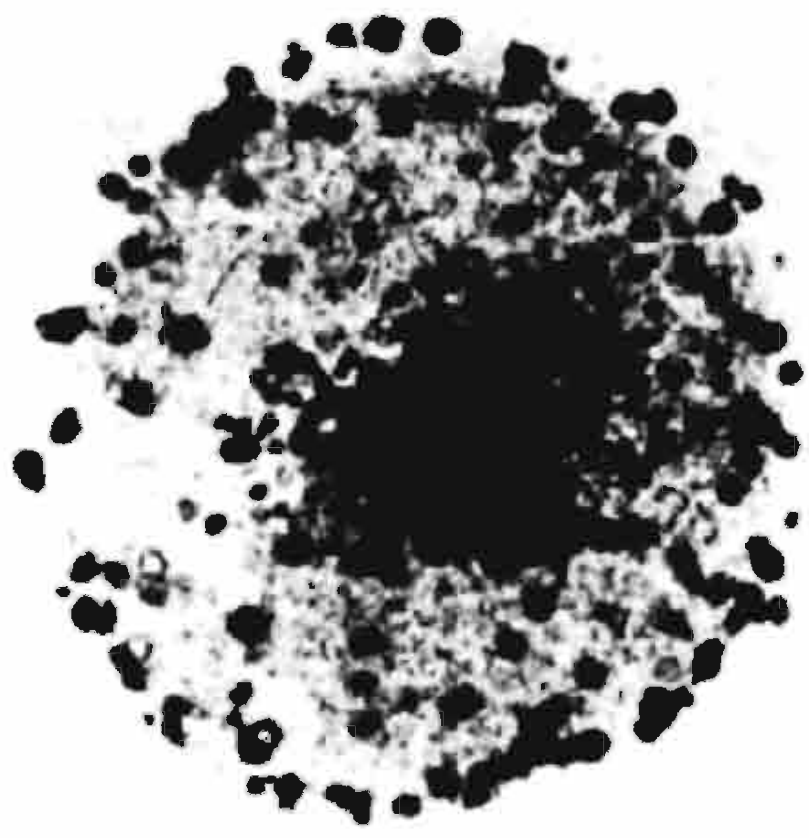


Рис. 11.9. Ядро, изолированное из ооцита *Xenopus laevis*. Темноокрашенные пятна представляют собой экстрахромосомные ядрышки. (Из Brown, Dawid, 1968; фотография с любезного разрешения D. D. Brown.)

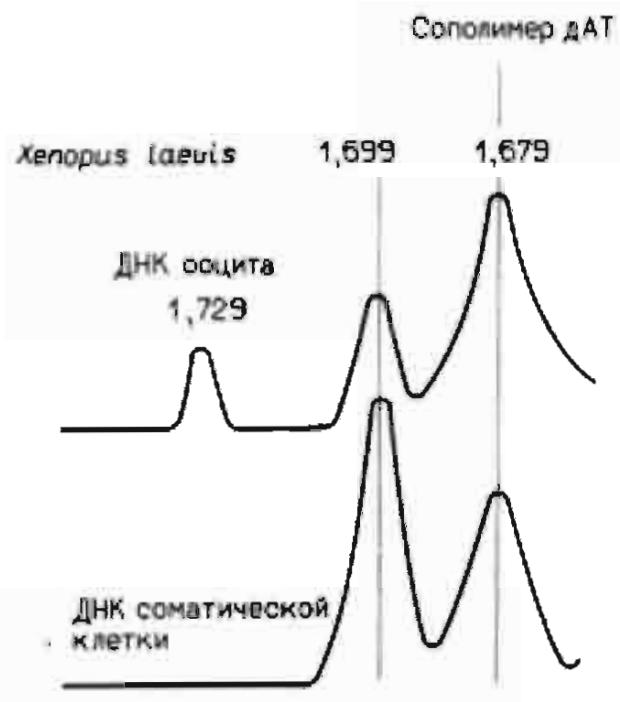


Рис. 11.10. Выделение экстрахромосомных (амплифицированных) ядрышек. Из ядер соматических клеток и ядер ооцитов была изолирована ДНК; каждый препарат смешивали со стандартным количеством дАТ (для нормирования результатов) и центрифугировали в хлориде цезия до достижения равновесия. В обоих случаях основная фракция ДНК имела плотность 1,699 г·см$^{-3}$. Помимо этой ДНК в ооцитах содержалась «сателлитная» фракция с большей плотностью. (По Brown, Dawid, 1968.)

раз, они образуют зону тяжелой ДНК, легко отличимую от основной зоны. Эта ДНК будет гибридизоваться только с рибосомной ДНК, но не с другими генами. Не вызывает сомнений, что мы наблюдаем специфическую амплификацию гена – амплификацию, которая позволяет транскрибировать чрезвычайно большое количество РНК (Brown, Dawid, 1968).

Следующий интересующий нас вопрос – как происходит амплификация этих генов? И хотя нам неизвестны детали механизма амплификации, мы располагаем некоторыми подходами к его выяснению. Мы знаем, например, что экстрахромосомные ядрышки образуются на стадии пахитены в профазе мейоза непосредственно перед диплотеной. В самом деле, для этой стадии характерна «пахитенная шапочка», которая представляет собой большую массу экстрахромосомной ДНК. Таким образом, добавочные гены синтезируются на стадии пахитены мейоза и транскрибируются на стадии диплотены. Когда ядро ооцита дезинтегрируется в ходе первого деления мейоза, добавочные ядрышки выходят в цитоплазму и разрушаются.

Один из наиболее интересных подходов к механизму амплификации связан с тем, что в каждом отдельном экстрахромосомном ядрышке участки нетранскрибируемых спейсеров имеют одинаковую длину (Wellauer et al., 1976). Однако среди хромосомных кластеров генов в одних и тех же клетках имеется заметная гетерогенность по длине спейсеров, поэтому экстрахромосомные ядрышки не являются простыми копиями всего хромосомного ядрышка. Одна из моделей, с помощью которой можно объяснить образование сотен транскрипционных единиц рибосомных генов, разделенных идентичными нетранскрибируемыми спейсерами, – это модель катящегося кольца. Аналогичный механизм

ваний этой ДНК придает ей бóльшую плавучую плотность (1,729 г·см$^{-3}$), чем плотность основной массы ДНК *Xenopus*. ДНК из клеток *X. laevis* имеет в среднем 40% ГЦ-пар, тогда как рибосомные гены – 67% ГЦ-пар. Поэтому рибосомные гены характеризуются большей плотностью, чем большинство других генов. В соматических тканях рибосомные гены составляют лишь 0,06% генома и не образуют заметного отдельного сателлитного пика. Однако, когда эти гены амплифицированы в 1500

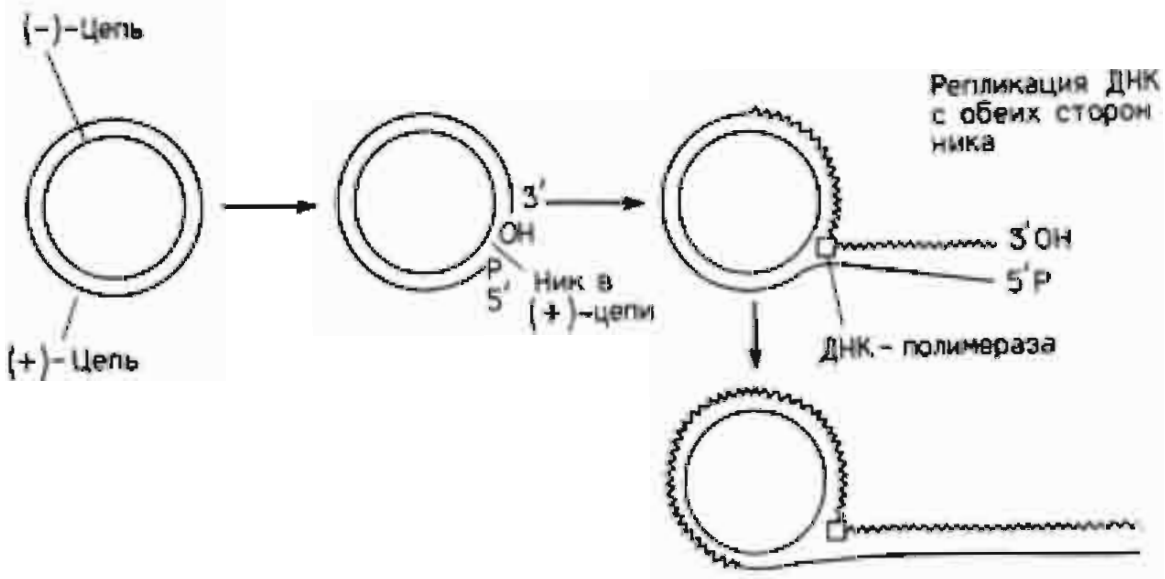


Рис. 11.11. Модель репликации по механизму «катящегося кольца», при которой можно синтезировать много идентичных копий. Кольцо должно содержать одну единицу транскрипции рРНК и один нетранскрибируемый спейсер. С помощью этого механизма могут быть созданы экстрахромосомные ядрышки с одинаковыми по длине участками НТС между генами.

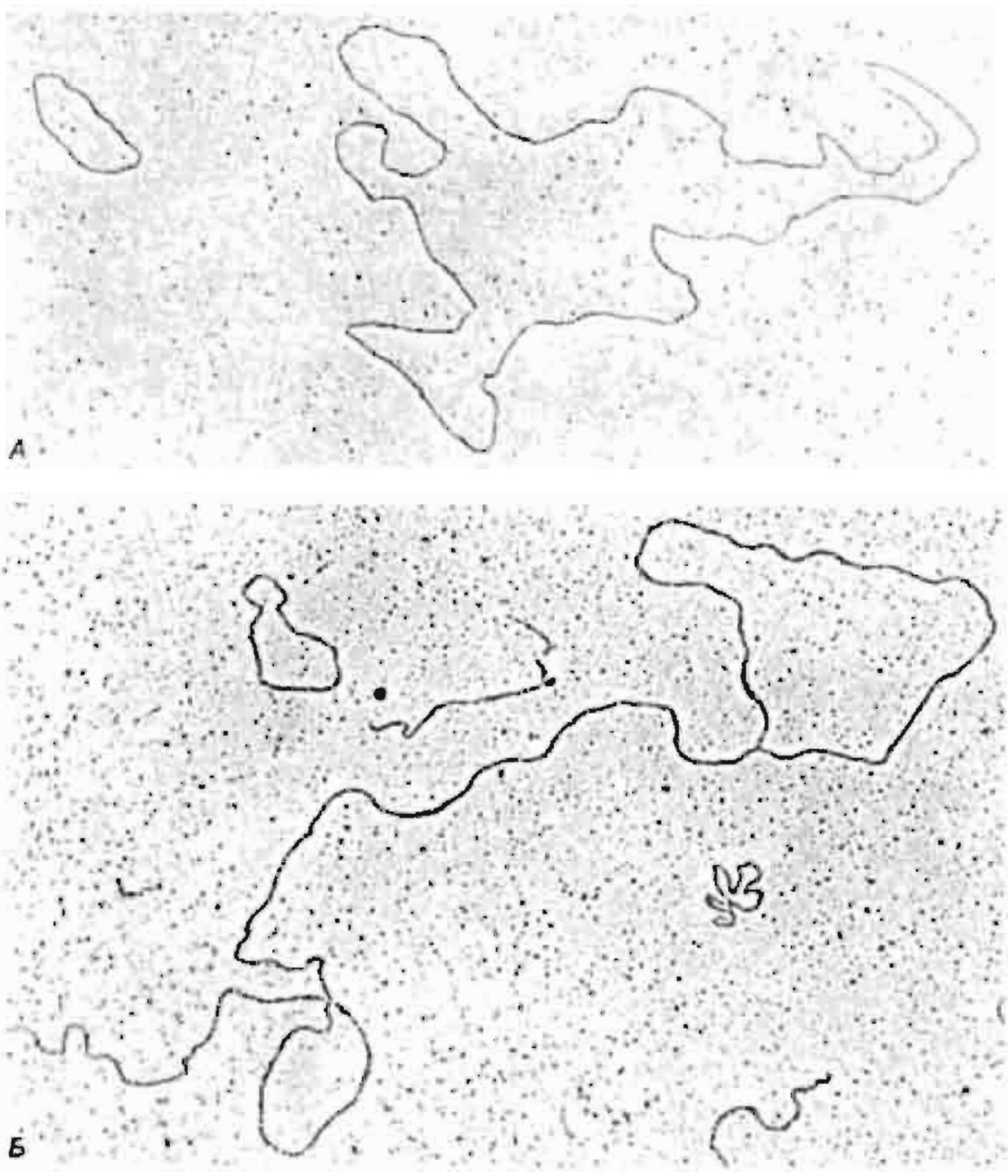


Рис. 11.12. Изолированная экстрахромосомная рРНК из ооцитов *Xenopus laevis*. На электронных микрофотографиях видны кольца (*А*) и «лариаты» (структуры типа лассо) (*Б*), что указывает на репликацию по механизму «катящегося кольца». (Из Rochaix et al., 1974; фотография с любезного разрешения A. Bird.)

репликации характерен для многих вирусов. В ооците один набор рибосомных генов каким-то образом отсоединяется от хромосомы и сворачивается в кольцо. В кольцо вводится ник (разрыв одной цепи), и с этого ника начинается синтез ДНК в обоих направлениях. Таким путем могут быть синтезированы идентичные копии рибосомных генов и их спейсеров (рис. 11.11). Электронные микрофотографии амплифицированных генов (Hourcade et al., 1973; Rochaix et al., 1974) подтверждают эту модель. На этих микрофотографиях выявляются замкнутые кольца, типичные для экстрахромосомных ядрышек, а также структуры типа «лариатов» (лассо), которые, по-видимому, представляют собой промежуточные продукты катящегося кольца (рис. 11.12).

Визуализация транскрипции на амплифицированных генах

Первыми генами, которые были выделены и очищены, стали амплифицированные гены рибосомных РНК из ооцитов амфибий. Они оказались также первыми генами, транскрипция которых реально наблюдалась с помощью электронного микроскопа. Зная, что эти гены высокоактивны в отношении транскрипции рРНК на стадии диплотены мейоза, Миллер и Битти (Miller, Beatty, 1969) для разделения петель хроматина перед электронной микроскопией использовали буферы с низкой ионной силой, что приводило к расплетанию колец ДНК и возникновению конфигурации, показанной на рис. 11.8. При

этом ДНК образует осевой стержень, на котором синтезируется рРНК. На каждом участке синтезируется множество цепей рРНК, и ряд таких участков показан на этом рисунке. На каждом участке транскрипция начинается на вершине «рождественской елки» и продолжается до тех пор, пока не будет синтезирован предшественник больших рибосомных РНК. В точке присоединения каждого РНК-транскрипта к ДНК находится молекула РНК-полимеразы. Длина РНК в этих больших транскриптах составляет около 7200 оснований, что примерно соответствует ожидаемым размерам предшественника рРНК. Между транскрибируемыми участками ДНК лежат «нетранскрибируемые спейсеры». Электронная микрофотография и в самом деле может дать нам точную картину процесса транскрипции эукариотического гена.

Дополнительные сведения и гипотезы

Молекулярная основа быстрой транскрипции рибосомных генов

Для осуществления транскрипции необходимо взаимодействие РНК-полимеразы с ДНК. Однако далеко не каждый фрагмент ДНК подходит для этого (в противном случае транскрипция могла бы начаться где угодно и клетка заполнилась бы дефектными молекулами мРНК). Участок ДНК, специализированный для связывания РНК-полимеразы, называют **промотором**. В клетках эукариот содержатся РНК-полимеразы трех различных типов, каждый из которых характеризуется определенными свойствами и функцией (Rutter et al., 1976). **РНК-полимераза I** обнаруживается в области ядрышка в ядре и отвечает за транскрипцию больших рРНК. **РНК-полимераза II** транскрибирует предшественники мРНК, а **РНК-полимераза III** транскрибирует малые РНК, такие, как транспортные РНК, рибосомную 5S-РНК и другие небольшие последовательности РНК. Эти полимеразы имеют различную чувствительность к ионным условиям и антибиотикам. Их свойства представлены в табл. 11.1.

Высокая эффективность транскрипции рибосомных генов может быть обусловлена структурой области спейсера между соседними генами рибосомной РНК. Как у большинства генов, промотор, присоединяющий РНК-полимеразу, лежит непосредственно перед (5′) кодирующей областью гена. Однако в отличие от большинства других генов у генов рРНК прямо перед промотором имеется последовательность ДНК, отвечающая за терминацию транскрипции (рис. 11.13). Эта структура (до сих пор обнаруженная только в рибосомных генах млекопитающих и амфибий) может концентрировать молекулы РНК-полимеразы на этих генах. У большинства генов при терминации транскрипции происходит высвобождение РНК и РНК-полимеразы в нуклеоплазму. РНК-полимераза может затем использоваться повторно, если найдет на ДНК новый промоторный сайт. Этот процесс, на который заведомо должно тратиться время, возможно, не осуществляется при транскрипции рибосомных генов. Вместо этого после отделения 40S-предшественника рРНК от гена РНК-полимераза остается на спейсере, синтезируя, вероятно, короткие нестабильные транскрипты (Labhart, Reeder, 1986). Как отмечалось ранее, непосредственно перед промотором находится специальный участок терминации транскрипции. Этот участок взаимодействует с промотором для обеспечения переноса РНК-полимеразы к соседнему гену (McStay, Reeder, 1986; Henderson, Sollner-Webb, 1986; Grummt et al., 1986). Поэтому, коль скоро РНК-полимераза начала транскрипцию рибосомного гена, она переносится затем от одного

Таблица 11.1. Общая классификация РНК-полимераз эукариот

Свойство	РНК-полимераза I	РНК-полимераза II	РНК-полимераза III
Локализация в клетке	Ядрышко	Нуклеоплазма	Нуклеоплазма
Доля клеточной активности, %	50–70	20–40	10
Основной продукт транскрипции	Полимеры больших рРНК	Предшественники мРНК	тРНК и 5S-рРНК
Концентрация α-аманитина, вызывающая 50%-ное ингибирование, мкг·мл$^{-1}$			
полимеразы млекопитающих	>400	0,025	20
полимеразы насекомых	–	0,03	>1000
полимеразы дрожжей	600	1,0	>2000

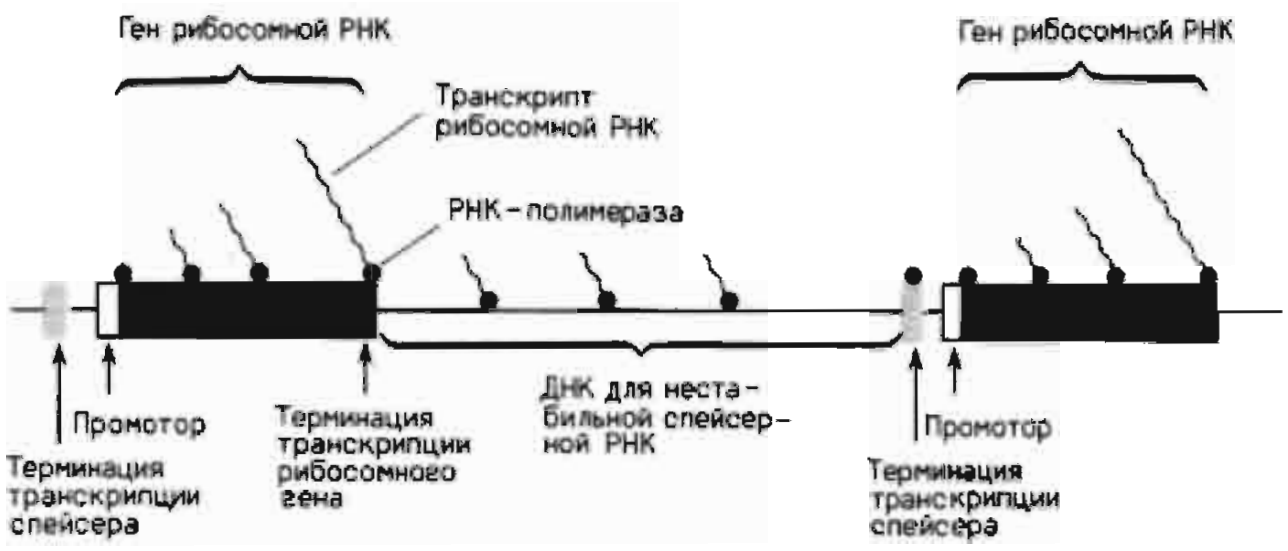


Рис. 11.13. Модель транскрипции рибосомной ДНК с задержкой РНК-полимераз. Показаны два тандемно расположенных гена. Молекула РНК-полимеразы I (обозначена кружком) инициирует и транскрибирует новообразованную РНК. После достижения сайта терминации рРНК полимераза остается связанной с ДНК и проходит участок спейсера, вероятно транскрибируя короткоживущие РНК. На участке терминатора непосредственно перед (5′)-промотором рРНК прекращается синтез спейсерных транскриптов, и полимераза оказывается готовой для взаимодействия с промотором для инициации транскрипции следующего гена. Существует возможность присоединения новых молекул РНК-полимеразы к промотору или к специфичным участкам внутри спейсера. (По Henderson, Sollner-Webb, 1986.)

гена к другому без вхождения в пул несвязанных полимераз.

Не исключено также, что свободно плавающие молекулы РНК-полимеразы I способны узнавать определенные участки ДНК в спейсерах и вовлекаться в транскрипцию рибосомной РНК. В этом случае спейсер будет действовать как «зона загрузки», накапливая новые полимеразы для транскрипции генов рибосомной РНК (Moss, 1983; Henderson, Sollner-Webb, 1986).

Гены хориона дрозофилы

Известно, что при синтезе белков хориона у *Drosophila melanogaster* гены хориона также амплифицируются. Белки хориона синтезируются фолликулярными клетками яичника. Перед началом экспрессии генов хориона весь геном фолликулярных клеток проходит дополнительные циклы синтеза ДНК, так что количество ДНК достигает 16 гаплоидных наборов. После этой репликации гены белков хориона реплицируются избирательно еще около десяти раз. Эта амплификация происходит только в фолликулярных клетках яичника (Spradling, Mahowald, 1980). Амплификация обусловлена дополнительными циклами репликации ДНК лишь в определенных областях генома (Spradling, 1981). Эти области ДНК характеризуются наличием нескольких ветвей, каждая из которых содержит амплифицированные гены хориона (рис. 11.14 и 11.15). В данном случае амплификация происходит, но гены остаются присоединенными к хромосомам.

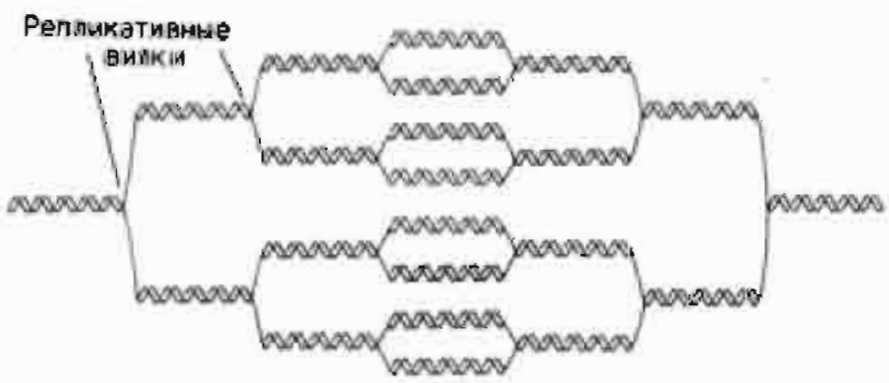


Рис. 11.14. Амплификация генов хориона в пределах хромосомы. Схема локальной амплификации с помощью многократных циклов синтеза ДНК в области, уже содержащей множественные копии генов хориона.

Селективная транскрипция генов

Большинство генов не используют избирательную амплификацию в качестве механизма для обеспечения крупномасштабной экспрессии. В развивающихся эритроцитах, в которых гемоглобин составляет 98% всего синтезируемого белка, не наблюдается избирательной амплификации глобиновых генов. В шелкоотделительной железе гусениц, продуцирующих огромное количество белка шелка фиброина, весь геном амплифицируется с помощью политении. Даже в этом случае отсутствует селективная амплификация генов фиброина. На основании этого мы полагаем, что определенные гены могут транскрибироваться избирательно.



Рис. 11.15. Амплификация генов хориона в фолликулярных клетках *Drosophila* (электронная микрофотография). Стрелками указаны места репликации ДНК. (Из Osheim, Miller, 1983; фотография с любезного разрешения O. L. Miller, Jr.)

Хромосомные пуфы и хромосомы типа ламповых щеток

Природа политенных хромосом и их пуфов была рассмотрена в гл. 10. Представленные в ней данные иллюстрируют контроль за активностью определенных генов на уровне транскрипции. Если к слюнным железам добавляют экдистерон, то наблюдается возникновение одних пуфов и исчезновение других. Образование пуфов опосредовано присоединением экдистерона к специфическим участкам на хромосомах. Это может быть продемонстрировано путем «сшивания» экдистерона с хроматином, которое фиксирует его положение на местах связывания. Затем добавляют кроличьи антитела против экдистерона и несвязавшиеся антитела удаляют промывкой. В конце добавляют меченные флуоресцеином козьи антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика, и несвязывавшиеся антитела отмывают. В результате флуоресцентная метка должна обнаруживаться в тех местах, где козьи антитела связались кроличьими антителами, а кроличьи антитела должны присоединяться только к экдистерону. Таким образом, флуоресцентная метка должна появиться на хромосоме в каждом сайте, где был связан экдистерон (Gronemeyer, Pongs, 1980). Результаты свидетельствуют о том (рис. 11.16), что практически все экдистерон-чувствительные пуфы связывают экдистерон.

Экдистерон-чувствительные пуфы, обнаруживаемые у поздней личинки третьего возраста (когда она готовится стать куколкой), можно грубо разделить на три категории. Пуфы, которые исчезают в присутствии экдистерона; пуфы, которые быстро индуцируются экдистероном, и пуфы, которые появляются через несколько часов после стимуляции экдистероном. Ранние пуфы формируются в пределах 1 ч после добавления экдистерона. Кроме

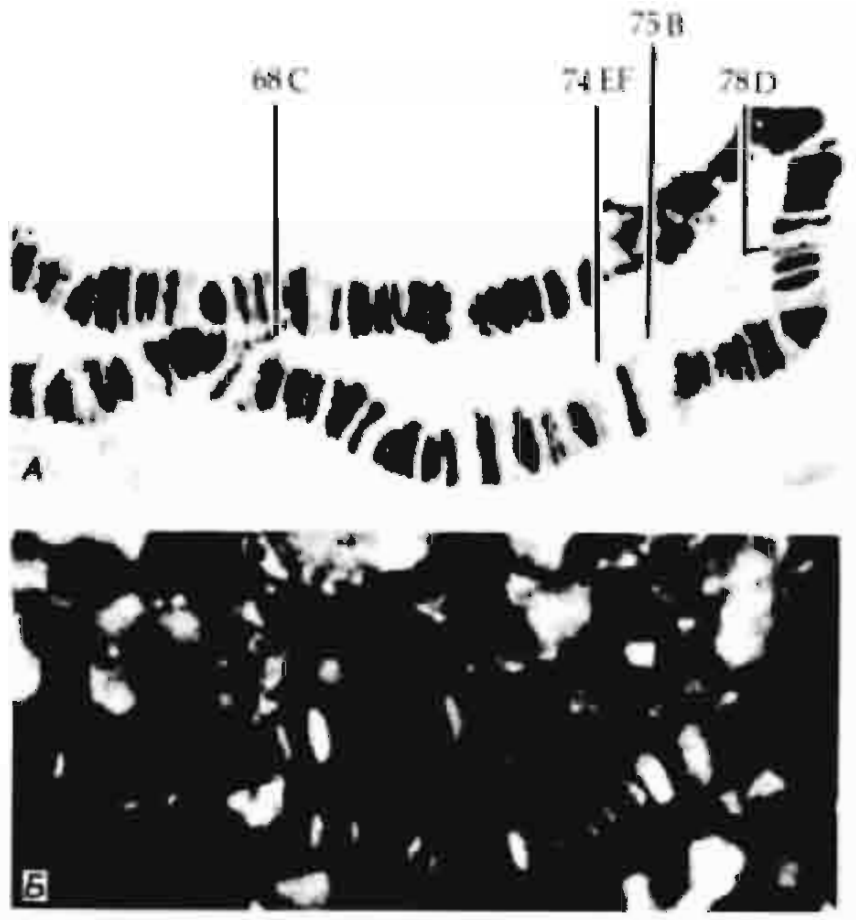


Рис. 11.16. Локализация экдистерона на политенных хромосомах *Drosophila*. После присоединения экдистерона к хромосомам in situ он может быть выявлен с помощью флуоресцирующих антител. *А*. Фрагмент хромосом слюнных желез (микрофотография методом фазового контраста). *Б*. Тот же фрагмент в ультрафиолетовом свете. Видна иммунофлуоресценция в областях, чувствительных к экдистерону. (С любезного разрешения O. Pongs.)

того, они, по-видимому, синтезируют продукты, которые необходимы для индукции поздних пуфов. Если к культивируемым клеткам дрозофилы добавить ингибиторы синтеза белка вскоре после того, как образовались ранние пуфы, то экдистерон не будет стимулировать формирование поздних пуфов. Очевидно, таким образом, что для образования поздних пуфов требуются и экдистерон, и продукты ранних пуфов (Ashburner, 1974).

Важно отметить, что экдистерон не только стимулирует образование пуфов в определенных участках хромосом личинки, но вызывает также регрессию некоторых уже существующих пуфов. Один из таких пуфов находится в положении 68C на левом плече хромосомы III. Этот сайт содержит ген для Sgs 3, «белка клея», обеспечивающего прикрепление оболочки куколки к твердой поверхности (Korge, 1975). У личинок последнего возраста этот участок хромосомы образует пуф только в слюнных железах. Добавление экдистерона к культивируемым слюнным железам вызывает быструю регрессию этого пуфа и прекращение транскрипции с данного гена (Crowley, Meyerowitz, 1984). Таким образом, белок клея может синтезироваться, когда он нужен для прикрепления личинки к субстрату, но после этого ген выключается и происходит метаморфоз.

Как будет рассмотрено более подробно в следующей главе, транскрипционная активность связана с изменениями в хроматине, и эти изменения могут быть вызваны присоединением негистоновых белков хроматина. Переваривание хроматина дрозофилы ДНКазой I приводит к высвобождению белка с молекулярной массой 63 000, который связывается со всеми экдизон-чувствительными локусами личинки третьего возраста (рис. 11.17). Хотя этот белок по своим размерам больше, чем белки, предположительно отвечающие за активацию транскрипции генов у позвоночных, он может выполнять аналогичную функцию в установлении и поддержании структуры хроматина, необходимой для активности генов (Mayfield et al., 1978).

Пуфы представляют собой расплетенную ДНК в определенных областях хромосом личинок насекомых. Так как эти хромосомы политенные, характерный вид пуфа создается тысячами нитей. Аналогичное расплетание ДНК в случае неполитенных хромосом наблюдается в ооцитах амфибий. Соответствующие структуры называют **хромосомами типа ламповых щеток**. На стадии диплотены мейоза компактные хромосомы амфибий образуют большие петли ДНК и втягивают их обратно после завершения этой стадии (рис. 11.18).

Представление о том, что подобное расплетание хромосом позволяет экспрессироваться определенным генам, может быть потверждено с помощью гибридизации in situ. Для этого следует приготовить



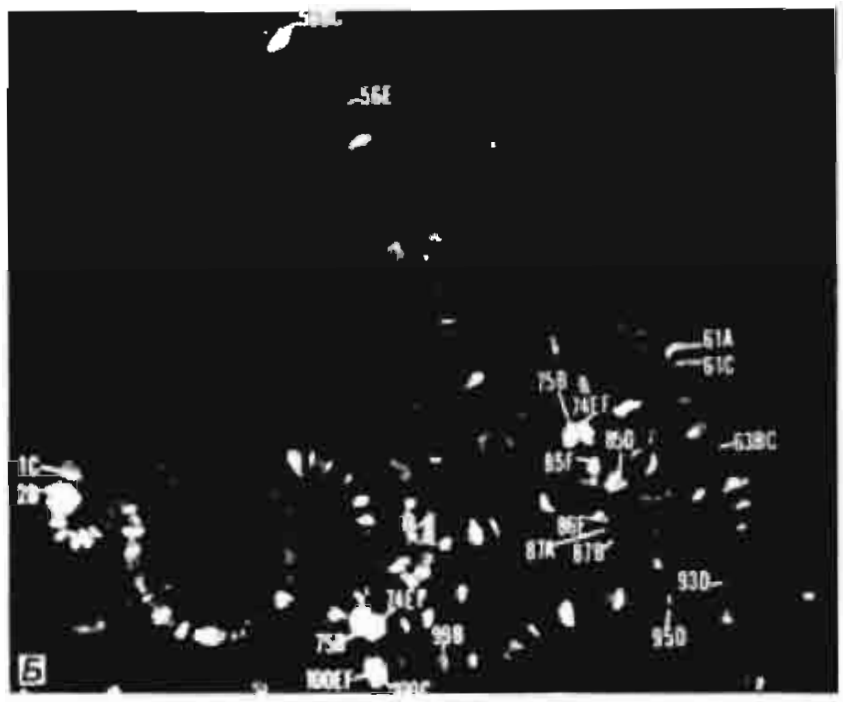


Рис. 11.17. Локализация белка, высвобождающегося из хроматина *Drosophila* при гидролизе ДНКазой I, с помощью иммунофлуоресценции. После получения антител к этому белку и их связывания с политенными хромосомами антитела могут быть выявлены с помощью других, флуоресцирующих антител. *А*. Микрофотография, полученная методом фазового контраста. *Б*. Тот же участок в ультрафиолетовом свете. Видны меченые сайты, чувствительные к экдистерону. (Рис. 11.16 и 11.17 можно сопоставить с рис. 10.26, на котором показана обычная последовательность пуфов.) (Из Mayfield et al., 1978; фотографии с любезного разрешения S. Elgin.)

препараты хромосом ооцитов, денатурировать их и проинкубировать с радиоактивной РНК, которая кодирует определенный белок. После того как несвязавшаяся РНК удалена отмывкой, радиоавтография позволяет точно определить местоположение гена. На рис. 11.19 показана хромосома I на стадии диплотены из ооцита тритона *Triturus cristatus* после инкубации с радиоактивной мРНК для



Рис. 11.18. Фрагменты хромосом типа «ламповых щеток» из ядра ооцита тритона. Можно видеть участки ДНК, образующие петли от центральной оси. (С любезного разрешения J. Gall.)

гистонов. Очевидно, что ген гистона (или набор гистоновых генов) локализован на одной из петель хромосомы типа ламповой щетки (Old et al., 1977). На электронной микрофотографии транскрипты генов на хромосомах типа ламповых щеток очень напоминают транскрипты на амплифицированных генах рибосомной РНК. Та же полярность «рождественской елки», но обычно (за исключением семейств, подобных гистоновым генам) на каждой петле имеется только одна транскрипционная единица (Hill, MacGregor, 1980).

Синтез овальбумина

Огромное яйцо курицы защищено многими дополнительными слоями, которые секретируются на его поверхность при прохождении яйца через яйцевод (рис. 11.20). Овулировавшее яйцо попадает в **воронку** левого яйцевода (правый яйцевод атрофируется у большинства птиц), где вскоре и происходит оплодотворение. Затем яйцо проходит в **магнум**, где секретируется овальбумин и другие полипептиды яичного белка, в **перешеек**, где оно одевается несколькими оболочками, и наконец, в **матку**, где добавляются вода, соли и скорлупа из углекислого кальция.

Основным продуктом клеток стенки магнума является овальбумин, и у кур-несушек овальбумин составляет более 50% белков клеток стенки. Продукция овальбумина зависит от присутствия полового гормона эстрогена. Эстроген проникает в клетку и захватывается белком-рецептором, который доставляет его в ядро. Комплекс эстроген–рецептор проходит через ядерную мембрану и связывается с хроматином, где стимулирует транскрипцию.

Зависимость синтеза овальбумина от присутствия эстрогена наглядно показана в опыте, когда эстроген был инъецирован молодым курам (Palmi-



Рис. 11.19. Локализация гистоновых генов на хромосоме типа «ламповой щетки». Гены были визуализированы с помощью гибридизации in situ и радиоавтографии. (Из Old et al., 1977; с любезного разрешения H. G. Callan.)

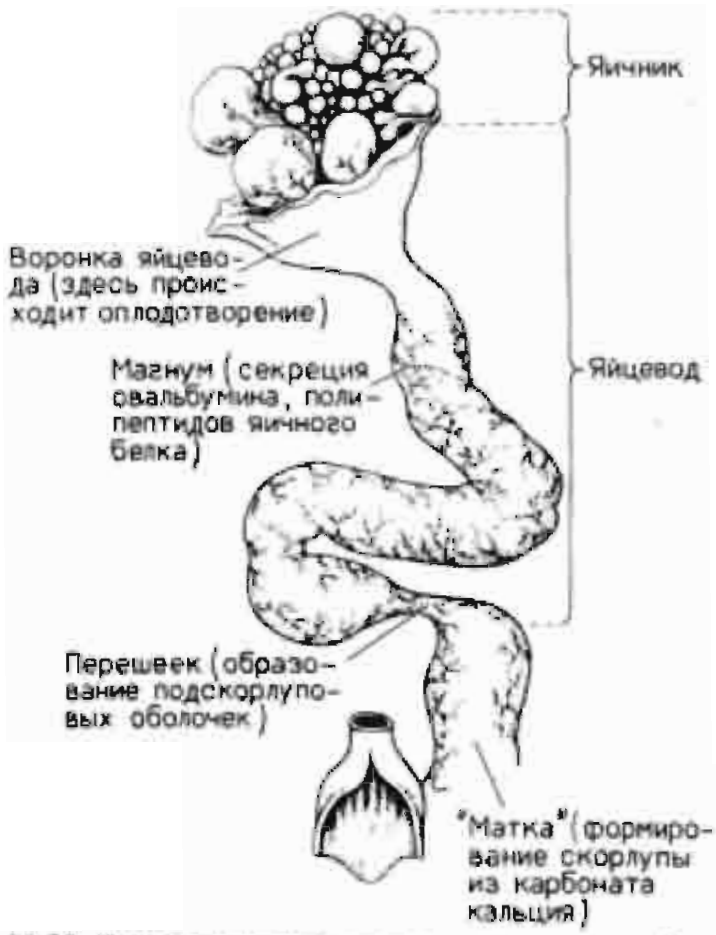


Рис. 11.20. Репродуктивная система половозрелой курицы. При прохождении яйца по яйцеводу оно покрывается многочисленными оболочками.

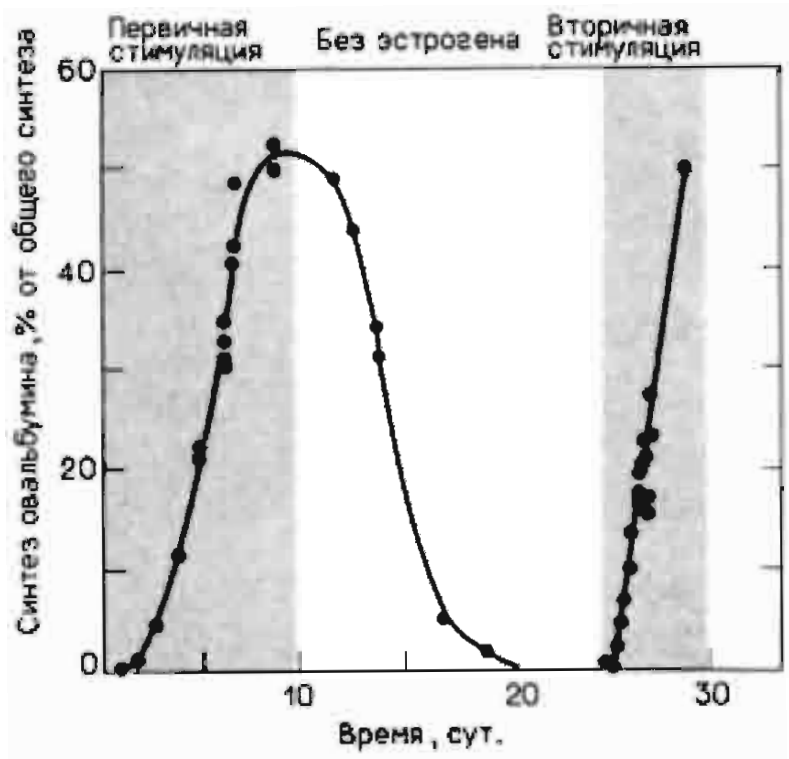


Рис. 11.21. Влияние эстрогена на синтез овальбумина в яйцеводе 4-дневных цыплят. Цыплятам ежедневно инъецировали эстроген (первичная стимуляция); через 10 сут инъекции прекращали. Еще через две недели инъекции возобновляли (вторичная стимуляция). (По Palmiter, Schimke, 1973.)

ter, Schimke, 1973). Эти инъекции вызывают дифференцировку пристеночных желез магиума и индуцируют синтез основных полипептидов яичного белка: овальбумина, кональбумина, овомукоида и лизоцима. За 2 нед обработки эстрогеном уровень овальбумина поднимается с исчезающе малых количеств до более чем 50% всех новосинтезированных клеточных белков (рис. 11.21). Удаление эстрогена вызывает снижение синтеза овальбумина, несмотря на то что клетки сохраняют свое дифференцированное состояние. Через две недели после удаления эстрогена зарегистрировать наличие овальбумина не удавалось.

Этот опыт показывает только то, что синтез овальбумина зависит от присутствия гормона. Он не говорит нам о том, какова рабочая концентрация этого гормона. Можно представить, что гормон или усиливает транскрипцию, или стабилизирует полипептид овальбумина или его мРНК, или даже способствует транспорту овальбуминовой мРНК через

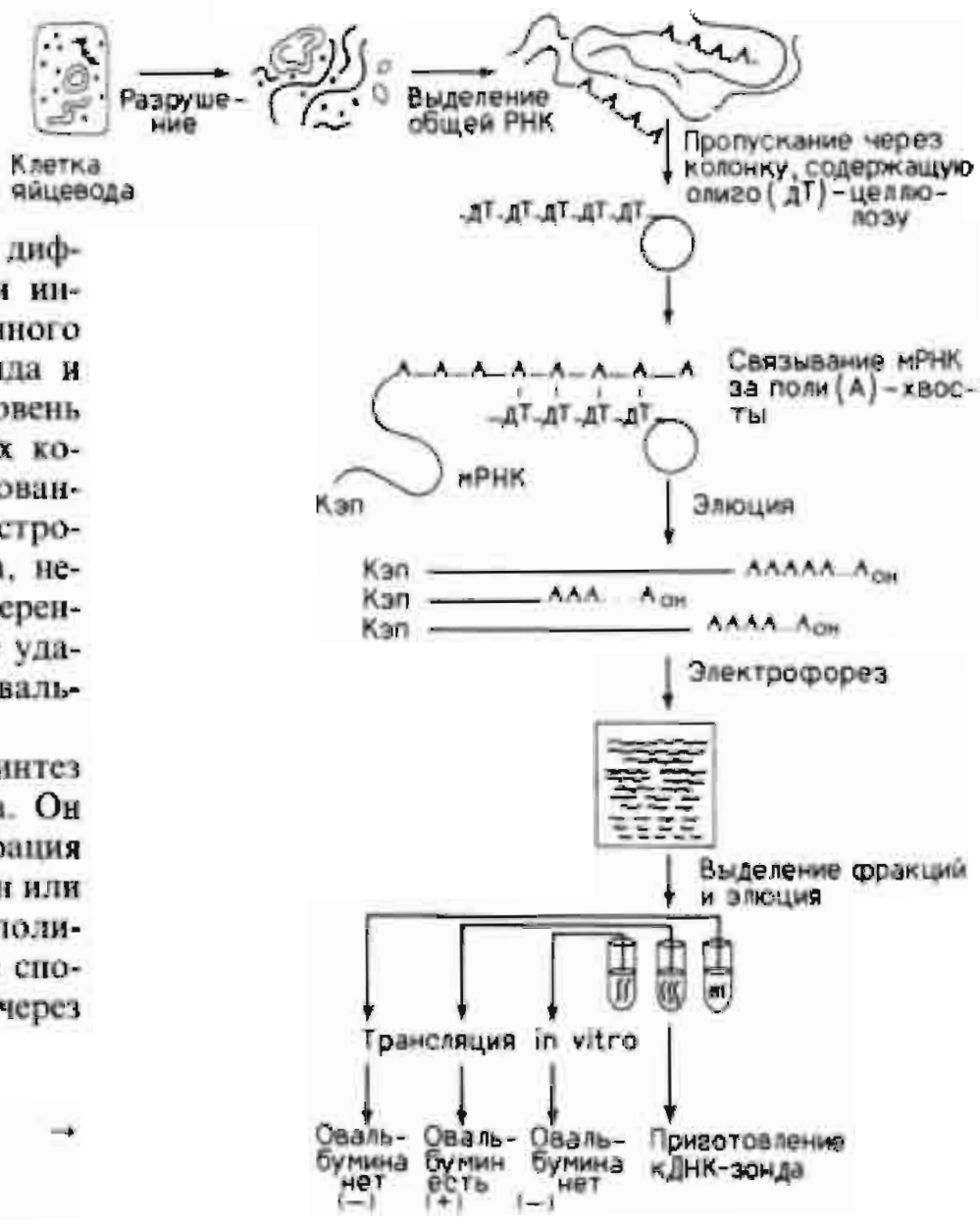


Рис. 11.22. Схема выделения овальбуминовой мРНК для приготовления кДНК-зонда. (Подробности см. в тексте.) →

Таблица 11.2. Транскрипционная регуляция овальбумина

А. Индукция цитоплазматической овальбуминовой мРНК в ходе первичной и вторичной стимуляции эстрогеном		*Б.* Индукция ядерных РНК-транскриптов, содержащих последовательности овальбумина	
Уровень гормона в яйцеводе[1]	Количество молекул мРНК на 1 клетку из желез стенки[2]	Ткань	Количество молекул РНК, содержащих последовательности овальбумина, на 1 ядро клетки из желез стенки[3]
Без стимуляции	Не регистрируется	*Яйцевод, стимулированный эстрогеном*	3075
+4 сут ДЭС	20 000		
+9 сут ДЭС	44 000		
+18 сут ДЭС	48 000		
После первичной стимуляции инкубация в течение 12 сут без эстрогена	0–4	*Яйцевод после первичной стимуляции и инкубации без эстрогена*	2
+0.5 ч ДЭС	9	+2 ч ДЭС	6
+1.0 ч ДЭС	50	+4 ч ДЭС	71
+4.0 ч ДЭС	2300	+8 ч ДЭС	460
+8.0 ч ДЭС	5100	+16 ч ДЭС	995
+29.0 ч ДЭС	17 000	+48 ч ДЭС	3049

А – из Harris et al., 1975.
Б – из Roop et al., 1978.
[1] 10-дневные цыплята породы Белый Летори получали ежедневно подкожные инъекции диэтилстильбэстрола (ДЭС – синтетический эстроген; 2.5 мг в масле); через определенные промежутки времени, указанные в таблице, цыплят забивали. В экспериментах по вторичной стимуляции эстрогеном цыплятам сначала вводили ДЭС в течение 10 сут и затем инкубировали их без дачи гормона в течение 11 сут. На 12 сут после прекращения дачи гормона цыплятам делали одноразовую подкожную инъекцию ДЭС в количестве 2.5 мг и через определенные, указанные в таблице промежутки времени у них удаляли яйцеводы.
[2] К овальбуминовой мРНК была получена радиоактивная ^{3}H-кДНК, которую гибридизовали с общей РНК из яйцеводов цыплят, подвергнутых процедуре, описанной выше. Подсчитывали число молекул овальбуминовой мРНК.
[3] Определено с помощью гибридизации с кДНК$_{ов}$.

ядерную мембрану. На следующем этапе следовало найти корреляцию между уровнем эстрогена и присутствием овальбуминовой мРНК (Harris et al., 1975; McKnight, Palmiter, 1979). Чтобы осуществить это, на изолированной овальбуминовой мРНК была получена комплементарная ДНК. Овальбуминовую мРНК получали, пропуская цитоплазматическую мРНК из клеток яйцевода через колонку, содержавшую гранулы олиго(дТ)-целлюлозы (рис. 11.22). Эти гранулы связывают мРНК, поскольку цепи из дезокситимидина на гранулах присоединяют поли-(А)-хвосты молекул мРНК. Все другие нуклеиновые кислоты проходят через колонку свободно. Связавшуюся мРНК затем удаляли с колонки и разделяли на фракции с помощью электрофореза. Овальбуминовую мРНК можно легко выделить (так как она преобладает среди мРНК клетки) и затем транслировать in vitro для подтверждения того, что она кодирует овальбумин. Далее овальбуминовую мРНК использовали как матрицу для обратной транскриптазы и получали кДНК-зонд. Этот зонд позволяет «выловить» любую комплементарную последовательность и может зарегистрировать единичную копию гена овальбумина. Данные табл. 11.2, *А* показывают, что обработка эстрогеном индуцирует образование овальбуминовой мРНК. Не менее важны другие опыты с использованием кДНК-зонда, в которых было показано, что эстроген стимулирует появление последовательностей, кодирующих овальбумин, в ядре (Roop et al., 1978; табл. 11.2, *Б*). Таким образом, синтез овальбумина в клетках стенки магнума регулируется в первую очередь на уровне транскрипции гена.

Транскрипция глобиновых генов

Одним из хорошо документированных случаев регуляции дифференцировки на уровне транскрипции является активация глобинового гена в дифференцирующихся эритроцитах. У куриных зародышей и зародышей человека в процессе развития наблюдаются изменения в синтезе гемоглобина. На примере куриных эритробластов можно проследить за наиболее ранней транскрипцией гемоглобина. В выделенной из куриного зародыша в возрасте от 20 до 23 ч задней части темного поля наблюдаются

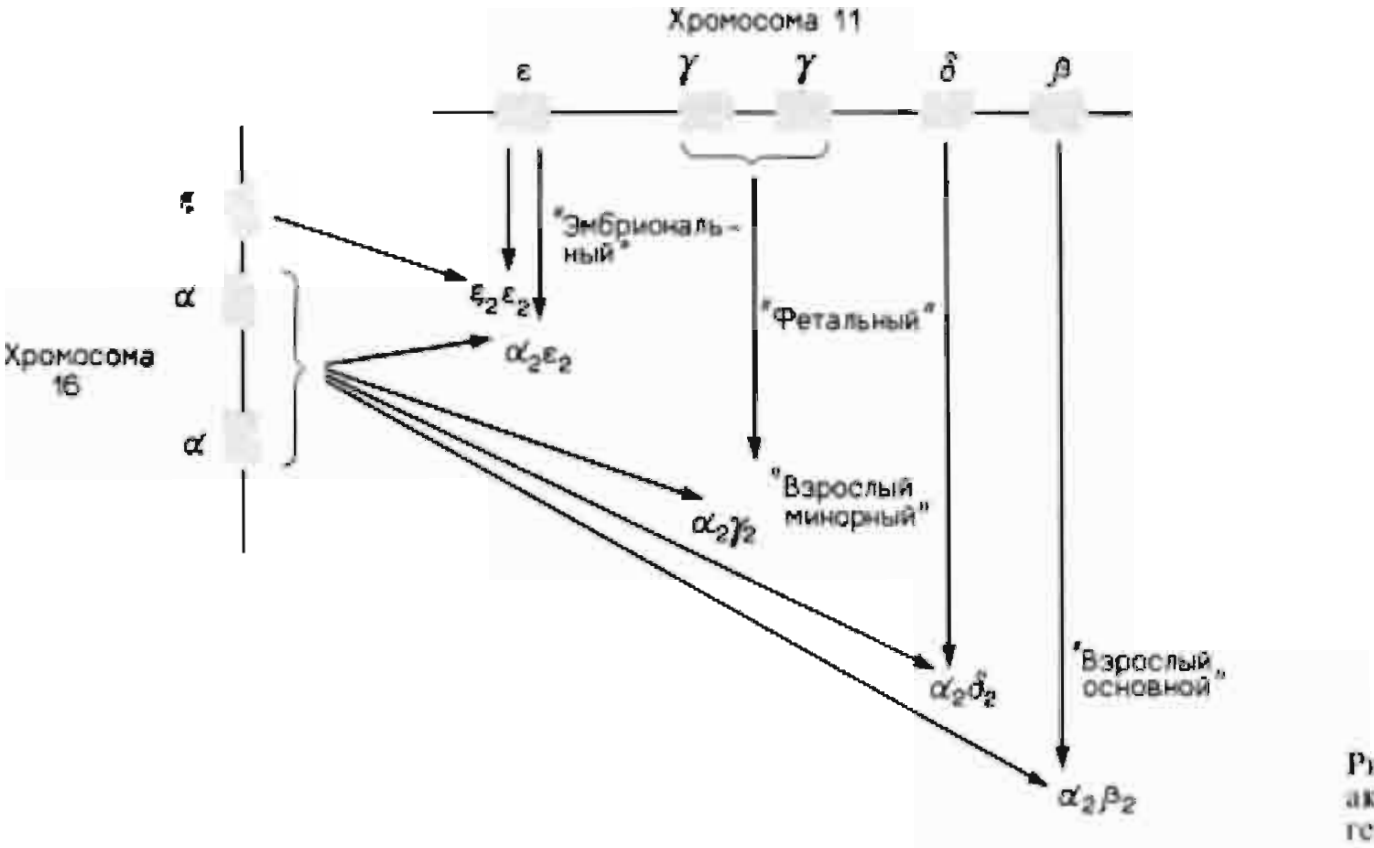


Рис. 11.23. Последовательная активация генов при синтезе гемоглобина в ходе развития.

кровяные островки, содержащие предшественники эритроцитов. Зонды комплементарной ДНК к глобиновым мРНК показывают, что эти клетки-предшественники еще не транскрибируют глобиновые гены. Однако после двух последующих клеточных делений (35 ч развития) клетки (теперь называемые эритробластами) активно синтезируют гемоглобин. В течение этого периода происходит включение глобиновых генов; каким образом включаются эти гены, остается, правда, пока неясным.

Другой тип регуляции на уровне транскрипции осуществляется на более поздних стадиях развития. У многих видов, включая курицу и человека, эмбриональный и фетальный гемоглобины отличаются от гемоглобина взрослых особей. Схематическая диаграмма типов гемоглобинов человека и генов, которые их кодируют, показана на рис. 11.23.

Эмбриональный гемоглобин человека состоит в основном из двух дзета(ζ)-цепей глобина, двух эпсилон(ε)-цепей и четырех молекул гема. В течение второго месяца беременности синтез ζ- и ε-цепей внезапно прекращается, тогда как синтез альфа(α)- и гамма(γ)-цепей глобина усиливается (рис. 11.24). Объединение двух γ-цепей с двумя α-цепями образует **фетальный гемоглобин**. На третьем месяце беременности активируются гены бета(β)- и дельта(δ)-цепей глобина, концентрация этих продуктов медленно возрастает, тогда как концентрация γ-цепей постепенно снижается. Это переключение существенно ускоряется после рождения, и фетальный гемоглобин заменяется на гемоглобин взрослых, $\alpha_2\beta_2$. Гемоглобин взрослых людей в норме состоит на 97% из $\alpha_2\beta_2$, на 2–3% из $\alpha_2\delta_2$ и на 1% из $\alpha_2\gamma_2$.

У человека гены ζ- и α-цепей глобина расположе-

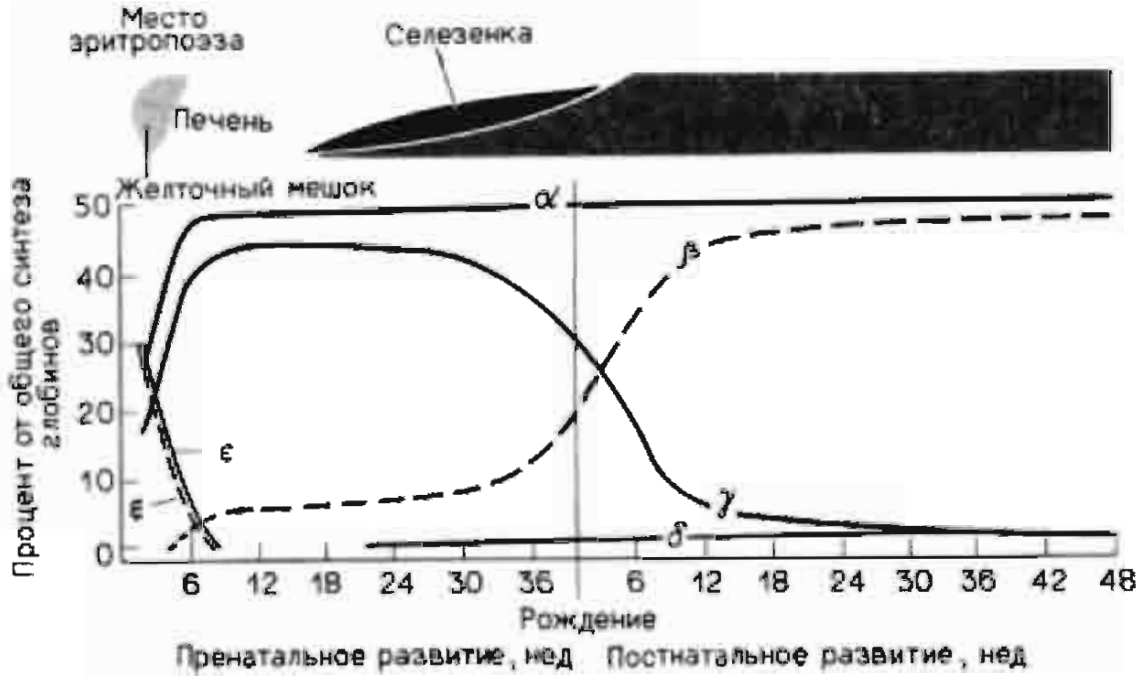


Рис. 11.24. Состав полипептидных цепей в гемоглобине человека (в процентах) в ходе индивидуального развития. Физиологическая роль γ-глобиновой цепи в фетальном гемоглобине объясняется в гл. 6. (По Karlsson, Nienhaus, 1985.)

ны в хромосоме 16, а гены ε-, γ-, δ- и β-цепей сцеплены вместе в соответствии с порядком их активации на хромосоме 11. Таким образом, представляется вероятным, что существует некий механизм, управляющий последовательным переключением генов на хромосоме 11 от генов эмбриональных глобинов к фетальным и, далее, к взрослым. Этот механизм до сих пор неизвестен, но один подход к его выявлению описан. У некоторых людей, хотя и совершенно здоровых, синтез фетального гемоглобина не выключается. В таких случаях у взрослых гены γ-цепей глобина продолжают оставаться активными, а гены β-цепей все еще не включены. В некоторых работах авторы высказывают предположение (см. Jagadeeswaran et al., 1982), что в переключении генов участвуют нуклеотиды, лежащие между генами γ- и δ-цепей глобина.

Другой недавно описанный подход связан с тем, что переключение от фетальных глобинов к взрослым глобинам происходит в одной линии клеток. Предшественники клеток крови, изолированные из желточных мешков эмбрионов человека, образуют эритроциты, содержащие цепи эмбрионального гемоглобина, а также последующие стволовые клетки. Потомство этих стволовых клеток дает начало эритроцитам, содержащим цепи фетальных, а позже взрослых глобинов (Stamatoyannopoulos et al., 1987). Это было показано также с помощью метода слияния клеток, когда фетальные эритробласты человека (предшественники эритроцитов, активно синтезирующие глобины) сливали с клетками эритробластомы мыши. Вначале эти гибридные клетки синтезировали фетальный гемоглобин человека. Однако при последующих делениях в них начинали синтезироваться цепи взрослых глобинов. Эритробласты человека, полученные от плода в возрасте 15–20 нед, начинали этот переход быстрее, чем эритробласты от плода в возрасте 8–10 нед, что указывает на наличие в эритробластах наследуемых «часов», которые регулируют переход от продукции фетальных глобинов к продукции взрослых глобинов (Papayannopoulou et al., 1986).

Белок-регулятор транскрипции: контроль генов 5S-рРНК

Центральный промоторный элемент

На протяжении всего развития активность гена 5S-рРНК регулируется на уровне транскрипции. В гаплоидном геноме имеется 20 000 «ооцитных» 5S-генов и 400 «соматических» 5S-генов, и все они транскрибируются в течение раннего оогенеза. В позднем оогенезе все 5S-гены выключены вплоть до перехода к средней бластуле. На стадии средней бластулы экспрессируются и ооцитные, и соматические 5S-гены, но к концу стадии бластулы активны только соматические 5S-гены.

РНК-полимераза III, контролирующая транскрипцию генов 5S-рРНК, имеет уникальный промотор. Если промоторы для РНК-полимераз I и II лежат в участках, фланкирующих гены с 5′-стороны (как у бактерий), то промоторы для РНК-полимеразы III находятся в центре гена. Это было показано с помощью введения делеций в различные области внутри и вокруг генов 5S-рРНК у *Xenopus* и последующего анализа уровня транскрипции полученных генов в смесях, содержащих рибонуклеотиды, РНК-полимеразу III и экстракты ядер. Правильная транскрипция продолжалась даже после ферментативного удаления 5′- и 3′-фланкирующих участков гена 5S-рРНК (рис. 11.25). Транскрипция прекращалась только тогда, когда удаляли нуклеотиды из положений от 50 до 83 (Sakonju et al., 1980; Bogenhagen et al., 1980). Кроме того, оказалось, что эти нуклеотиды образуют консервативный участок в генах, которые транскрибируются РНК-полимеразой III. Последовательность АГЦАГГГТ обнаружена в положении 55–62 в гене 5S-рРНК у *Xenopus*; похожие последовательности (с заменой не более двух пар оснований) обнаружены внутри гена тирозиновой тРНК у *Bombyx mori* (шелкопряд) и гена VA-I аденовирусов.

Регуляция транскрипции фактором TFIIIA

В отличие от РНК-полимеразы бактерий РНК-полимеразы из клеток эукариот не присоединяются непосредственно к ДНК. Их связывание с промотором опосредовано особыми белками. Если гены 5S-рРНК, выделенные из клеток *Xenopus laevis*, инкубировать с РНК-полимеразой III, то правильной транскрипции генов не происходит. Однако правильная транскрипция наблюдается в случаях, когда используется хроматин, содержащий ген 5S-рРНК, или гены 5S-рРНК инкубируют в ядерном экстракте. Имеется белок с молекулярной массой 38 500 дальтон, который связывается с контролирующей областью гена 5S-рРНК и регулирует присоединение РНК-полимеразы III (Ng et al., 1979; Engelke et al., 1980). В отсутствие этого белка ген 5S-рРНК не активен.

Этот белок, названный TFIIIA (т.е. первый транскрипционный фактор для РНК-полимеразы III), специфичен для гена 5S-рРНК (он не связывается с промоторами других генов, зависимых от РНК-полимеразы III), и его синтез регулируется в процессе развития. Он в огромном количестве присутствует в раннем оогенезе, когда синтезируется чрезвычайно много 5S-рРНК, но его концентрация падает до крайне низкого уровня в зрелых ооцитах (Ginsburg et al., 1984). Связь TFIIIA с внут-

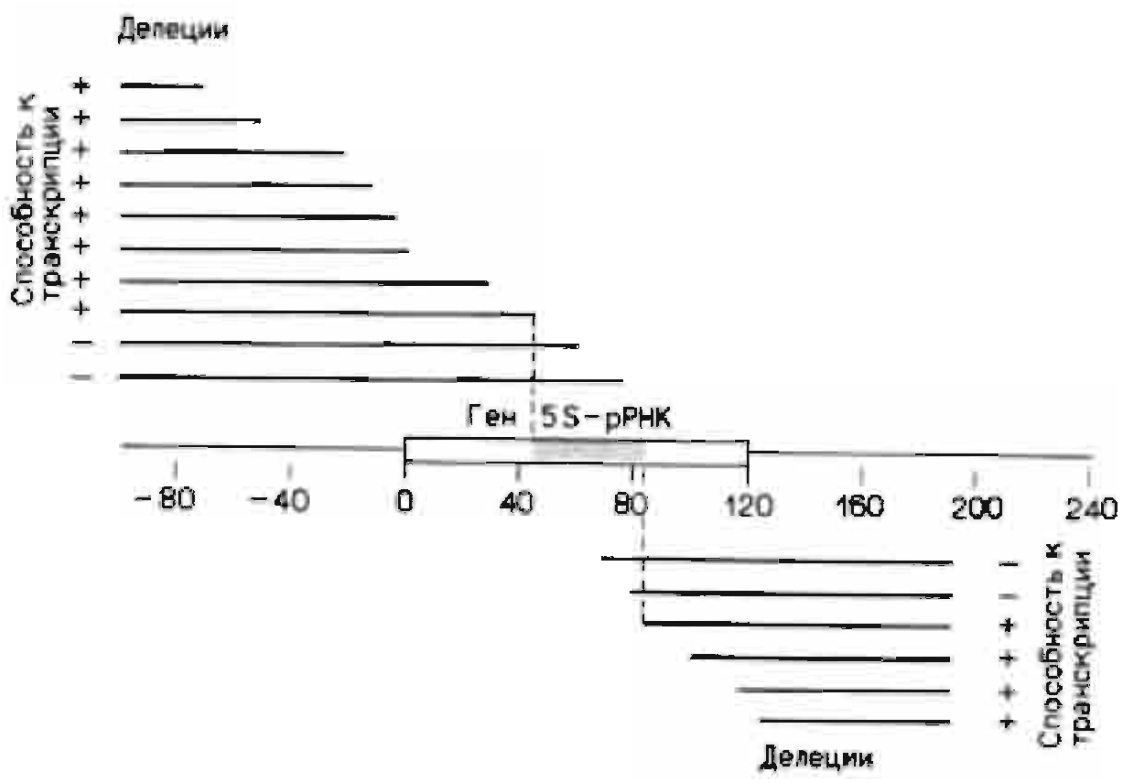


Рис. 11.25. Карта делеций в гене 5S-pPHK *Xenopus laevis*. Жирные горизонтальные линии показывают делетированные участки ДНК в плазмидах, содержащих ген 5S-pPHK. Знаком плюс указаны те плазмиды, в которых оставшаяся ДНК поддерживает правильную транскрипцию 5S-pPHK. Знаком минус указана неспособность к правильной транскрипции. С помощью этих делеций идентифицирована контролирующая область внутри гена, которая имеет длину около 30 пар оснований. (По Brown, 1981.)

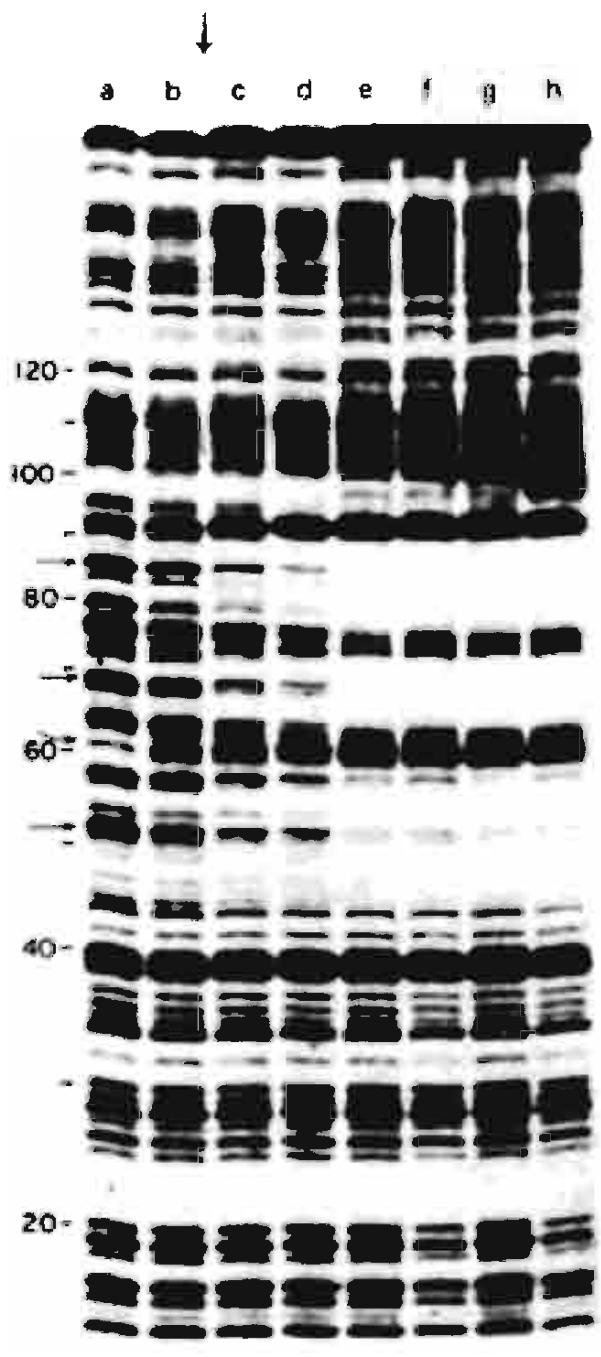


Рис. 11.26. Радиоавтограмма радиоактивной 5S-ДНК, которую инкубировали с возрастающими концентрациями TFIIIA и затем гидролизовали ДНКазой I. Фрагменты, полученные после такой обработки, разделяли с помощью электрофореза и проводили радиоавтографию. Участки, где ДНК была защищена, выявляются как светлые полосы. (Из Sakonju, Brown, 1982; фотография с любезного разрешения D. D. Brown.)

рениим промотором генов 5S-pPHK дополнительно стабилизируется двумя неспецифическими факторами TFIIIC и TFIIIB (Lasser et al., 1983; Pieler et al., 1987). Транскрипция начинается после того, как к этому комплексу присоединяется РНК-полимераза III.

Кроме того, оказалось, что тип и количество 5S-pPHK зависят от концентрации TFIIIA в ядре. Каким образом осуществляется этот контроль? Браун и Шлиссель (Brown, Schlissel, 1985) инъецировали клонированные ооцитные и соматические гены 5S-pPHK в ооциты и ядра клеток бластулы; оказалось, что TFIIIA имеет существенно более высокое (более чем в 200 раз) сродство к контролирующей области соматических генов 5S-pPHK, чем к контролирующей области ооцитных генов. Это свойство означает, что при низких концентрациях фактора среди генов, связывающих TFIIIA, практически все будут генами соматического типа, но при более высоких концентрациях фактора станут активироваться также и ооцитные гены 5S-pPHK. Инъекция очищенного TFIIIA в зародыши на стадии поздней бластулы (где активны только соматические гены 5S-pPHK) приводила к активации также ооцитных 5S-генов.

Связывание и функция TFIIIA

Сайты связывания TFIIIA в гене 5S-pPHK были определены с помощью мутационного анализа, картирования (футпринтинга) ДНКазой I, метилирования гуанозинов и блокирования фосфатов (Sakonju, Brown, 1982; Pieler et al., 1985). По результатам мутационного анализа были установлены три

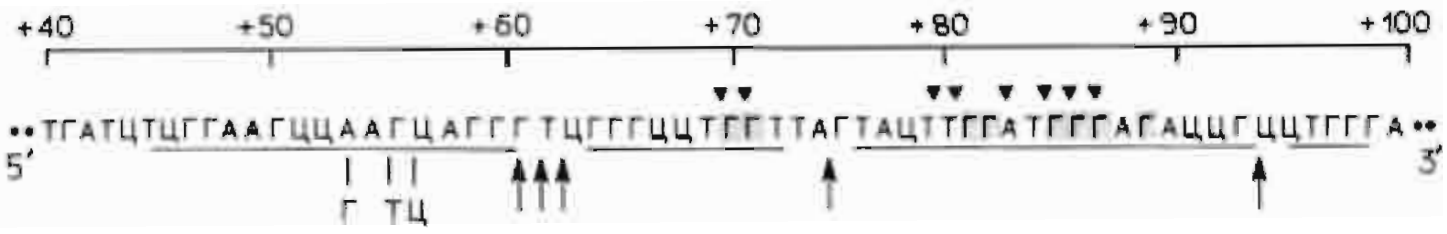


Рис. 11.27. Схема взаимодействия между TFIIIA и внутренней контролирующей областью соматического гена 5S-рРНК *Xenopus*. Гуанозиновые остатки, метилирование которых влияет на связывание TFIIIA, помещены в прямоугольники серого цвета. Фосфатные группы в ДНК, которые контактируют с TFIIIA, указаны черными треугольниками; последовательности ДНК, защищенные белком TFIIIA от гидролиза ДНКазой I, подчеркнуты. Основания, которые отличаются в соматическом гене 5S-рРНК, приведены под цепью ДНК. (По Sakonju, Brown, 1982.)

участка, необходимые для правильной транскрипции: нуклеотиды в положениях 50–61, 70–71 и 80–89. Последовательность нуклеотидов 50–61 обнаружена во всех других генах, транскрибируемых РНК-полимеразой III. В этом консервативном участке соматический 5S-ген отличается от ооцитного 5S-гена, и это различие, как полагают, обеспечивает разное сродство этих двух генов к TFIIIA. «Футпринтинг» ДНКазой I осуществляется путем присоединения белка (в данном случае TFIIIA) к радиоактивной ДНК и последующего переваривания ДНК с помощью этой относительно неспецифической ДНКазы. Полученную ДНК вносят в гель и разделяют электрофорезом, как при секвенировании. При этом получают ожидаемую олигонуклеотидную «лестницу», характерную для секвенирующих гелей, где каждый олигонуклеотид на одно основание короче, чем олигонуклеотид, лежащий выше его. Однако в тех участках, где ДНК защищена белком от гидролиза ДНКазой, соответствующие олигонуклеотиды отсутствуют. Результат такого опыта в случае связывания TFIIIA с геном 5S-РНК из ооцита *Xenopus* представлен на рис. 11.26. Отчетливо видны три сайта связывания.

Можно выяснить, меняется ли данный характер защиты нуклеотидов в ДНК при модификации остатков гуанозина (метилированием) или фосфатных групп (этилированием). Метилирование определенных групп гуанозинов (70 и 71; 80–89) и этилирование определенных групп фосфатов (70 и 71; 80–87) подавляет связывание TFIIIA и предотвращает защиту этим белком указанных участков ДНК. Эти данные суммированы на рис. 11.27; они выявляют три сайта связывания TFIIIA на гене 5S-РНК.

Если в 5S-промоторе присутствуют три основных участка связывания TFIIIA, то в белке TFIIIA имеются девять доменов, связывающих ДНК. Каждый из этих «ДНК-связывающих пальцев» представляет собой глобулярный домен, в центре которого находятся преимущественно основные аминокислоты. Эти домены соединены друг с другом тандемно, и каждый стабилизирован ионом цинка, расположенным в центре домена (рис. 11.28). Предполагается, что такое строение позволяет TFIIIA удерживаться на гене при движении по нему РНК-полимеразы (Miller et al., 1985). Если одни из связывающих доменов открепляются, то прикрепление к ДНК будут обеспечивать другие домены.

Какая из функций TFIIIA делает его необходимым для транскрипции? Группой исследователей (Kmiec, Worcel, 1985; Kmiec et al., 1986) было высказано предположение, что роль TFIIIA заключается

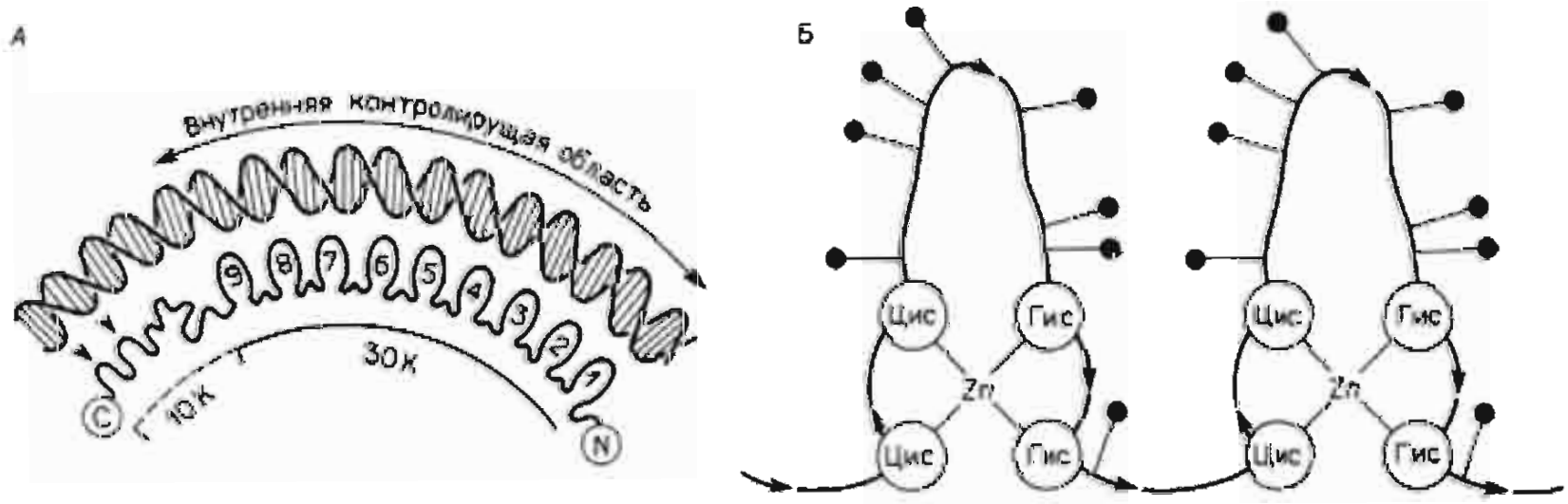


Рис. 11.28. Сопоставление структур белка-регулятора транскрипции TFIIIA и внутренней контролирующей области молекулы ДНК. *А*. Ориентация белка по отношению к ДНК. Девять «пальцев», связывающихся с 5S-промотором, экспонированы. *Б*. Детальный вид ДНК-связывающих «пальцев», стабилизированных цинком; основные остатки (черные кружки) присоединяются к ДНК. (По Miller et al., 1985.)

в индукции изгибов ДНК, вызывающих расхождение двух нитей спирали. Белок TFIIIA вызывает, по-видимому, изменение конформации гена 5S-рРНК, когда их добавляют друг к другу в присутствии ядерного экстракта. Хотя эти данные противоречивы (Wolffe et al., 1987), они привлекают внимание к интересному направлению в исследованиях регуляции транскрипции генов 5S-РНК.

Контроль детерминации на уровне транскрипции: гены переключения путей дифференцировки дочерних клеток

До сих пор при обсуждении контроля на уровне транскрипции мы рассматривали те гены, продукты которых являются следствием дифференцировки, а не их причиной. Синтез глобинов, например, не является последней стадией в дифференцировке эритроцитов. Существуют ли случаи, когда транскрипция способна заставить клетку стать клеткой крови вместо того, чтобы стать клеткой кости? Могут ли гены, активные на ранних этапах развития, определять судьбу клетки? В 1940 г. Уоддингтон, один из наиболее прозорливых теоретиков биологии развития, предсказал существование «генов-переключателей». Эти гены, по его словам, могут работать как стрелки на сортировочной станции, которые определяют, по какому пути следовать поезду (рис. 11.29). Такие гены могли бы обеспечивать тем или иным способом активацию батареи генов для какого-то одного пути развития, а не для другого, альтернативного.

Недавно была открыта группа генов, которые имеют свойства таких «генов-переключателей». Клетки, в которых экспрессируются гены-переключатели, имеют возможность дать потомство одного из двух клеточных типов, и наличие или отсутствие продуктов этого гена определяет, какое потомство будут генерировать эти клетки.

Локус *lin-12* у круглого червя *Caenorhabditis elegans* контролирует два альтернативных клеточных типа (Greenwald et al., 1983). У зародышей дикого типа имеются две соседние клетки, Z1.ppp и Z4.aaa, которые взаимодействуют друг с другом (Kimble, 1981). Любая из этих клеток может дать начало якорной клетке матки (*ac*), тогда как другая клетка будет формировать предшественник брюшной клетки матки (*vu*). У мутантов, рецессивных по локусу *lin-12*, соответствующий ген не транскрибируется. Обе клетки становятся якорными клетками. У мутантов, доминантных по этому локусу, у которых уровень транскрипции *lin-12* очень высок, обе клетки становятся предшественниками брюшных клеток матки (табл. 11.3). Ген *lin-12* контролирует, по-видимому, бинарное переключение с одного альтернативного пути развития на другой. Один из наиболее интересных аспектов функционирования гена *lin-12* заключается в том, что он определяет один из двух путей развития для нескольких клеток в различных частях тела. Как указано в таблице, брюшные и спинные m(l/r)pa-клетки становятся соответственно половыми мезобластами и целомоцитами. В случае если в клетках произошла доминантная мутация по гену *lin-12*, обе клетки становятся половыми мезобластами; если же мутация оказывается рецессивной, то обе клетки становятся целомоцитами.

Мутация *Notch* у дрозофилы также направляет бипотенциальную клетку по одному из двух альтернативных путей. В этом случае происходит выбор между клеткой кожи (гиподермы) или нейробластом. Вскоре после гаструляции зона приблизительно из 1800 эктодермальных клеток располагается по средней линии вдоль вентральной стороны зародыша дрозофилы. Эти клетки формируют брюш-

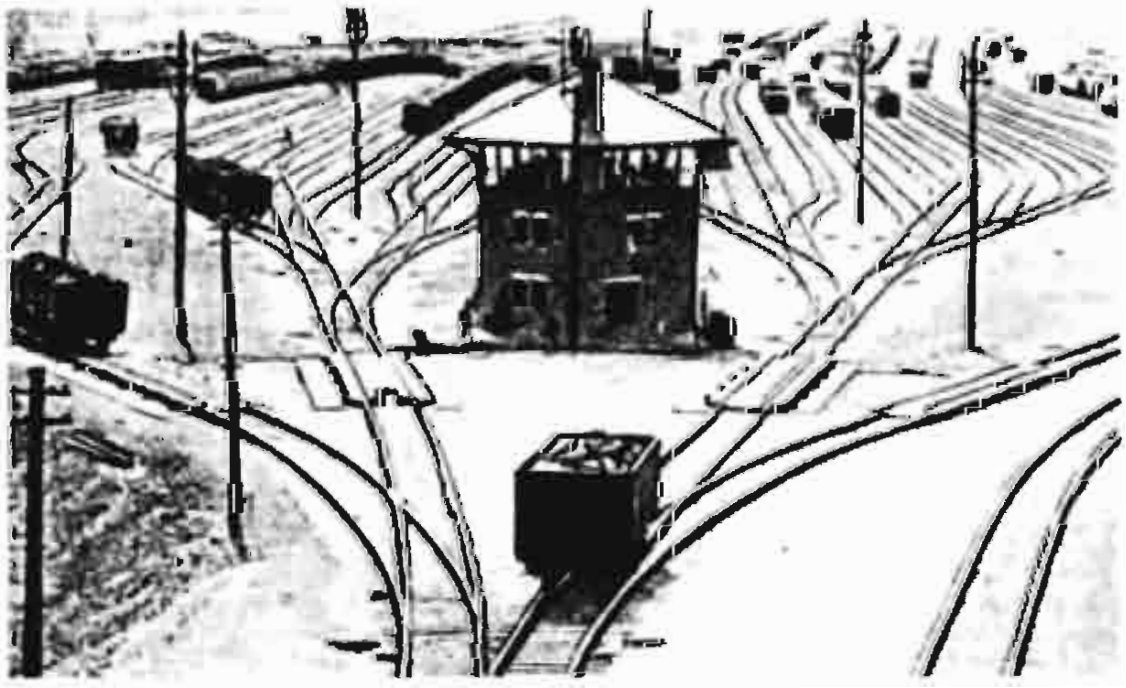


Рис. 11.29. Фотография сортировочной станции, сделанная Джозефом Нидхэмом (J. Needham, 1936) для иллюстрации гипотезы своего друга и коллеги Ч. Уоддингтона. Рельсы символизируют различные пути развития, по которым могут следовать вагоны. Хорошо видны разветвления путей.

Таблица 11.3. Детерминация клеток у мутантов по гену *lin-12*

Мутант	Клетки			
	Z1.ppp	Z4.aaa	M.v. (l/r)pa	M.d. (l/r)pa
lin-12(+)	Предшественник брюшной клетки матки или якорная клетка	Предшественник брюшной клетки матки или якорная клетка	Половой мезобласт	Целомоцит
lin-12(0)	Якорная клетка	Якорная клетка	Целомоцит	Целомоцит
din-12(d)	Предшественник брюшной клетки матки	Предшественник брюшной клетки матки	Половой мезобласт	Половой мезобласт

Greenwald, 1987.

ную нервную цепочку насекомого, и примерно четверть из них становятся нейробластами, тогда как оставшиеся становятся предшественниками клеток гиподермы. Клетки, которые дают начало нейробластам, перемешаны с теми клетками, которым предопределено дать начало гиподермальным предшественникам. Таким образом, у зародыша дрозофилы каждая клетка эктодермы в области формирования нервной цепочки может дать начало предшественникам либо гиподермальных, либо нервных клеток (Hartenstein, Campos-Ortega, 1984). В отсутствие транскрипции гена *Notch* у зародыша клетки развиваются в предшественников нервных клеток, а не в смесь предшественников гиподермальных и нервных клеток (рис. 11.30; Lehmann et al., 1983; Artavanis-Tsakonis et al., 1983). Эти зародыши погибают из-за большого избытка нервных клеток и отсутствия брюшной и головной гиподермы (Poulson, 1937; Hoppe, Greenspan, 1986). Ген *Notch* был клонирован (Kidd et al., 1983; Yedvobnick et al., 1985), и было обнаружено, что он транскрибируется в течение первой половины эмбриогенеза (и позднее на стадии ранней куколки) (рис. 11.31).

Последовательности обоих генов – *Notch* и *lin-12* – в значительной степени гомологичны последовательности фактора роста эпидермиса (ФРЭ) – важного регулятора роста клеток млекопитающих (гл. 20). N-концевая половина белкового продукта гена *Notch* содержит 36 тандемных копий ФРЭ-подобных пептидных последовательностей, каждая

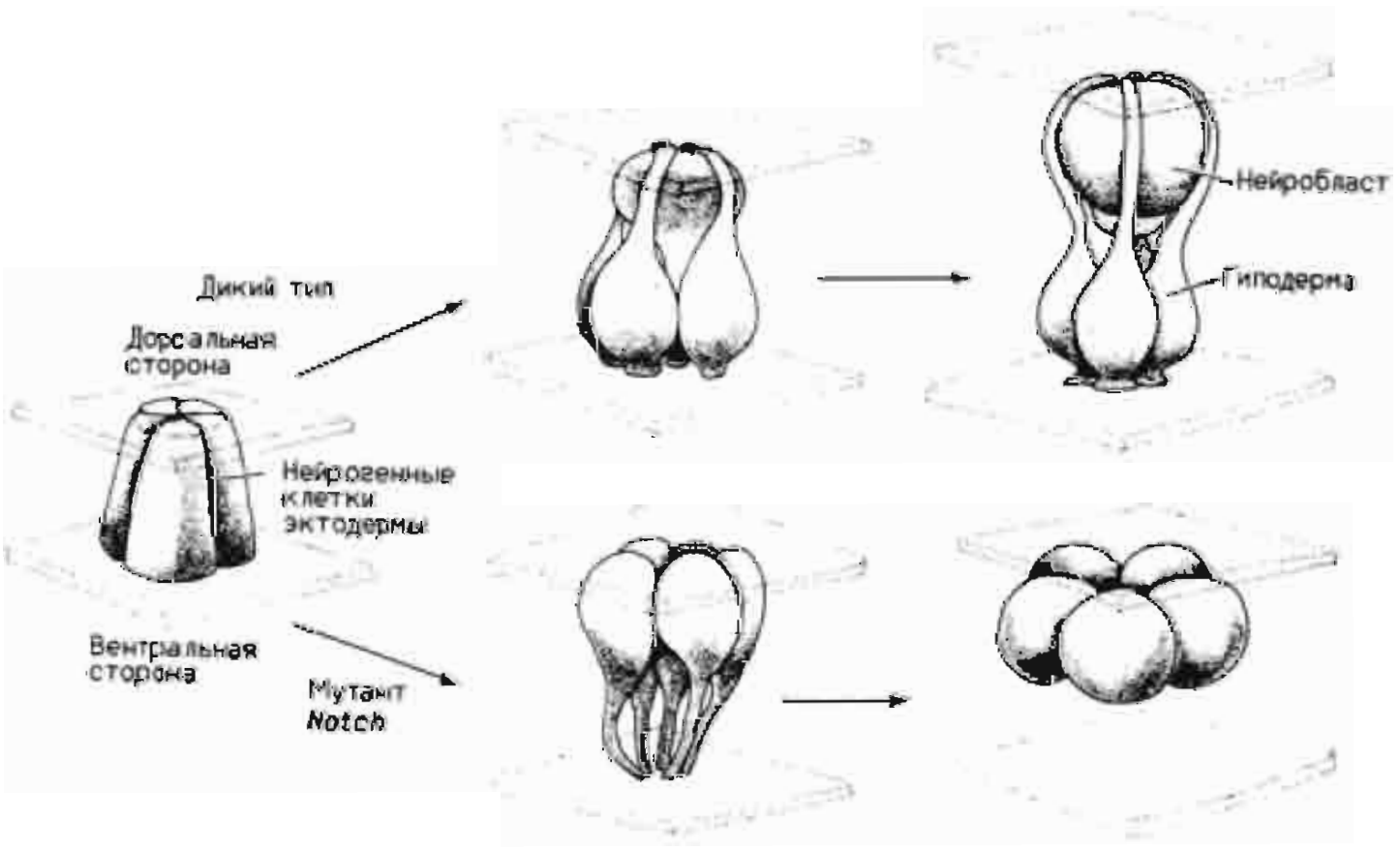


Рис. 11.30. Иллюстрация проявления мутации *Notch*. У зародышей дикого типа нейрогенные клетки эктодермы дают начало как нейробластам, так и клеткам кожи (гиподерме). У зародышей *Notch* все клетки нейрогенной эктодермы развиваются в нейробласты.

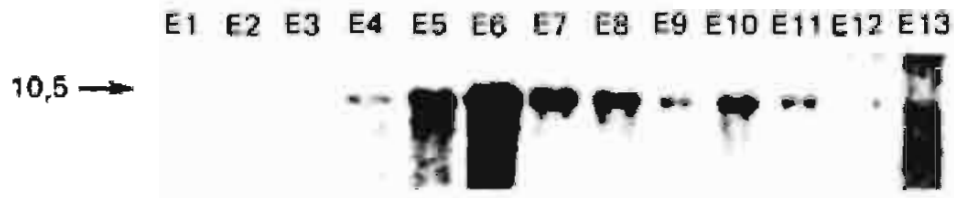


Рис. 11.31. Нозерн-блот транскрипции гена *Notch* дикого типа на различных стадиях развития *Drosophila*. Числами указаны часы развития при 25 °С. Максимальная транскрипция приходится на 6–7 ч после откладки яиц. (Из Yedvobnick et al., 1985; фотография с любезного разрешения S. Artavanis-Tsakonas.)

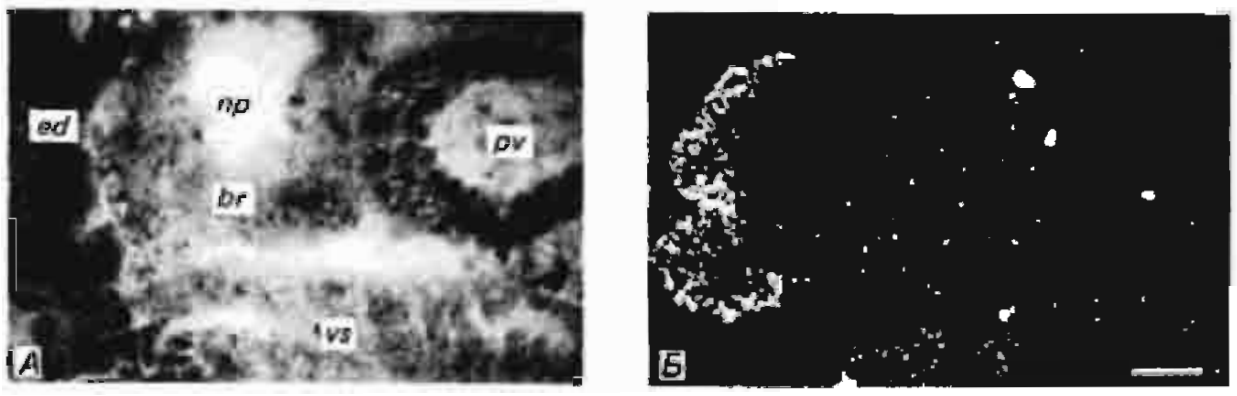


Рис. 11.32. Гибридизация in situ, показывающая локализацию мРНК гена *seven less* дикого типа. Срезы для микроскопии инкубировали с радиоактивным рестрикционным фрагментом гена *seven less* дикого типа и затем проводили радиоавтографию. *А*. Окрашенный срез, на котором видны области мозга личинки (*br*, *pv*, *vs*) и глазного диска (*ed*). *Б*. Меченая ДНК гибридизуется с мРНК только в той части имагинального диска личинки, которая станет сетчаткой взрослого организма. (Из Hafen et al., 1987; фотография с любезного разрешения E. Hafen.)

из которых, как полагают, выпячивается из клеточной мембраны (Wharton et al., 1985). Сходным образом продукт гена *lin-12* имеет по меньшей мере 11 ФРЭ-подобных повторов; полагают, что они также выступают за клеточную поверхность. Было высказано предположение, что многомерные ФРЭ-участки могут связывать клетки друг с другом и действовать как стимулятор митоза (Burgess, 1987). В случае мутантов *Notch*, у которых функция этого гена нарушена, такие агрегаты делящихся клеток не способны развиваться в клетки гиподермы, т. е. они будут предназначены для образования нейробластов.

Если гены-переключатели *lin-12* и *Notch* кодируют продукты, напоминающие связанные с мембраной факторы роста, то другой ген-переключатель – *seven less* – кодирует белок, который похож на связанный с мембраной рецептор фактора роста. Этот ген активен в имагинальных дисках глаза у личинок последнего возраста дрозофилы (рис. 11.32). Он контролирует переключение, определяющее, какая клетка возникнет из клетки сетчатки: седьмой фоторецептор (ультрафиолетчувствительная нервная клетка) или ненейральная колбочка. Надлежащая транскрипция гена *seven less* необходима для коммитирования клетки к формированию этого нейрона, и в отсутствие полноценного функционирования гена *seven less* все бипотенциальные клетки станут предшественниками колбочек (Banerjee et al., 1987; Hafen et al., 1987).

Три описанных гена контролируют переключение развития, при котором бипотенциальной клетке разрешается следовать по одному из двух альтернативных путей дифференцировки. Во всех трех случаях межклеточные взаимодействия играют, по-видимому, критическую роль. Структура каждого из белковых продуктов этих генов свидетельствует о том, что этот продукт связан с мембраной и способен взаимодействовать с поверхностями других клеток. На повестке дня – изучение механизмов, посредством которых такие взаимодействия контролируют судьбу клеток.

Дополнительные сведения и гипотезы

Детерминация клеток вульвы у *Caenorhabditis elegans*

В гл. 7 мы отметили, что *C. elegans* был введен как экспериментальный объект, на котором исследования по биологии развития и генетике могут проводиться на одной особи одновременно. Такая программа начинает приносить плоды в изучении генетической регуляции детерминации клеток.

Как отмечено ранее, индукционный сигнал для развития вульвы возникает в якорных клетках

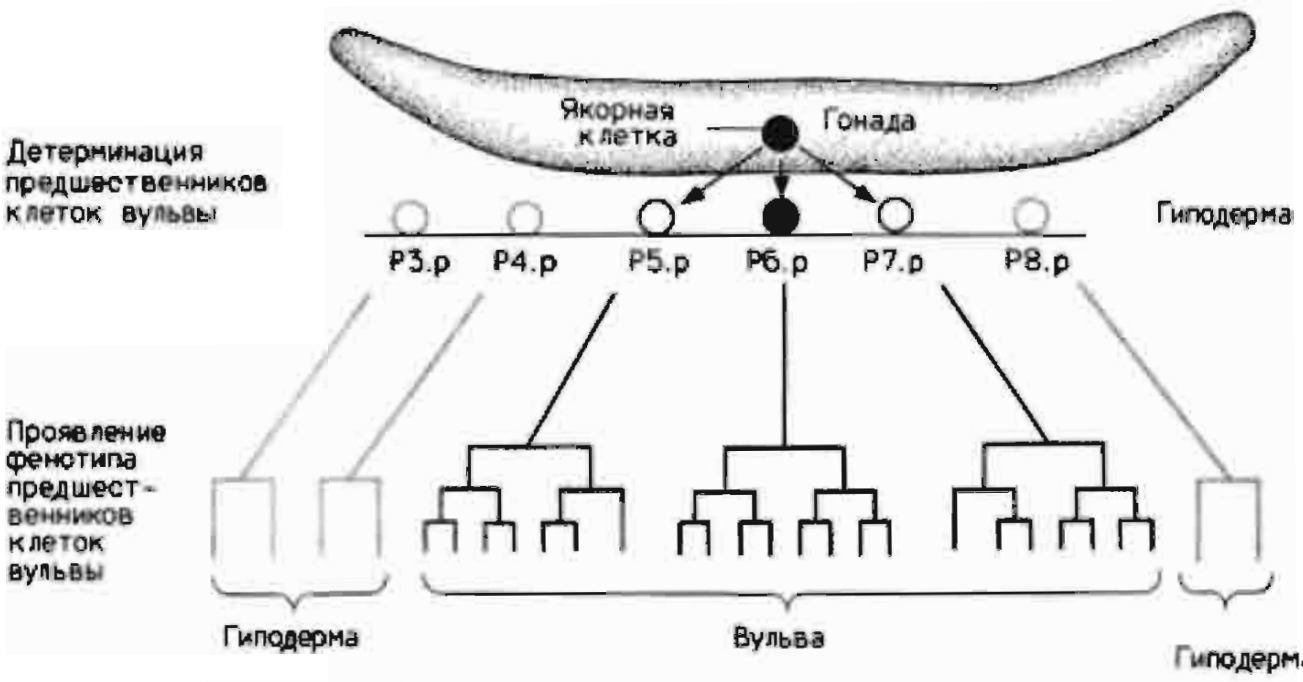


Рис. 11.33. Детерминация и проявление фенотипа в ряду клеток вульвы у нематоды *C. elegans*. Детерминация определяется близостью к якорной клетке, которая вызывает деление клетки P6.p с образованием восьми клеток вульвы, при этом клетки P5.p и P7.p продуцируют по семь клеток вульвы каждая. Три других потенциальных предшественника клеток вульвы не детерминируются к образованию вульвы, а формируют вместо этого гипобласт. Различные мутации могут изменить детерминацию этих клеток или проявление их детерминированного состояния. (По Ferguson et al., 1987.)

гонад. Этот сигнал (пока не идентифицирован, но полагают, что он представляет собой способную к диффузии молекулу) действует в зависимости от положения на шесть клеток (P(3-8).p), способных формировать ткань вульвы (рис. 11.33). Клетка, ближайшая к якорной клетке (обычно P6.p), стимулируется к трем симметричным циклам митоза для формирования клеток вульвы. Две клетки, лежащие по обе стороны от нее (P5.p и P7.p), подвергаются делению, незначительно отличающемуся от обычного; в результате также возникают клетки вульвы. Три других потенциальных предшественника не предназначаются для образования клеток вульвы; они делятся один раз и дают клетки, входящие в гиподерму нематоды.

Обнаружено более двух десятков мутаций, нарушающих развитие вульвы. С помощью конструирования двойных мутантов, у которых один зародыш несет две отдельные мутации, влияющие на развитие вульвы, можно определить, какие гены активны ранее других, и, следовательно, постулировать генетическую программу. Возможность наблюдать деление каждой клетки, входящей в вульву, позволяет указать точное место, где данная мутация проявляется впервые, и установить соответствие между генетической программой и развитием (Ferguson et al., 1987).

Первый набор генов в генетической программе и программе развития составляют те гены, которые контролируют образование предшественников клеток вульвы и якорной клетки. Как упоминалось ранее, ген *lin-12* контролирует формирование якорной клетки таким образом, что у мутантов, доминантных по гену *lin-12*, она не образуется (оба возможных предшественника якорной клетки становятся клетками матки). В отсутствие якорной клетки возможные предшественники клеток вульвы делятся, чтобы образовать клетки гиподермы.

Второй набор генов детерминирует дифференцировку предшественников клеток вульвы. У таких мутантов, как *lin-12*, все возможные предшественники клеток вульвы ведут себя подобно клеткам P3.p, P4.p и P8.p. Иными словами, они все дают начало клеткам гиподермы, и вульвы не образуется. Напротив, у мутантов, подобных *lin-15*, все шесть клеток-предшественников ведут себя как предшественник P6.p и формируют ткань вульвы. Эти мутанты имеют несколько вульв. Проявление этих мутаций детерминации не зависит от силы индукционного сигнала якорной клетки и определяется, очевидно, на уровне рецепции и ответа на этот сигнал. (До сих пор не обнаружены мутанты, у которых отсутствует сигнал якорных клеток, какой бы природы он ни был.)

Третий набор генов отвечает за проявление детерминированного фенотипа. Три гена, *lin-11*, *lin-17* и *lin-18*, контролируют, по-видимому, фенотип потомков клеток P5.p и P7.p, влияя на направление, в котором следует делиться этим клеткам-предшественникам. В этих случаях дочерние клетки напоминают потомков P6.p, а не потомков P5.p или P7.p. Такое изменение в характере деления может привести к распределению конкретных морфогенетических детерминантов по разным областям цитоплазмы.

РЕЗЮМЕ

Дифференциальная экспрессия генов может регулироваться на уровне транскрипции несколькими способами. Например, при гетерохроматизации значительные по размерам части хромосом могут стать генетически инертными; в случае глобиновых генов и генов овальбумина конкретный ген может быть активирован в клетке определенного типа и в определенное время. В некоторых случаях, когда требуются большие количества обычного продукта того или иного гена (как для рибосомных генов ооцитов амфибий), гены могут быть амплифицированы (для 40S-РНК) и могут синтезироваться позитивные транскрипционные факторы (TFIIIA для 5S-рРНК). Регуляция на уровне транскрипции может также определять судьбу клеток. Транскрипция таких «генов – переключателей путей дифференцировки дочерних клеток» играет существенную роль в детерминации клеток. В этой главе мы увидели, что определенные гены находятся под дифференциальным контролем на уровне транскрипции. Но как осуществляется эта регуляция? Молекулярные механизмы дифференциальной транскрипции генов будут рассмотрены в гл. 12.

ЛИТЕРАТУРА

Artavanis-Tsakonis S., Muskavitch M. A. T., Yedvobnick Y. (1983). Molecular cloning of *Notch*, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 1977–1981.

Ashburner M. (1974). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. II. Effects of inhibitors of protein synthesis. Dev. Biol. **39**, 141–157.

Banerjee U., Renfranz P. J., Pollack J. A., Benzer S. (1987). Molecular characterization of *seevenless*, a gene involved in neuronal pattern formation in the *Drosophila* eye. Cell **49**, 281–291.

Barr M. L., Bertram E. G. (1949). A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature **163**, 676.

Bogenhagen D. F., Sakonju S., Brown D. D. (1980). A control region in the center of the 5 S RNA gene directs specific initiation of transcription. II. The 3' border of the region. Cell **19**, 27–35.

Brown D. D. (1981). Gene expression in eukaryotes. Science **211**, 667–674.

Brown D. D., Dawid I. B. (1968). Specific gene amplification in oocytes. Science **160**, 272–280.

Brown D. D., Schlissel M. S. (1985). A positive transcription factor controls the differential expression of two 5 S RNA genes. Cell **42**, 759–767.

Brown S. W., Nelson-Rees W. A. (1961). Radiation analysis of a lecanoid genetic system. Genetics **46**, 983–1007.

Burgess A. W. (1987). Growth factors and their receptors: Specific roles in development. BioEssays **6**, 79–81.

Centerwall W. R., Benirschke K. (1973). Male tortoiseshell and calico (T-C) cats. J. Hered. **64**, 272–287.

Cooper D. W., Vandeberg J. L., Sharmen G. B., Poole W. E. (1971). Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. Nature New Biol. **230**, 155–157.

Crowley T. E., Meyerowitz E. M. (1984). Steroid regulation of RNAs transcribed from the *Drosophila* 68C polytene chromosome puff. Dev. Biol. **102**, 110–124.

Davidson R. G., Nitowsky H. M., Childs B. (1963). Demonstration of two populations of cells in the human female heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **50**, 481–485.

Driesch H. (1894). Analytische Theorie der Organischen Entwickelung. Wm. Engelmann, Leipzig. Quoted in J. Oppenheimer (1967), Essays in the History of Embryology and Biology. MIT Press, Cambridge, Mass., p. 76.

Engelke D. R., Ng S.-Y., Shastry B. S., Roeder R. G. (1980). Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5 S RNA genes. Cell **19**, 717–728.

Ferguson E. C., Sternberg P. W., Horvitz R. (1987). A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*. Nature **326**, 259–267.

Gartler S. M., Liskay R. M., Grant N. (1973). Two functional X chromosomes in human fetal oocytes. Exp. Cell Res. **82**, 464–466.

Gartler S. M., Riggs A. D. (1983). Mammalian X-chromosome inactivation. Annu. Rev. Genet. **17**, 155–190.

Gartler S. M., Rivest M., Cole R. E. (1980). Cytological evidence for an inactive X chromosome in murine oogonia. Cytogenet. Cell Genet. **28**, 203–207.

Ginsberg A. M., King D. O., Roeder R. G. (1984). Xenopus 5 S gene transcription factor, TFIIIA: Characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. Cell **39**, 479–489.

Greenwald I. S. (1987). The *lin-12* locus of *Caenorhabditis elegans*. BioEssays **6**, 70–73.

Greenwald I. S., Sternberg P. W., Horvitz H. R. (1983). The *lin-12* locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*. Cell **34**, 435–444.

Gronemeyer H., Pongs O. (1980). Localization of ecdysterone on polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 2108–2112.

Grummt I., Bartsch I., Rosenbauer H. (1986). A transcription terminator located upstream of the mouse rDNA initiation site effects rRNA synthesis. Cell **47**, 901–911.

Hafen E., Basler K., Edstroem J.-E., Rubin G. M. (1987). *Sevenless*, a cell-specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosin kinase domain. Science **236**, 55–63.

Harris S. E., Rosen J. M., Meens A. R., O'Malley B. W. (1975). Use of specific probe for ovalbumin messenger RNA to quantitate estrogen-induced transcripts. Biochemistry **14**, 2072–2081.

Hartenstein V., Campos-Ortega J. A. (1984). Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **193**, 308–325.

Henderson S., Sollner-Webb B. (1986). A transcriptional terminator is a novel element of the promoter of the mouse ribosomal RNA gene. Cell **47**, 891–900.

Hill R. S., MacGregor H. C. (1980). The development of lampbrush chromosome-type transcription in the early diplotene oocytes of *Xenopus laevis*: An electron microscope analysis. J. Cell Sci. **44**, 87–101.

Hoppe P. E., Greenspan R. J. (1986). Local function of the *Notch* gene for embryonic ectodermal pathway choice in *Drosophila*. Cell **46**, 773–783.

Hourcade D., Dressler D., Wolfson J. (1973). The amplification of ribosomal RNA genes involves a rolling circle intermediate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2926–2930.

Jagadeeswaran P., Tuan D., Forget B. G., Weissman S. M. (1982). A gene deletion ending at the midpoint of a repetitive DNA

sequence in one form of hereditary persistence of fetal hemoglobin. Nature **296**, 469–470.
Karlsson S., Nienhaus A.W. (1985). Developmental regulation of human globin genes. Anni. Rev. Biochem. **54**, 1071–1108.
Kidd S., Lockett T.J., Young M.W. (1983). The *Notch* locus of *Drosophila melanogaster*. Cell **34**, 421–433.
Kimble J. (1981). Alterations in cell lineage following laser ablation of cells in the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. **87**, 286–300.
Kmiec E.B., Razvi F., Worcel A. (1986). The role of DNA-mediated transfer of TFIIIA in the concerted gyration and differential activation of the *Xenopus* 5 S RNA genes. Cell **45**, 209–218.
Kmiec E.B., Worcel A. (1985). The positive transcription factor for the 5 S RNA gene induces a 5 S DNA-specific gyration in *Xenopus* oocyte extracts. Cell **41**, 945–953.
Korge G. (1975). Chromosome puff activity and protein synthesis in larval salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 4550–4554.
Korn L. (1982). Transcription of *Xenopus* 5 S ribosomal RNA genes. Nature **295**, 101–105.
Kratzer P.G., Chapman V.M. (1981). X-chomosome reactivation in oocytes of *Mus caroli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 3093–3097.
Labhart P., Reeder R.H. (1986). Characterization of three sites of RNA 3' end formation in the *Xenopus* ribosomal gene spacer. Cell **45**, 431–443.
Lasser A.B., Martin P.L., Roeder R.G. (1983). Transcription of class III genes: Formation of preinitiation complexes. Science **222**, 740–748.
Lehmann R., Jimenez F., Dietrich U., Campos-Ortega J.A. (1983). On the phenotype and development of mutants of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. **192**, 62–74.
Lewin B. (1980). Gene Expression 2, 2nd Ed. Wiley-Interscience, New York.
Lillie F.R. (1927). The gene and the ontologic process. Science **66**, 361–368.
Lyon M.F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus L.*). Nature **190**, 372–373.
Mayfield J.E., Serunian L.A., Silver L.M., Elgin S.C.R. (1978). A protein released by DNase I digestion of *Drosophila* nuclei is preferentially associated with puffs. Cell **14**, 539–544.
McBurney M.W., Strutt B.J. (1980). Genetic activity of X chromosomes in pluripotent female teratocarcinoma cells and their differentiated progeny. Cell **21**, 357–364.
McKnight G.S., Palmiter R.D. (1979). Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct. J. Biol. Chem. **254**, 9050–9058.
McStay B., Reeder R.H. (1986). A termination site for *Xenopus* RNA polymerase I also acts as an element of an adjacent promoter. Cell **47**, 913–920.
Migeon B.R. (1971). Studies of skin fibroblasts from ten families with HGPRT deficiency, with reference to X-chromosomal inactivation. Am. J. Human Genet. **23**, 199–209.
Migeon B.R., Jelalian K. (1977). Evidence for two active X-chromosomes in germ cells of female before meiotic entry. Nature **269**, 242–243.
Migeon B.R., Schmidt M., Axelman J., Cullen C.R. (1986). Complete reactivation of X chromosomes from human chorionic villi with a switch to early DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 2182–2186.
Migeon B.R., Wolf S.F., Axelman J., Kaslow D.C., Schmidt M. (1985). Incomplete X chromosome dosage compensation in chorionic villy of human placenta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 3390–3394.
Miller D.L., Jr., Beatty B.R. (1969). Visualization of nucleolar genes. Science **164**, 955–957.
Miller J., McLachlan A.D., Klug A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. EMBO J. **4**, 1609–1614.
Mohandas T., Sparkes R.S., Hellkuhl B., Brzeschik K.H., Shapiro L.J. (1980). Expression of an X-linked gene from an inactive human X chromosome in mouse–human hybrid cells: Further evidence for the non-inactivation of the steroid sulfatase locus in man. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 6759–6763.
Monk M., Harper M.I. (1979). Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. Nature **281**, 311–313.
Moore K.L. (1977). The Developing Human. Saunders, Philadelphia.
Morgan T.H. (1934). Embryology and Genetics. Columbia University Press, New York, pp. 9–10.
Moss T. (1983). A transcriptional function for the repetitive ribosomal spacer in *Xenopus laevis*. Nature **302**, 223–228.
Needham J. (1936). Order and Life. Yale University Press, New Haven.
Nesbitt M.N. (1974). Chimeras vs. X inactivation mosaics: Significance of differences in pigment distribution. Dev. Biol. **38**, 202–207.
Ng S.-Y., Parker C.S., Roeder R.G. (1979). Transcription of cloned *Xenopus laevis* RNA polymerase III in reconstituted systems. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 136–140.
Old R.W., Callan H.G., Gross K.W. (1977). Localization of histone gene transcripts in newt lampbrush chromosomes by *in situ* hybridization. J. Cell Sci. **27**, 57–80.
Osheim Y.N., Miller O.L. (1983). Novel amplification and transcriptional activity of chorion genes in *Drosophila melanogaster* follicle cells. Cell **33**, 543–653.
Palmiter R.D., Schimke R.T. (1973). Regulation of protein synthesis in chick oviduct. III. Mechanism of ovalbumin "superinduction" by actinomycin D. J. Biol. Chem. **248**, 1502–1512.
Papayannopoulou T., Brice M., Stamatoyannopoulos G. (1986). Analysis of human hemoglobin switching in MEL × human fetal erythroid cell hybrids. Cell **46**, 469–476.
Pieler T., Hamm J., Roeder R.G. (1987). The 5 S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. Cell **48**, 91–100.
Pieler T., Oei S.-L., Hamm J., Engelke U., Erdmann V.A. (1985). Functional domains of the *Xenopus laevis* 5 S gene promoter. EMBO J. **4**, 3751–3756.
Poulson D.F. (1937). Chromosomal deficiencies and the embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **23**, 133–137.
Renfree M.B. (1982). Implantation and placentation. In: C.R. Austin and R.V. Short (eds.), Embryonic and Fetal Development. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 26–69.
Rochaix J.D., Bird A., Bakken A. (1974). Ribosomal RNA gene amplification by rolling circles. J. Mol. Biol. **87**, 473–488.
Roop D.R., Nordstrom J.L., Tsai S.Y., Tsai M.-J., O'Malley B.W. (1978). Transcription of structural and intervening sequences in the ovalbumin gene and identification of potential ovalbumin mRNA precursors. Cell **15**, 671–685.
Rutter W., Jr., Valenzuela P., Bell G.E., Holland M., Hager G.L., Degennaro L.J., Bishop R.J. (1976). The role of DNA-dependent RNA polymerase in transcriptive specificity. In: E.M. Bradbury and K. Laveherian (eds.), The Organization and Expression of the Eukaryotic Genome. Academic, New York, pp. 279–293.
Sakonju S., Bogenhagen D.F., Brown D.D. (1980). A control region in the center of the 5 S RNA gene directs specific initiation of transcription. I. The 5' border of the region. Cell **19**, 13–25.
Sakonju S., Brown D.D. (1982). Contact points between a posi-

tive transcription factor and the *Xenopus* 5 S RNA gene. Cell **31**, 395–405.
Samollow P. B., Ford A. L., VandeBerg J. L. (1987). X-linked gene expression in the Virginia opossum: Differences between the paternally derived *Gpd* and *Pgk-A* loci. Genetics **115**, 185–195.
Sharman G. B. (1971). Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. Nature **230**, 231–232.
Spradling A. C. (1981). The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. Cell **27**, 193–201.
Spradling A. C., Mahowald A. P. (1980). Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 1096–1100.
Stamatoyannopoulos G., Constantoulakis P., Brice M., Kurachi S., Papayannopoulou T. (1987). Coexpression of embryonic, fetal, and adult globins in erythroid cells of human embryos: Relevance to the cell-lineage models of globin switching. Dev. Biol. **123**, 191–197.
Tagaki N. (1974). Differentiation of X chromosomes in early female mouse embryos. Exp. Cell Res. **86**, 127–135.
Waddington C. H. (1940). Organisers and Genes. Cambridge University Press, Cambridge.
Watson J. D. (1976). Molecular Biology of the Gene, 3rd Ed. Benjamin Cummings, Menlo Park, California.
Wellauer P. K., Dawid I. B., Brown D. D., Reeder R. H. (1976). The arrangement of length heterogeneity in repeating units of amplified and chromosomal ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. J. Mol. Biol. **105**, 487–506.
West J. D., Frels W. I., Chapman V. M., Papaioannou V. E. (1977). Preferential expression of the maternally derived X chromosome in the mouse yolk sac. Cell **12**, 873–882.
Wharton K. A., Johansen K., Artavanis-Tsakonas S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus *Notch* implies a gene product which shares homology with proteins containing EGF-like repeats. Cell **43**, 567–581.
Witschi E. (1957). Sex chromatin and sex differentiation in human embryos. Science **126**, 1288–1290.
Wolffe A. P., Andrews M. T., Crawford E., Losa R., Brown D. D. (1987). Negative supercoiling is not required for 5 S RNA transcription in vitro. Cell **49**, 301–303.
Yedvobnick B., Muskavitch M. A. T., Wharton K. A., Halpern M. E., Paul E., Grimwade B. G., Artavanis-Tsakonas S. (1985). Molecular genetics of *Drosophila* neurogenesis. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **50**, 841–854.

Глава 12

Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции: механизмы дифференциальной транскрипции генов

В чем бы ни заключалась конкретная работа генов, их функционирование можно отнести с уверенностью к категории процессов развития и, следовательно, к области эмбриологии. В настоящее время эта центральная проблема фундаментальной биологии атакуется со многих сторон как физиологами, так и генетиками; но в сущности она является эмбриологической проблемой.

К. УОДДИНГТОН (1956)

Мы вошли в клетку, нашу колыбель, и начали составлять опись обретенного нами богатства.

АЛЬБЕР КЛОД (1974)

ЭУКАРИОТИЧЕСКИЕ ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ БЕЛКИ

Экзоны и интроны

Одно из самых удивительных открытий семидесятых годов, десятилетия, отмеченного выдающимися открытиями,– выяснение структуры эукариотического гена. Генетики, изучающие бактерий, пришли к выводу, что белковый продукт коллинеарен кодирующему его гену, т.е. 5'-конец РНК определяет аминоконцевую аминокислоту белка, и каждый кодон транслируется в аминокислоту до тех пор, пока не будет достигнут карбоксильный конец белка. В 1977 г. было обнаружено, что в случае некоторых мРНК эукариот дело обстоит иначе. Большинство расшифрованных с тех пор эукариотических генов оказались разорванными. Иными словами, 5'- и 3'-концы информационной РНК не происходят из одного непрерывного участка хромосомы. Между участками ДНК, кодирующими белок (**экзонами**), лежат промежуточные последовательности (**интроны**), которые не имеют никакого отношения к аминокислотной последовательности белка[1]. На рис. 12.1 показана структура гена β-цепи гемоглобина человека. Этот ген состоит из следующих элементов:

1. **Область промотора**, ответственная за присоединение РНК-полимеразы и последующую инициацию транскрипции. Эта область содержит, как будет показано позже, три различных элемента и располагается с 95-й по 26-ю пару оснований перед сайтом инициации транскрипции (т.е. от −95-й до −26-й).
2. Последовательность АЦАТТТГ, на которой инициируется *транскрипция*. Ее часто называют **кэп-последовательностью**, потому что она кодирует 5'-конец РНК, который получит вскоре после транскрипции группу из модифицированных нуклеотидов – кэп (о чем будет говориться ниже).
3. **Кодон АТГ**, инициирующий *трансляцию*. Этот кодон лежит через 50 пар оснований после точки инициации транскрипции. Промежуточная область из 50 пар оснований между точками инициации транскрипции и трансляции называется **лидерной последовательностью**.
4. Экзон, содержащий 90 пар оснований, которые кодируют аминокислоты 1–30 в β-цепи гемоглобина человека.

[1] Известны, однако, интересные исключения (например, гены гистонов), когда таких промежуточных последовательностей в генах не содержится. Любая гипотеза, касающаяся функции этих последовательностей, должна учитывать такие исключения.

А



Б

цццтгттгаГццацаццттагггттгГццаатцтацтццаггагцагггагггцагГагццагггцтггг**цатаааа**

гтцагггцагагццатцтатттгцттАЦАТТТГЦТТЦТГАЦАЦААЦТГТГТТЦАЦТАГЦААЦЦТЦАААЦАГАЦАЦЦ**АТГ**

ВалГисЛейТреПроГлуГлуЛизСерАлаВалТреАлаЛейТриГлиЛизВалАснВалАспГлуВалГлиГлиГлу

ГТГЦАЦЦТГАЦТЦЦТГАГГАГААГТЦТГЦЦГТТАЦТГЦЦЦТГТГГГГЦААГГТГААЦГТГГАТГААГТТГГТГГГТГАГ

АлаЛейГлиАрг

ГЦЦЦТГГГЦАГГТТГГТАТЦААГГТТАЦААГАЦАГГТТТААГГАГАЦЦААТАГАААЦТГГГЦАТГТГГАГАЦАГАГААГ

ЛейЛейВалВалТир

АЦТЦТТГГГТТТТЦТГАТАГГЦАЦТГАЦТЦТЦТГЦЦТАТТГГТЦТАТТТТЦЦЦАЦЦЦТТАГГЦТГЦТГГТГГТЦТАЦ

ПроТриТреГлнАргФенФенГлуСерФенГлиАспЛейСерТреПроАспАлаВалМетГлиАснПроЛизВалЛиз

ЦЦТТГГАЦЦЦАГАГГТТЦТТТГАГТЦЦТТТГГГГАТЦТГТЦЦАЦТЦЦТГАТГЦТГТТАТГГГЦААЦЦЦТААГГТГААГ

АлаГисГлиЛизЛизВалЛейГлиАлаФенСерАспГлиЛейАлаГисЛейАспАснЛейЛизГлиТреФенАлаТре

ГЦТЦАТГГЦААГАААГТГЦТЦГГТГЦЦТТТАГТГАТГГЦЦТГГЦТЦАЦЦТГГАЦААЦЦТЦААГГГЦАЦЦТТТГЦЦАЦА

ЛейСерГлуЛейГисЦисАспЛизЛейГисВалАспПроГлуАснФенАрг

ЦТГАГТГАГЦТГЦАЦТГТГАЦААГЦТГЦАЦГТГГАТЦЦТГАГААЦТТЦАГГгтгагтЦТАТГГГАЦЦЦТТГАТГТТТТ

ЦТТТЦЦЦЦТТЦТТТТЦТАТГГТТААГТТЦАТГТЦАТАГГААГГГГАГААГТААЦАГГГТАЦАГТТТАГААТГГГААЦ

АГАЦГААТГАТТГЦАТЦАГТГТГГААГТЦТЦАГГАТЦГТТТТАГТТТЦТТТТАТТТГЦТГТТТЦАТААЦААТТГТТТТЦ

ТТТТГТТТААТТЦТТГЦТТТЦТТТТТТТТТЦТТЦТЦЦГЦААТТТТТАЦТАТТАТАЦТТААТГЦЦТТААЦАТТГТГТАТ

ААЦАААААГГААААТАТЦТЦТГАГАТАЦАТТААГТААЦТТАААААААААЦТТТАЦАЦАГТЦТГЦЦТАГТАЦАТТАЦТАТТ

ТГГААТАТАТГТГТГЦТТАТТТГЦАТАТТЦАТААТЦТЦЦЦТАЦТТТАТТТТЦТТТТАТТТТТААТТГАТАЦАТААТЦА

ТТАТАЦАТАТТТАТГГГТТАААГТГТААТГТТТТААТАТГТГТАЦАЦАТАТТГАЦЦАААТЦАГГГТААТТТТГЦАТТ

ТГТААТТТТАААААТГЦТТТЦТТЦТТТТААТАТАЦТТТТТТГТТТАТЦТТАТТТЦТААТАЦТТТЦЦЦТААТЦТЦТТТ

ЦТТТЦАГГГЦААТААТГАТАЦААТГТАТЦАТГЦЦТЦТТТГЦАЦЦАТТЦТАААГААТААЦАГТГАТААТТТЦТГГГГТТА

АГГЦААТАГЦААТАТТТЦТГЦАТАТАААТАТТТЦТГЦАТАТАААТТГТААЦТГАТГТААГАГГТТТЦАТАТТГЦТАА

ТАГЦАГЦТАЦААТЦЦАГЦТАЦЦАТТЦТГЦТТТТАТТТТАТГГТТГГГАТААГГЦТГГАТТАТТЦТГАГТЦЦААГЦТАГ

ЛейЛейГлиАснВалЛейВалЦисВалЛейАла

ГЦЦЦТТТТГЦТААТЦАТГТТЦАТАЦЦТЦТТАТЦТТЦЦТЦЦЦАЦАГЦТЦЦТГГГЦААЦГТГЦТГГТЦТГТГТГЦТГГЦЦ

ГисГисФенГлиЛизГлуФенТреПроПроВалГЛНАлаАлаТирГлиЛизВалВалАлаГлиВалАлаАснАлаЛей

ЦАТЦАЦТТТГГЦАААГААТТЦАЦЦЦЦАЦЦАГТГЦАГГЦТГЦЦТАТЦАГАААГТГГГТГГЦТГГТГТГГЦТААТГЦЦЦТГ

АлаГисЛизТирГис

ГЦЦЦАЦААГТАТЦАЦ**ТАА**ГЦТЦГЦТТТЦТТГЦТГТЦЦААТТТЦТАТТАААГГТТЦЦТТТГТТЦЦЦТААГТЦЦАААЦТАЦ

ТАААЦТГГГГГАТАТТАТГААГГГЦЦТТГАГЦАТЦТГГАТТЦТГЦЦТААТАААААААЦАТТТАТТТТЦАТТГЦаатгат

гтатттааатттатттцтгаататттттацтаааааагггаатгтгггггагггцагггцатттаааацатаааагаааатгатг

агцтгттцаааацттгггггаааатацацтататцтттаааацтццатгааагаагггтгагггцтгцааццагцтаатгцаца

ттггцаацагццццтгатгццтатгццттатттцатцццтцагаааагггатттцтттгтагагггцтттгатттгцагггтаа

агтттттгцтатгцтгтатттттацатттацгттатгтгтттттагцтгтгццтцатгаатгтцтттттцаацтацццатттгцттт

тццтгцатцтцтцтцагццтггацт...

Рис. 12.1. Последовательность нуклеотидов в гене β-цепи глобина человека. *А*. Схема локализации промотора, сайта инициации транскрипции (кэп-сайта), лидерной последовательности, экзонов и интронов в гене β-цепи глобина. Экзоны обозначены черным цветом, числа по их краям указывают положения кодируемых ими аминокислот в β-цепи глобина. *Б*. Последовательность нуклеотидов в гене β-цепи глобина от 5'- до 3'-конца мРНК. Последовательности промотора, а также сигналы инициации и терминации трансляции АТГ и ТАА заключены в рамку. Большими прописными буквами обозначены экзоны, кодируемые ими аминокислоты указаны над последовательностью нуклеотидов. Малыми прописными буквами обозначены основания в интронах. Кодоны, представленные прописными буквами за терминатором трансляции, входят в глобиновую мРНК, но не транслируются в белок. Полагают, что внутри этой области расположена последовательность, необходимая для полиаденилирования. Основание Г в первом интроне (указано стрелкой) заменено на А при одной из форм β°-талассемии. (Последовательность из Lawn et al., 1980.)

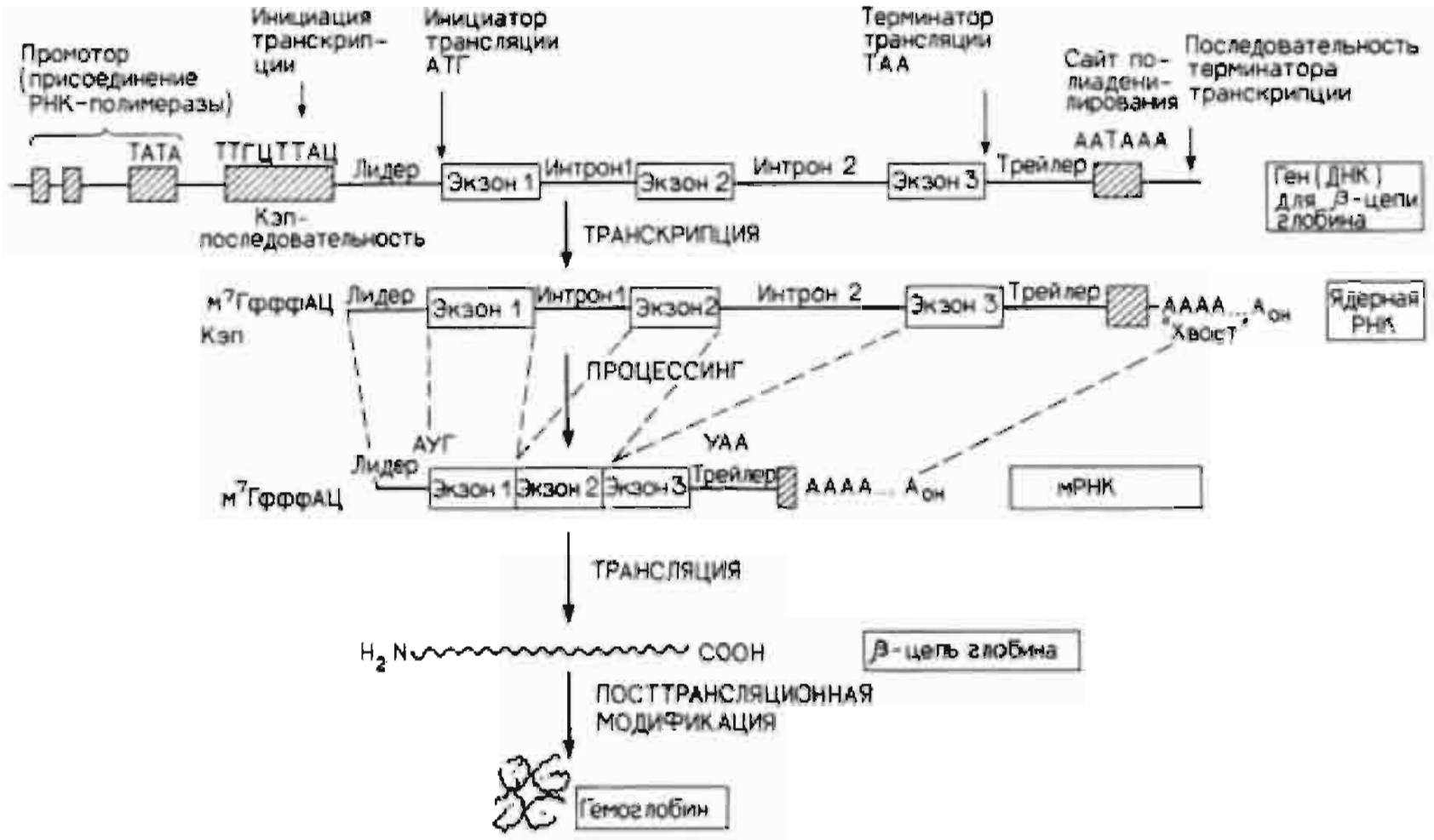


Рис. 12.2. Этапы формирования β-цепи глобина и гемоглобина.

5. Интрон из 130 пар оснований, который не содержит последовательностей, кодирующих гемоглобин.
6. Экзон, содержащий 222 пары оснований, которые кодируют аминокислоты 31–104.
7. Большой интрон – 850 пар оснований, – не вносящий вклада в белковую структуру гемоглобина.
8. Экзон, содержащий 126 пар оснований, которые кодируют аминокислоты 105–146.
9. **Кодон терминации трансляции** – ТАА.
10. **Транскрибируемая 3′-концевая область**, которая не транслируется в белок. Эта область включает последовательность ААТААА, которая необходима для присоединения к РНК-транскрипту «хвоста» приблизительно из 200–300 адениловых остатков. Этот поли(А)-конец вставляется в РНК примерно через 20 оснований после ААУААА-мотива. Однако прежде, чем транскрипция завершается, она продолжается после ААТААА-сайта на расстояние около 1000 нуклеотидов. В случае если в ААТААА-сайте возникла какая-либо мутация, поли(А)-хвост не добавляется и транскрипция не останавливается (Logan et al., 1987). В пределах транскрибируемой 3′-концевой области расположена последовательность **энхансера** (примерно 600–900 пар оснований от ААТААА-сайта), которая необходима для временной и пространственной организации экспрессии β-глобинового гена в предшественниках зрелых эритроцитов (Trudel, Constantini, 1987).

Изначальный ядерный РНК-транскрипт для такого гена содержит кэп-последовательность, лидерную последовательность, экзоны, интроны и 3′-нетранслируемый участок (рис. 12.2). Кроме того, оба конца транскрипта претерпевают модификацию. Концевая группа, названная **кэп-группой** (от англ. cap, что значит «шапочка»), состоящая из метилированного гуанозина, помещается на 5′-конце РНК. Таким образом, в отличие от предшественника мРНК, все нуклеотиды которого связаны в направлении от 5′ к 3′, кэп-структура присоединена в направлении от 5′ к 5′. Это означает, что в ядерной РНК отсутствует свободная 5′-фосфатная группа (рис. 12.3). Молекулы зрелой информационной РНК содержат аналогичные кэп-группы, хотя остается неясным, действительно ли кэп-группа в мРНК является той самой, что была изначально получена в ядре. Известно также, что концевая 5′-кэп-группа необходима для присоединения мРНК к рибосоме (Shatkin, 1976).

3′-Конец обычно модифицируется в ядре путем присоединения хвоста примерно из 200 остатков аденилата. Эти остатки адениловой кислоты соединяются друг с другом ферментативно и добавляются к транскрипту. Они не кодируются последова-

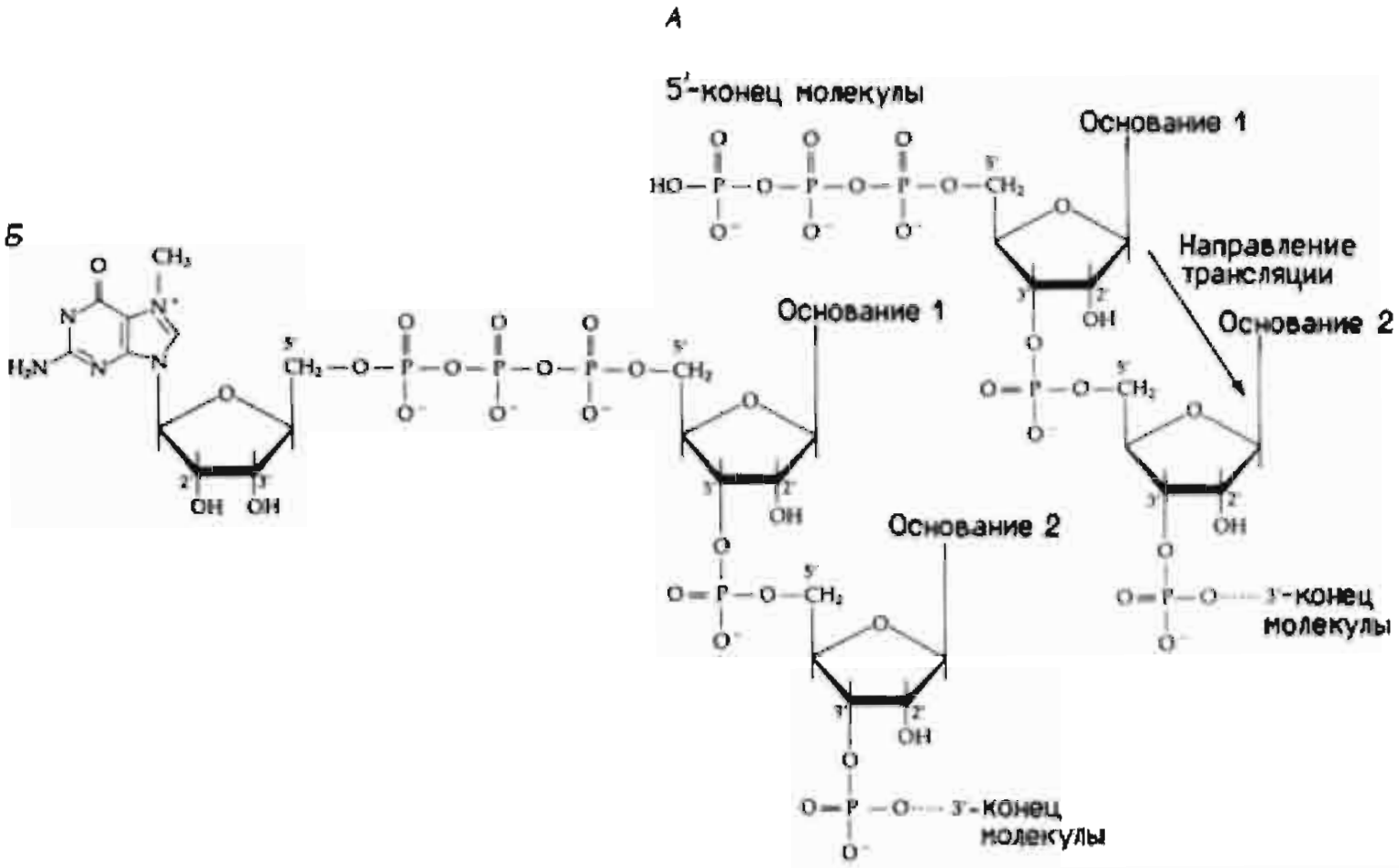
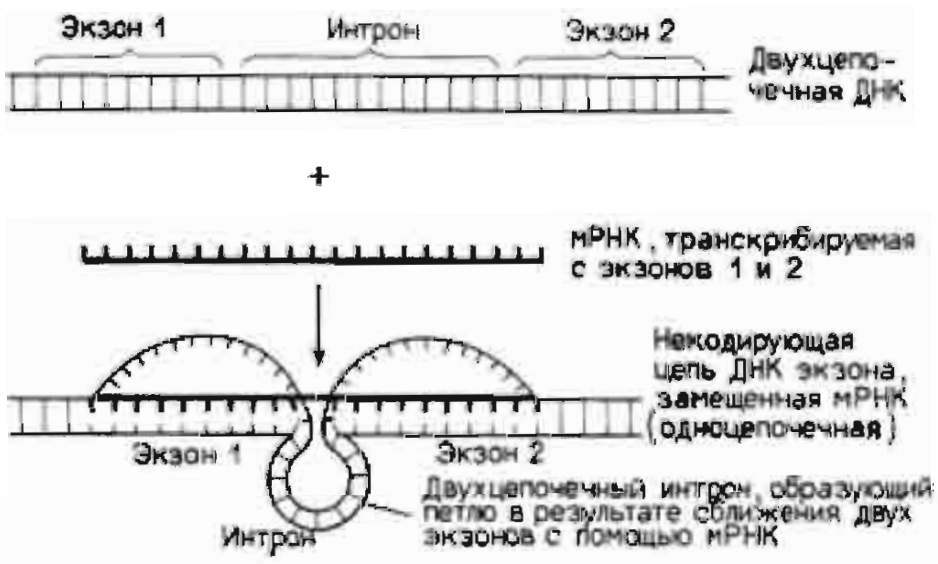


Рис. 12.3. Присоединение кэп-группы к 5'-концу мРНК эукариот. *А*. Исходный 5'-конец. *Б*. 5'-кэп. Показано добавление к мРНК 7-метилгуанозина в направлении 5' → 5'. Во многих мРНК наблюдается также метилирование 2'-гидроксильных групп первых двух оснований. (По Rottman et al., 1974.)



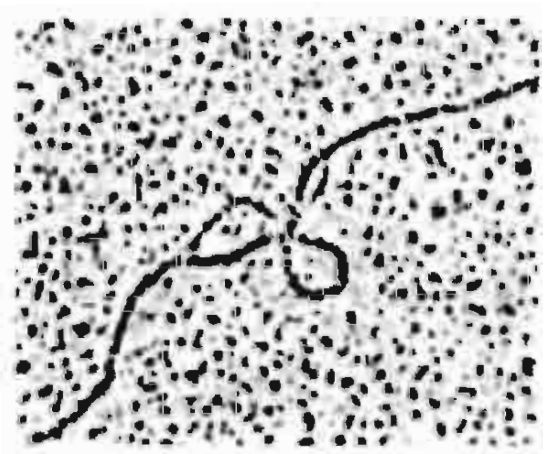


Рис. 12.4. Обнаружение интронов при картировании с вытеснением петли (*R*-петли). Ген β-цепи глобина мыши смешивают в формамиде с собственной мРНК. Присутствие формамида обеспечивает предпочтительную РНК–ДНК-гибридизацию, а не гибридизацию ДНК–ДНК. При замещении РНК гомологичной цепи ДНК вытесненная ДНК образует одноцепочечную R-петлю. При этом интрону, находящемуся между двумя кодирующими последовательностями, энергетически выгодно образовать двухцепочечную петлю. *А*. Схема, иллюстрирующая принцип картирования с R-петлей. *Б*. Электронная микрофотография, иллюстрирующая взаимодействие β-глобинового гена мыши и мРНК этого гена. В сопроводительной схеме сплошными жирными линиями обозначена ДНК, а тонкой штриховой линией – β-глобиновая мРНК. (Фотография из Tiemeier et al., 1978.)

тельностью гена. Обе модификации, 5'- и 3'-концов, могут защищать РНК от экзонуклеаз (Sheiness, Darnell, 1973; Gedamu, Dixon, 1978), стабилизируя таким образом мРНК и ее предшественник. Эти поли(А)-хвосты прогрессивно укорачиваются по мере старения мРНК. Новообразованная глобиновая мРНК в клетках мыши и кролика имеет около 150 адениловых остатков, тогда как старые РНК – 100, 60 или 40 аденилатов (Merkel et al., 1975; Nokin et al., 1976). Показано, что глобиновая мРНК, лишенная поли(А), быстро разрушается после инъекции ее в ооциты *Xenopus*. Глобиновая мРНК с поли(А)-хвостом существует в этих условиях более 20 ч (Marbaix et al., 1975).

Наличие интронов между кодирующими областями было выявлено с помощью электронного микроскопа (рис. 12.4). Информационная РНК β-цепи глобина связывается со специфическими участками ядерного гена, выпячивая интроны. Имеются разного рода данные, что эти интроны необходимы для того, чтобы последовательности мРНК покинули ядро и попали в цитоплазму, где они могут быть транслированы в белки. Во-первых, можно сконструировать искусственные вирусы так, что в них будет встроена часть глобинового гена. Затем этим вирусам дают возможность инфицировать клетки и транскрибировать РНК в ядрах. Если вирус содержит интрон (из глобинового гена или из вирусного гена), то в цитоплазме обнаруживаются стабильные последовательности глобиновой мРНК. Однако если интрон вируса или глобинового гена отсутствует, то последовательности глобиновой мРНК в цитоплазме не накапливаются (Hamer, Leder, 1979).

Во-вторых, как уже было отмечено ранее, некоторые индивидуумы страдают от болезни, называемой **β⁺-талассемией**; это заболевание характеризуется недостаточной продукцией β-цепей глобина. У больных имеются гены для β-цепей глобина, и транскрипция предшественников мРНК на этих генах проходит, по-видимому, нормально. Более того, мРНК этих больных правильно транслируется в аминокислотную последовательность β-цепи глобина человека. Дело заключается в *количестве* β-глобиновой мРНК. Следовательно, заболевание проявляется на уровне процессинга РНК. Это было показано с помощью пульсового мечения («pulse-chase») (Maquat el al., 1980). Развивающиеся эритроциты, выделенные из костного мозга больных, в течение 12 мин инкубировали с радиоактивными нуклеотидами («pulse»). Затем транскрипцию останавливали актиномицином D. Через различные интервалы времени («chase») из клеток выделяли РНК, которую подвергали электрофорезу для разделения молекул РНК по размерам, и затем гибридизовали эти РНК с β-глобиновой кДНК. У нормальных индивидуумов вскоре после мечения появляется РНК длиной 1900 оснований. Несколько позже кДНК связывается с молекулами РНК, содержащими 1550, 1150, 960 и 880 оснований. Еще несколькими минутами позже 85% всей РНК представляет собой мРНК. В клетках от больных β⁺-талассемией наблюдается переизбыток промежуточных продуктов. Очень незначительная часть этих РНК имеет к 30 минутам размеры зрелой мРНК. Образовавшиеся промежуточные продукты разрушаются, вероятно, в ядре, и лишь немногие выходят в цитоплазму (Maquat el al., 1980; Kantor et al., 1980). Таким образом, β⁺-талассемия обусловлена дефектом в процессинге предшественника β-глобиновой мРНК. В результате секвенирования β-глобиновых генов нескольких больных было обнаружено, что они содержат мутации в первом интроне. Мутация в одном из этих генов показана на рис. 12.1 (Spritz et al., 1981). Итак, структура интрона оказывается существенной для процессинга и транспорта РНК из ядра в цитоплазму. Механизм такого сплайсинга и его значение для дифференциальной экспрессии генов будут обсуждаться в гл. 13.

Структура и функция промотора

Для осуществления правильной транскрипции необходимы регуляторные элементы двух типов. Регуляторные элементы первого типа называют **цис-регуляторами**. Они представляют собой специфические последовательности ДНК на данной хромосоме. *Цис*-регуляторы оказывают действие только на ближние гены. Второй тип называют **транс-регуляторами**. Это растворимые молекулы (включая белки и РНК), которые продуцируются одним геном, а взаимодействуют с другими генами на той же хромосоме или на других хромосомах. Если обратиться к индукции генов в *lac*-опероне *E. coli*, то можно вспомнить, что ген репрессора дает белок-репрессор, который взаимодействует с последовательностью оператора для генов *lac*-оперона. В этом случае оператор является *цис*-регуляторным элементом, так как он контролирует только *lac*-оперон своей собственной хромосомы. (Последовательность мутантного оператора на другой хромосоме может присоединять или не присоединять белок-репрессор.) Белок-репрессор, напротив, является *транс*-регулятором, поскольку он продуцируется одной хромосомой, а связывается с *цис*-регуляторным оператором на другой хромосоме (рис. 12.5).

В эукариотических генах, кодирующих мРНК, обнаружены два типа *цис*-регуляторных последовательностей ДНК – промоторы и энхансеры («усилители»). **Промоторы** обычно располагаются непосредственно перед сайтом, в котором начинается

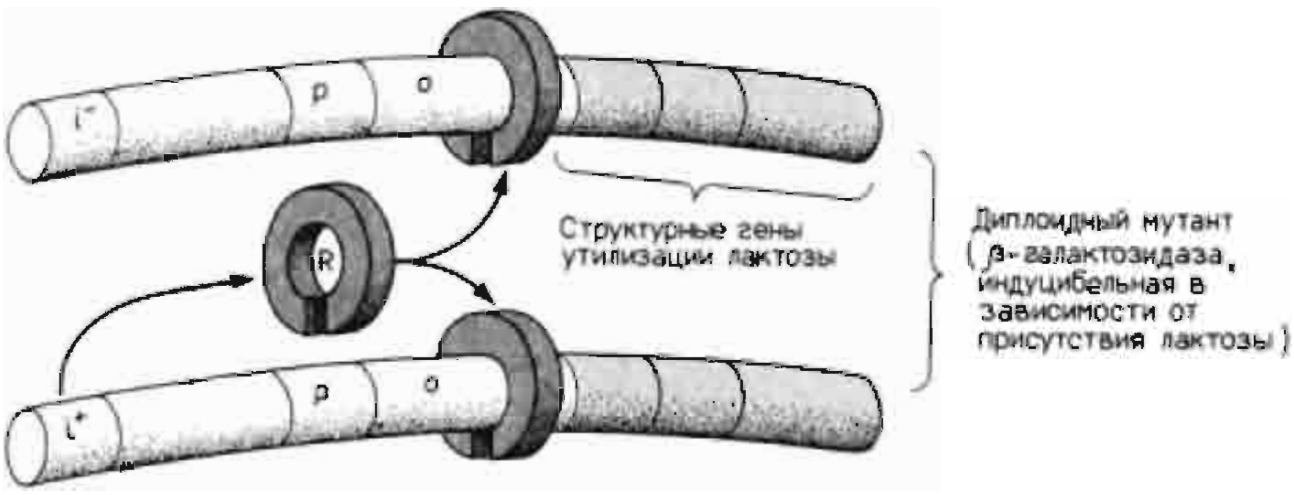


Рис. 12.5. Схема дифференциальной регуляции гена у *E. coli*; показаны *цис*- и *транс*-регуляторные элементы. В клетках дикого типа индуцибельное состояние характеризуется тем, что РНК для β-галактозидазы не транскрибируется, пока отсутствует лактоза. В отсутствие лактозы белок-репрессор (R), кодируемый геном *i*, присоединяется к сайту оператора (*o*), ингибируя этим транскрипцию РНК-полимеразой с промотора (*p*). Если лактоза присутствует, то она связывается с белком-репрессором, в результате репрессор не может присоединиться к ДНК и транскрипция продолжается. Растворимая природа этого репрессора показана в опытах на мутантах *E. coli*. Когда гаплоидные бактериальные клетки, несущие ген i^-, становятся частично диплоидными с геном *i* дикого типа (i^+), синтезируется репрессор дикого типа, который способен сделать индуцибельным исходный ген β-галактозидазы. Этот белок-репрессор является *транс*-регуляторным элементом. Последовательности промотора и оператора представляют собой *цис*-регуляторные элементы.

транскрипция, и длина их составляет приблизительно 100 пар оснований. Участок промотора необходим для присоединения РНК-полимеразы II и точной инициации транскрипции. Энхансер активирует утилизацию промотора, контролируя эффективность и скорость транскрипции с этого конкретного промотора. **Энхансеры** активируют только лежащие в *цис*-положении промоторы (т.е. промоторы на той же самой хромосоме), но они могут функционировать и на больших расстояниях. Кроме того, они могут находиться не только на 5′-стороне гена, но и на другой цепи ДНК (Maniatis et al., 1987).

Промоторы генов, которые транскрибируют относительно большие количества мРНК, имеют сходную структуру. В них содержится последовательность АТА (называемая иногда ТАТА-боксом или **боксом Голдберга – Хогнесса**), располагающаяся на расстоянии приблизительно 30 пар оснований с 5′-стороны от сайта, где начинается транскрипция, и один или несколько **передних элементов промотора**, лежащих еще дальше с 5′-стороны. Передний элемент промотора обычно представляет собой вариацию последовательности ЦААТ, но выявлены и другие промоторные элементы (Grosschedl, Birnstiel, 1980; McKnight, Tjian, 1986) (рис. 12.6).

Впервые промотор β-глобинового гена исследовали в опытах по проверке специфической транскрипции клонированной ДНК. Клонированные гены могут транскрибироваться правильно, когда они введены в ядра ооцитов лягушки или фибробластов или когда они инкубируются с очищенной РНК-полимеразой в присутствии нуклеотидов надосадочной жидкости (Wasylyk et al., 1980). После того как транскрипция гена подтверждена, для получения специфических делеций в этом гене или окружающих его участках используют рестриктазы. Затем можно выяснить, продолжает ли правильно транскрибироваться такой модифицированный ген. Результаты этих исследований показали, что для максимальной транскрипции β-глобинового гена достаточно первых 109 пар оснований, предшествующих кэп-сайту (Grosveld et al., 1982; Dierks et al., 1983).

Другие исследователи уточнили этот вывод с помощью клонирования участка глобинового гена мыши от 106-й пары оснований выше (с 5′-стороны) старта транскрипции (положение −106) вплоть до 475-й пары оснований (положение +475) в первом экзоне (Myers et al., 1986). Эти клоны были подвергнуты мутагенезу in vitro. Таким способом в область промотора глобинового гена было введено

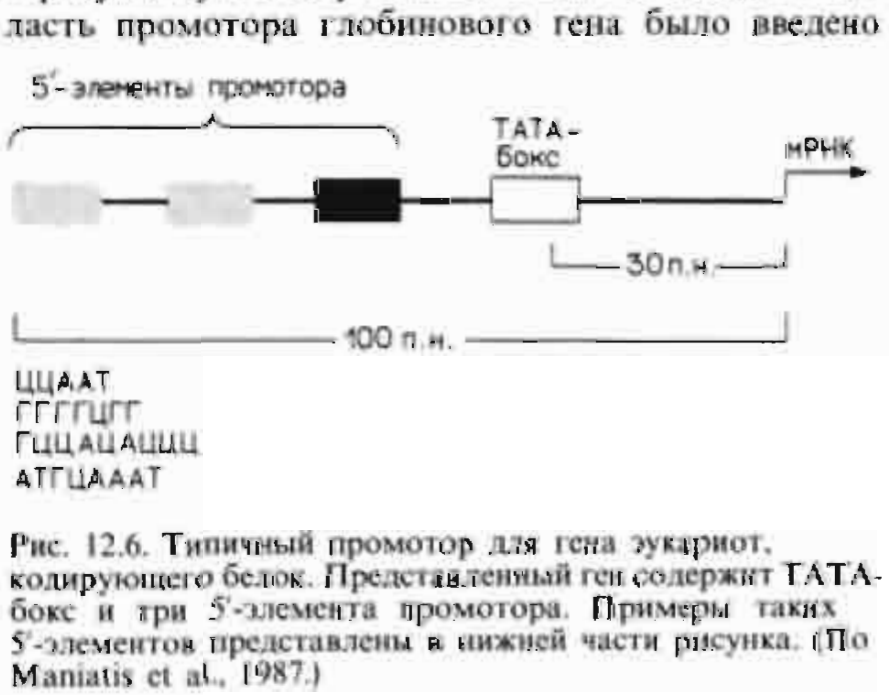


Рис. 12.6. Типичный промотор для гена эукариот, кодирующего белок. Представленный ген содержит ТАТА-бокс и три 5′-элемента промотора. Примеры таких 5′-элементов представлены в нижней части рисунка. (По Maniatis et al., 1987.)

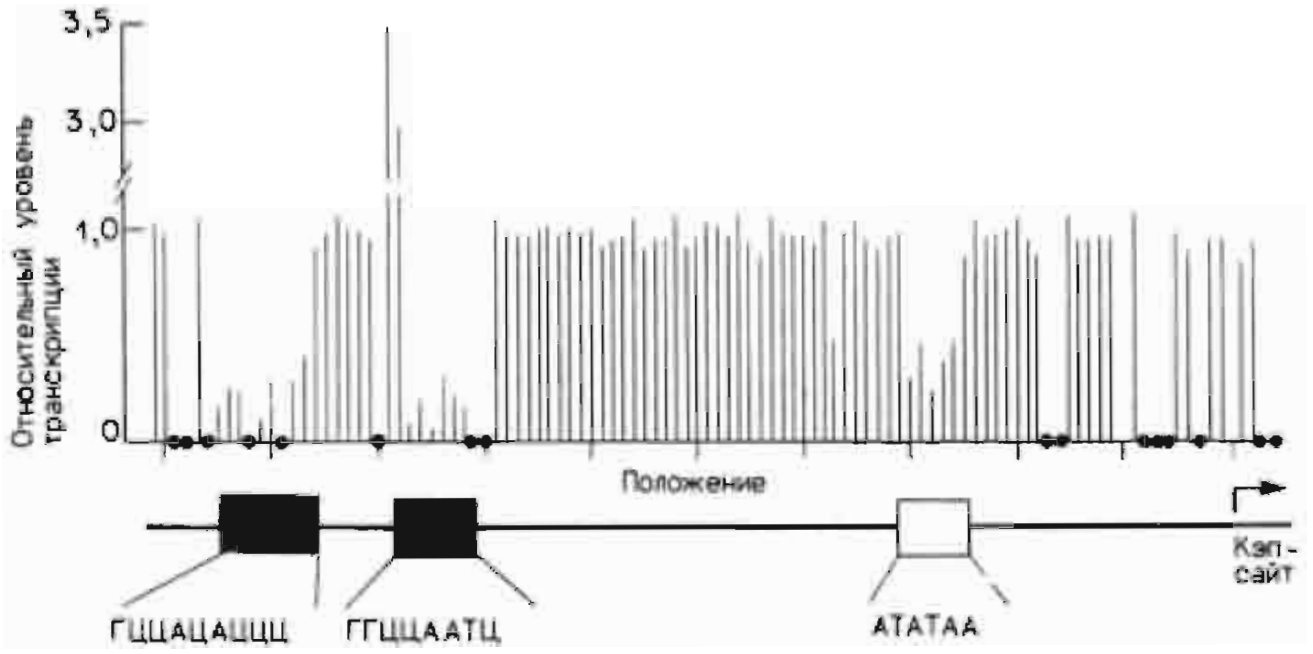


Рис. 12.7. Влияние отдельных точковых мутаций в промоторе β-глобинового гена мыши на способность промотора к инициации транскрипции. Каждая линия представляет уровень транскрипции с мутантного промотора по отношению к уровню транскрипции с глобинового промотора дикого типа, определяемому в параллельных опытах. Черными точками указаны нуклеотиды, для которых не были получены мутации. Под гистограммой представлена схема, показывающая положение ТАТА-бокса и двух 5'-элементов промотора в гене β-цепи глобина мыши. (Из Maniatis et al., 1986.)

130 различных одиночных замен оснований. Полученные клонированные гены вводили в плазмиды, содержащие энхансер, и затем с помощью трансфекции – в культивируемые клетки, которые в обычных условиях не синтезируют глобин. Будут ли в таких клетках транскрибироваться усеченные глобиновые мРНК (475 оснований) с этих клонов? Результаты опытов показаны на рис. 12.7. В большинстве случаев мутации в 5'-фланкирующей области не влияли на эффективность транскрипции глобинового гена. Однако мутации в трех кластерах нуклеотидов резко снижали транскрипцию. Один кластер находился в ТАТА-боксе (боксе Голдберга – Хогнесса), другой – в переднем ЦААТ-элементе промотора, а третий – в участке ГЦЦАЦАЦЦЦ, от 95-й до 87-й пары оснований выше кэп-сайта.

Таблица 12.1. Основные элементы промотора, общие для разных генов

Ген	ЦААТ-участок[1]	ТАТА-участок[1]
Гистон		
H2A (морской еж)	ГГАЦААТТГ (−85)	ТАТАААА (−34)
H2B (морской еж)	ГАЦЦААТГА (−92)	ТАТАААА (−26)
H3 (морской еж)	ГАЦЦААТЦА (−75)	ТАТАААТ (−30)
H2A (дрозофила)	АГТЦААТТС	ТАТАААТ
H3 (дрозофила)	ЦГТЦАААТГ	ТАТААГТ
Глобин		
α (мышь)	АГЦЦААТГА (−88)	ЦАТАТАА (−29)
α2 (человек)	АГЦЦААТГА (−70)	ЦАТАААЦ (−28)
Коллаген		
α2 тип I (курица)	ГЦЦЦАТТГЦ (−78)	ТАТАААТ
Инсулин		
Человек	ГГЦЦАГГЦГ (−73)	ТАТАААГ (−29)
Крыса I	ГГЦЦАААЦГ (−78)	ТАТАААГ (−30)
Овальбумин	ГГТЦАААЦТ (−74)	ТАТАТАТ (−31)
Кональбумин	ГГАЦАААЦА (−81)	ТАТАААА (−30)
Фибрион шелка	ГТАЦАААТА (−93)	ТАТАААА (−29)

Источник: Efstratiadis et al. (1980); Vogeli et al. (1981).

[1] Числа в скобках указывают положение в 5'-области от точки, где инициируется транскрипция.

Во многих эукариотических промоторах ЦААТ- и ТАТА-боксы являются необходимыми элементами (Efstratiadis et al., 1980) (табл. 12.1), а последовательность ГЦЦАЦАЦЦЦ не наблюдается нигде, за исключением промоторов β-глобиновых генов у нескольких видов. У человека эта последовательность является, по-видимому, критической, поскольку мутации, возникшие в ней естественным образом, полностью прекращают транскрипцию β-глобинового гена (Orkin, Kazazian, 1984). Две мутации в положениях −78 и −79 в действительности увеличивают транскрипцию в три раза по отношению к уровню дикого типа. Полагают, что эти замены способствуют взаимодействию промотора с *транс*-регуляторными белками.

Связывание *транс*-регуляторных белков с промоторами

В большинстве клеток эукариот имеются РНК-полимеразы трех типов; ферментом, ответственным за транскрипцию молекул мРНК, является **РНК-полимераза II**. Однако очищенная РНК-полимераза II не может узнавать последовательность промотора в отсутствие других факторов в ядрах. Без этих факторов транскрипция инициируется на случайных последовательностях. Поэтому транскрипция будет неправильной в случае, если инкубировать клонированные гены только с очищенной РНК-полимеразой II и нуклеотидтрифосфатами. Если же добавить ядерные экстракты, то транскрипция будет проходить правильно. Что это за факторы? Из ядер клеток дрозофилы были изолированы два фактора, необходимые для транскрипции нескольких генов (включая два гена гистонов и ген актина) (Parker, Topol, 1984). Один из них связывается, по-видимому, с передним элементом промотора, а другой присоединяется к ТАТА-боксу. Из клеток млекопитающих также были изолированы белки, связывающиеся с ТАТА-боксом (Davison et al., 1983; Shi et al., 1986). Другой ядерный белок (CTF) присоединяется к переднему ЦААТ-элементу промотора и необходим для транскрипции с нескольких ЦААТ-содержащих промоторов, а ядерный белок Sp1 специфически связывается с промоторной последовательностью ГГГЦГГ (Dynan, Tjian, 1985; Jones et al., 1987). Помимо этого в ядрах существуют другие белки, которые образуют стабильный комплекс с РНК-полимеразой без взаимодействия с ДНК (Zheng et al., 1987). Не исключено, что эти факторы находятся во всех клетках и поэтому не могут регулировать дифференциальную экспрессию генов. Однако они могут быть вовлечены во взаимодействие между участком промотора и участком энхансера таким образом, что будет происходить дифференциальная транскрипция определенных генов в определенных клетках.

Существует еще одна группа ядерных белков, характерных для ограниченного набора клеток и способных регулировать транскрипционную экспрессию генов. К числу таких белков относится GHF-1 – пептид, обнаруживаемый только в клетках передней доли гипофиза. Эксперименты по ДНК-футпринтингу показали, что GHF-1 присоединяется к 5′-элементу промотора в гене гормона роста человека. Если клонированные гены гормона роста добавить в ядерные экстракты из негипофизарных клеток, то эти гены не транскрибируются. Вместе с тем транскрипция будет происходить, если гены гормона роста добавить к ядерным экстрактам из клеток передней доли гипофиза. Более того, добавление GHF-1 к ядерному экстракту негипофизарных клеток позволяет экстракту транскрибировать ген гормона роста (Bodner, Karin, 1987). Из этого следует, что специфическая экспрессия гена гормона роста в передней доле гипофиза может быть опосредована тканеспецифичным белком, связывающимся с промотором.

Структура и функция энхансеров

Помимо промоторов обеспечивать механизм дифференциальной транскрипции генов может другой тип *цис*-регуляторных участков. Эти последовательности ДНК называют **энхансерами**. Впервые они были открыты в вирусах, однако в настоящее время известно, что они имеются и в клетках эукариот. Один из первых обнаруженных клеточных энхансеров контролирует клеточную специфичность транскрипции генов иммуноглобулинов. Джиллис и др. (Gillies et al., 1983) с помощью трансфекции вводили клонированный ген тяжелой цепи иммуноглобулина в культивируемые опухолевые В-лимфоциты, которые утратили способность продуцировать свои собственные тяжелые цепи. С этой целью клонированный ген добавляли в раствор фосфата кальция и смешивали с лимфоцитами. В небольшом проценте случаев этот ген попадал в клетки и встраивался в ядерные хромосомы. Полученные трансфицированные клетки миеломы приобретали способность синтезировать тяжелую цепь, кодируемую встроившимся геном. Однако если вводился тот же самый ген, но без небольшого участка интрона между вариабельной и константной областями, то транскрипция этого гена была очень незначительна. Внутри интрона существовал участок, необходимый для транскрипции (рис. 12.8).

Потребность в энхансерной последовательности может объяснить, почему не происходит беспорядочной транскрипции со всех промоторных последовательностей в генах вариабельной области, по-

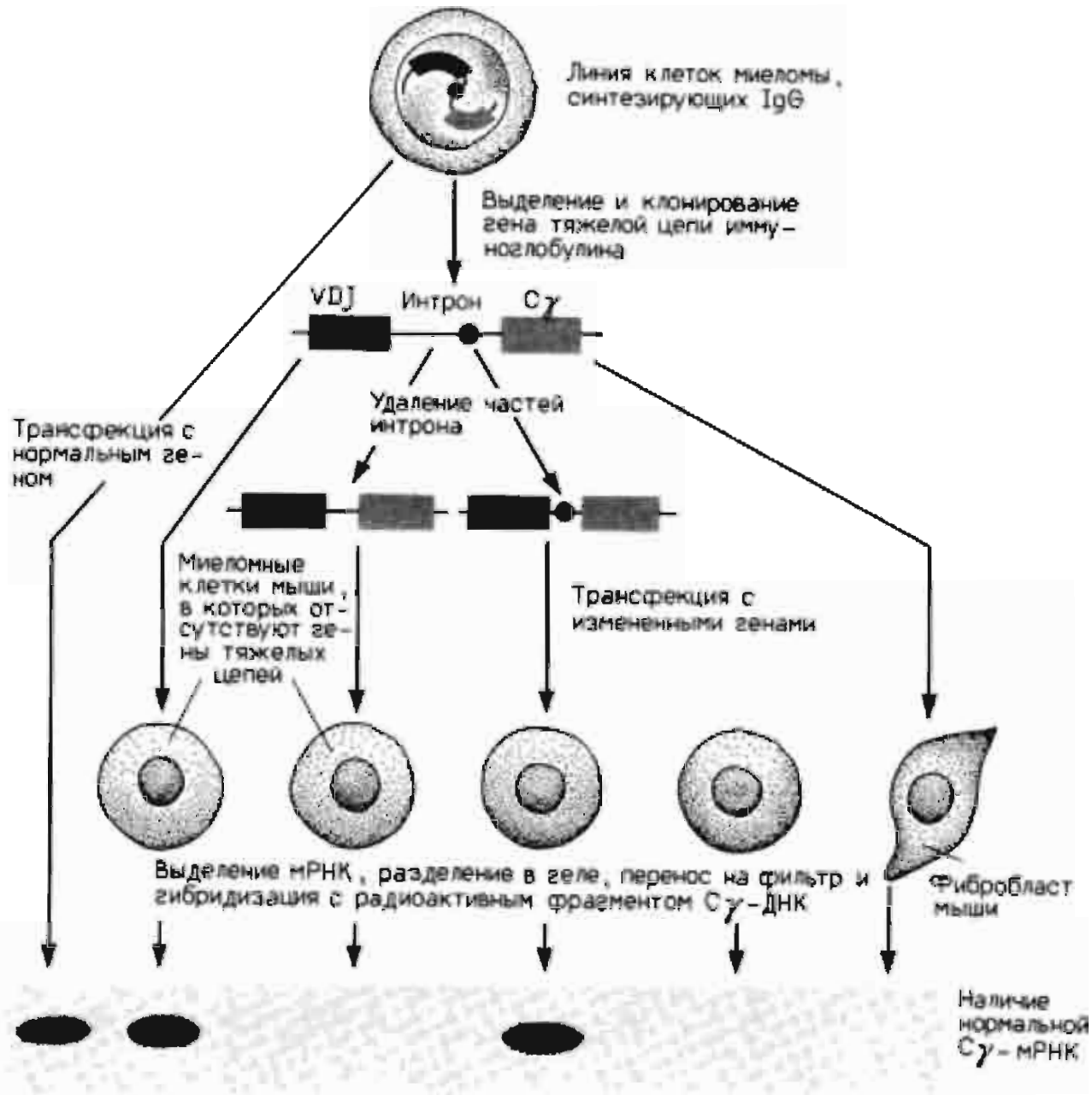


Рис. 12.8. Тканевая специфичность влияния энхансерного элемента. Ген тяжелой цепи иммуноглобулина был выделен из линии клеток миеломы, синтезирующих IgG, и клонирован. В исходных клетках сегменты VDJ были транслоцированы (как обсуждалось в гл. 10) в участок вблизи локуса Cγ. Одни клоны сохраняли интактными, тогда как в других удаляли с помощью рестриктаз различные части интрона между экзонами VDJ и Cγ. ДНК полученных клонов трансфицировали в миеломные клетки, которые утратили собственные гены иммуноглобулинов. Затем из трансфицированных клеток выделяли образовавшуюся мРНК и фракционировали ее с помощью электрофореза в полиакриламидном геле вместе с мРНК из линии трансфицированных фибробластов мыши и из исходных клеток миеломы. РНК переносили с помощью блоттинга на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с радиоактивным фрагментом из участка Cγ. В случае если участок Cγ транскрибируется с клонированных генов, радиоактивный зонд должен присоединяться к нему. С помощью зонда было показано, что Cγ-мРНК синтезируется только в тех клонах, которые содержали определенный участок интрона (отмечены пятнами). Однако после трансфекции в фибробласты мыши даже полный клонированный ген не транскрибировал Cγ-мРНК. (Протокол и данные из Gillies et al., 1983.)

скольку для того, чтобы функционировать, промотор должен быть размещен вблизи энхансера. При переключении классов участок энхансера остается у фрагмента VDJ (рис. 12.9). Энхансеры могут объяснить также тканеспецифическую транскрипцию, так как клонированные гены иммуноглобулинов *не транскрибируются* после введения в ядра клеток, не являющихся В-лимфоцитами (Gillies et al., 1983; Banerji et al., 1983). Кроме того, если участок энхансера тяжелой цепи иммуноглобулина встроен в клонированный ген β-цепи глобина, то он более чем в 100 раз стимулирует транскрипцию этого гена после его введения в клетку миеломы. Таким образом, перед нами – специфический участок ДНК, который стимулирует транскрипцию лежащих поблизости генов в клетках определенного типа.

Энхансеры, активность которых регулируется во времени

Известны энхансерные последовательности, которые регулируют или время экспрессии генов, или специфичность экспрессии, или то и другое одновременно. Одно из наиболее резких по времени переключений генной активности наблюдается при переходе к средней бластуле (ПСБ) у зародышей



Рис. 12.9. Модель функционирования энхансера иммуноглобулинов. *А.* Участок энхансера тяжелой цепи иммуноглобулина включает последовательности между сегментами J-области гена и последовательностями-переключателями (Sμ), предшествующими Cμ. При делеции этого участка транскрипция резко уменьшается. 5′-промотор предшествует каждому сегменту V-области гена и расположен исходно на значительном расстоянии от энхансера. *Б.* VDJ-перестройка гена сближает один из промоторов с энхансером и обеспечивает транскрипцию. *В.* В ходе переключения классов энхансер остается с VDJ-сегментами, когда они помещаются рядом с новой константной областью (Cγ).

лягушки. Было обнаружено, что определенные гены содержат энхансер, который в это время специфично активируется (Krieg, Melton, 1987). Как показано на рис. 10.34, гены, которые активируются на этой переходной стадии, можно клонировать. Криг и Мелтон присоединили первые 500 пар оснований из 5′-фланкирующей области одного из этих генов к β-глобиновому гену *Xenopus*. Обычно после инъекции в оплодотворенные яйца лягушки β-глобиновый ген не транскрибируется вплоть до поздних стадий развития. Если последовательности, лежащие с 5′-стороны от ПСБ-активируемого гена, содержат такой временной энхансер, то можно надеяться, что, начиная со времени перехода к средней бластуле, будет обнаруживаться глобиновая мРНК. Результаты экспериментов по нозерн-блот-гибридизации показали, что это действительно так. Глобиновые транскрипты отсутствовали до перехода к средней бластуле, но их можно было обнаружить после такого перехода. С помощью последовательных делеций была определена локализация этого энхансера средней бластулы – в последовательности длиной 74 пары оснований на расстоянии приблизительно 700 пар оснований с 5′-стороны от обычного промотора.

β-Глобиновый ген человека имеет, по-видимому, свой собственный временной энхансер, лежащий между 600-й и 900-й парами оснований после поли(А)-сайта. Если фрагмент ДНК, содержащий этот участок, помещают около γ-глобинового гена человека, то в то время, когда обычно экспрессируется β-глобиновый ген, может активироваться ген фетального гемоглобина. (Trudel, Constantini, 1987).

Тканеспецифические энхансеры

Помимо энхансеров, описанных в предыдущем разделе, обнаружены также тканеспецифические энхансеры, подобные энхансеру гена тяжелой цепи иммуноглобулина. В поджелудочной железе гены экзокринных белков (химотрипсина, амилазы и трипсина) имеют энхансеры, отличающиеся от энхансеров эндокринного белка инсулина. Энхансеры обоих типов лежат в 5′-фланкирующих последовательностях соответствующих генов. Эти фланкирующие области были помещены на ген бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы – ген, ферментный продукт которого не обнаруживается в клетках млекопитающих (Walker et al., 1983). Затем эти гибридные гены трансфицировали в: а) клетки яичника; б) клеточную линию, секретирующую инсулин; в) линию экзокринных клеток и определяли активность маркерного фермента в клетках каждого из этих типов. Как показано на рис. 12.10, ни одна из энхансерных последовательностей не индуцировала образование фермента в клетках яичника. Однако в клетке, секретирующей инсулин, 5′-фланкирующая область инсулинового гена позволяла экспрессироваться гену хлорамфениколацетилтрансферазы, а 5′-фланкирующая об-

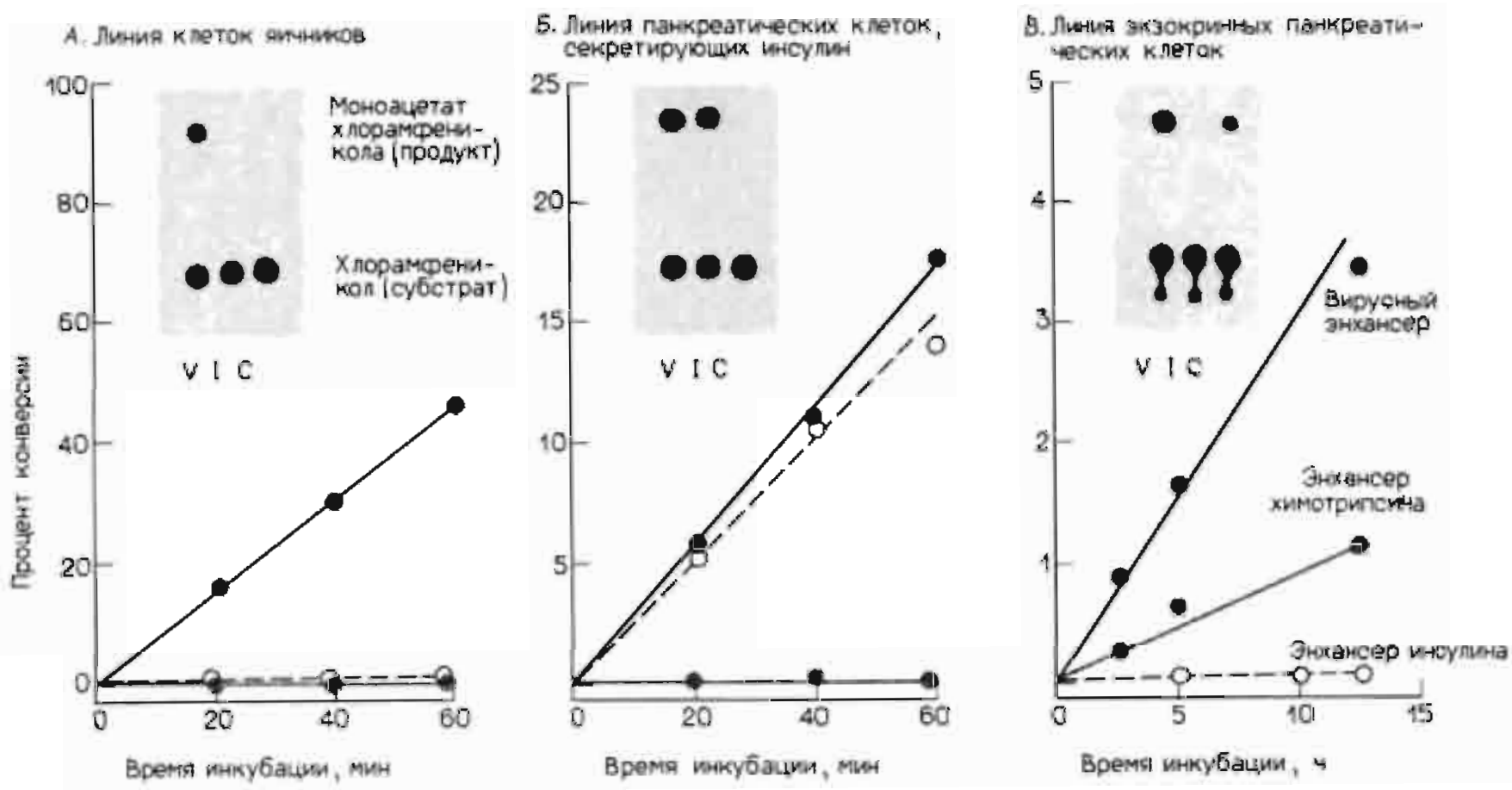


Рис. 12.10. Тканевая специфичность энхансеров генов поджелудочной железы. 5'-фланкирующие участки гена инсулина (I) и гена химотрипсина (C) были встроены по отдельности за геном бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). В качестве положительного контроля за геном CAT был помещен также энхансер вируса саркомы Рауса (V), который функционирует, по-видимому, в клетках всех типов. Три полученных клона были трансфицированы в клетки трех типов, после чего в клеточных лизатах определяли активность CAT. На вставках показаны типичные радиоавтограммы измерений активности CAT с помощью хроматографии, при которой радиоактивный хлорамфеникол (субстрат для реакции, катализируемой CAT) мог быть отделен от моноацетата хлорамфеникола (продукта реакции, катализируемой CAT). (По Walker et al., 1983.)

ласть гена химотрипсина не давала такой возможности. Напротив, когда клоны вводили в линию экзокринных панкреатических клеток, 5'-фланкирующая последовательность для химотрипсина позволяла экспрессироваться гену хлорамфениколацетилтрансферазы, а инсулиновый энхансер не позволял. Таким образом, экспрессия генов в экзокринных и эндокринных клетках поджелудочной железы контролируется, очевидно, различными энхансерами.

Нет ничего необычного в том, что один и тот же белок синтезируется в клетках не одного, а нескольких типов. Это справедливо для желточного белка, который продуцируется у зрелых самок дрозофилы. Два гена этого желточного белка – *yp1* и *yp2* – лежат по соседству, но транскрибируются в противоположных направлениях (рис. 12.11). Оба гена транскрибируются в яичнике и жировых телах. Эти гены могут быть отделены друг от друга с помощью рестриктазы, которая расщепляет их общую 5'-фланкирующую область (Garabedian et al., 1985). Затем каждый из этих генов может быть клонирован отдельно в векторе мобильного Р-элемента, который способен встраиваться в геном яиц дрозофилы.

Прежде чем трансформировать ДНК дрозофилы этими клонами, в гены *yp* были введены дополнительные фрагменты плазмидной ДНК, для того чтобы продукты этих генов можно было отличить от продуктов эндогенных генов. Транскрипты с рекомбинантных клонов, подобно эндогенным мРНК, оказались специфичными в отношении пола (они присутствовали только у самок) и стадии развития (обнаруживались только у взрослых особей). Однако *yp2*-мРНК была обнаружена только в яичнике, а *yp1*-мРНК – только в жировых телах. Исходные гены желточного белка должны, очевидно, иметь на своих 5'-концах два энхансера, один – разрешающий транскрипцию в яичнике и другой – разрешающий транскрипцию в жировых телах. Таким образом, оба гена транскрибируются в норме в клетках обоих типов. Рестриктаза, однако, разрезает ДНК между этими двумя сайтами, оставляя для *yp1* энхансер, специфичный для жирового тела, а для *yp2* энхансер, специфичный для яичника.

Было обнаружено, что энхансер гена *yp1*, специфичный для жирового тела, располагается в сегменте ДНК между 196-й и 321-й парами оснований выше (с 5'-стороны от) кэп-сайта. Это определили с помощью добавления различных фрагментов 5'-

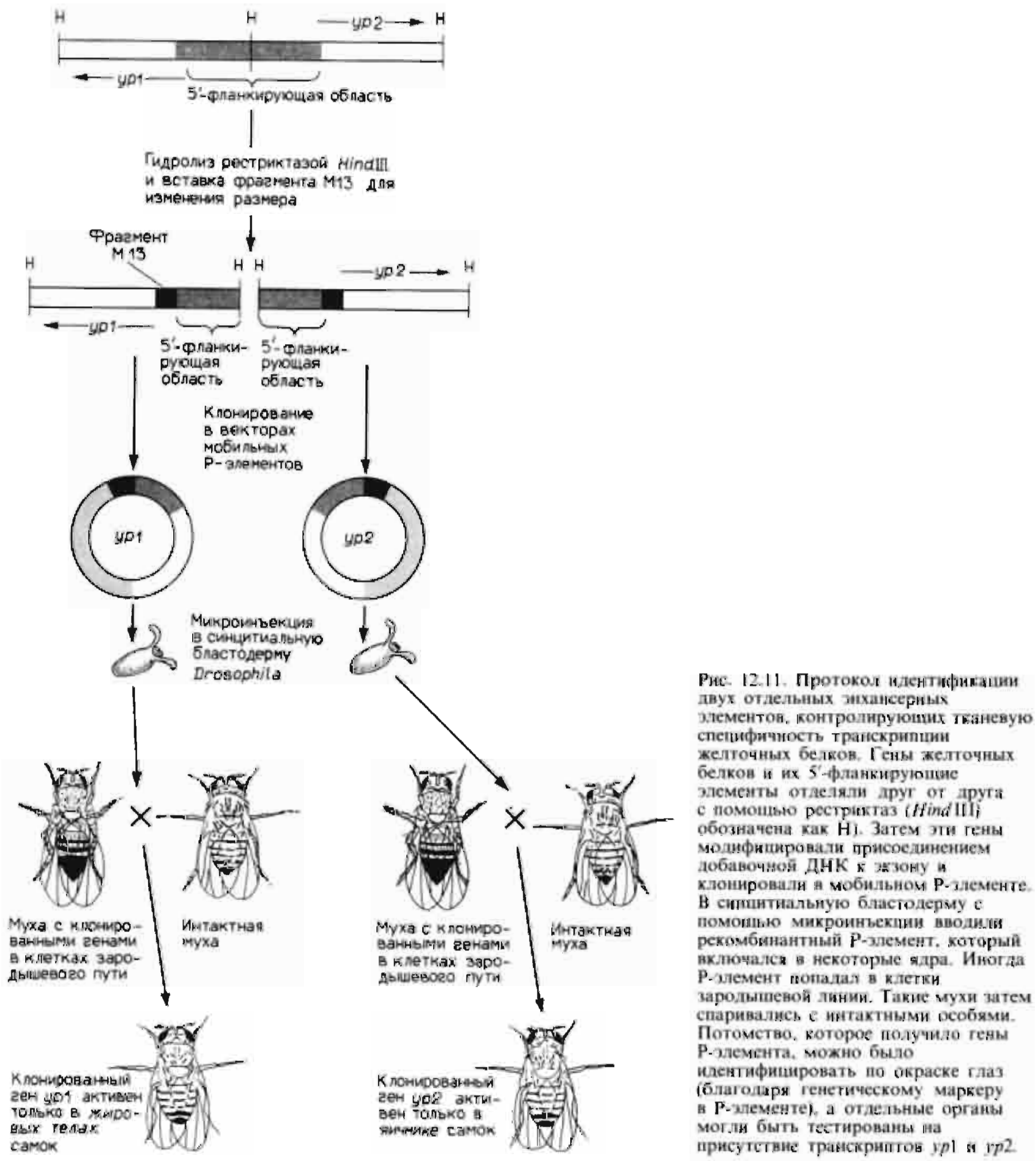


Рис. 12.11. Протокол идентификации двух отдельных энхансерных элементов, контролирующих тканевую специфичность транскрипции желточных белков. Гены желточных белков и их 5'-фланкирующие элементы отделяли друг от друга с помощью рестриктаз (*Hind* III) обозначена как H). Затем эти гены модифицировали присоединением добавочной ДНК к экзону и клонировали в мобильном P-элементе. В синцитиальную бластодерму с помощью микроинъекции вводили рекомбинантный P-элемент, который включался в некоторые ядра. Иногда P-элемент попадал в клетки зародышевой линии. Такие мухи затем спаривались с интактными особями. Потомство, которое получило гены P-элемента, можно было идентифицировать по окраске глаз (благодаря генетическому маркеру в P-элементе), а отдельные органы могли быть тестированы на присутствие транскриптов *yp*1 и *yp*2.

фланкирующей последовательности к гену β-галактозидазы *E. coli*. Полученные гены клонировали в P-элементе, который затем вводили зародышам, как это было описано ранее. Потомство тех зародышей, которые включили P-элемент, окрашивали на β-галактозидазу (Garabedian et al., 1986). Результаты можно видеть на цветной фотографии, помещенной на одной из сторон обложки книги. В жировом теле и яичнике в отсутствие 5'-фланкирующей области β-галактозидаза не выявляется.

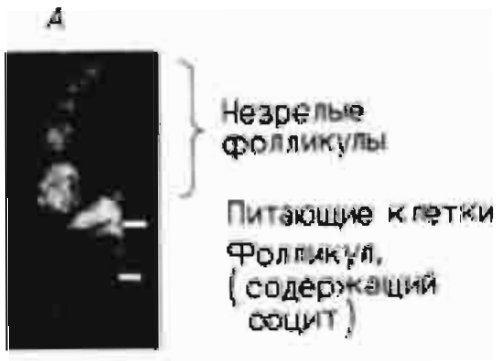


Рис. 12.12. Локализация энхансерных элементов желточных белков. *А*. Экспрессия гена бактериальной β-галактозидазы с присоединенным участком от −44 до −350 с 5′-стороны гена *yp2* в яичниках *Drosophila*. Клетки, экспрессирующие β-галактозидазу, окрашены в темный цвет. *Б*. Схема энхансеров желточных белков у дрозофилы. (Полученные сравнительно недавно данные предполагают также наличие третьего элемента, расположенного между положениями −100 и +1 гена *yp2* и увеличивающего транскрипцию обоих генов.) (Фотография с любезного разрешения P. Wensink.)

Если добавляли целую 5′-фланкирующую область гена *yp1*, то жировые тела, но не яичник, окрашивались в черный цвет (только у самок). Эта специфическая транскрипция сохранялась, когда использовали фрагмент от −321-го до −196-го положения. Следовательно, специфичная для жирового тела транскрипция регулируется участком ДНК, длиной 125 пар оснований, который расположен между −196-м и −321-м положениями. Сходным образом последовательность энхансера, отвечающего за спе-

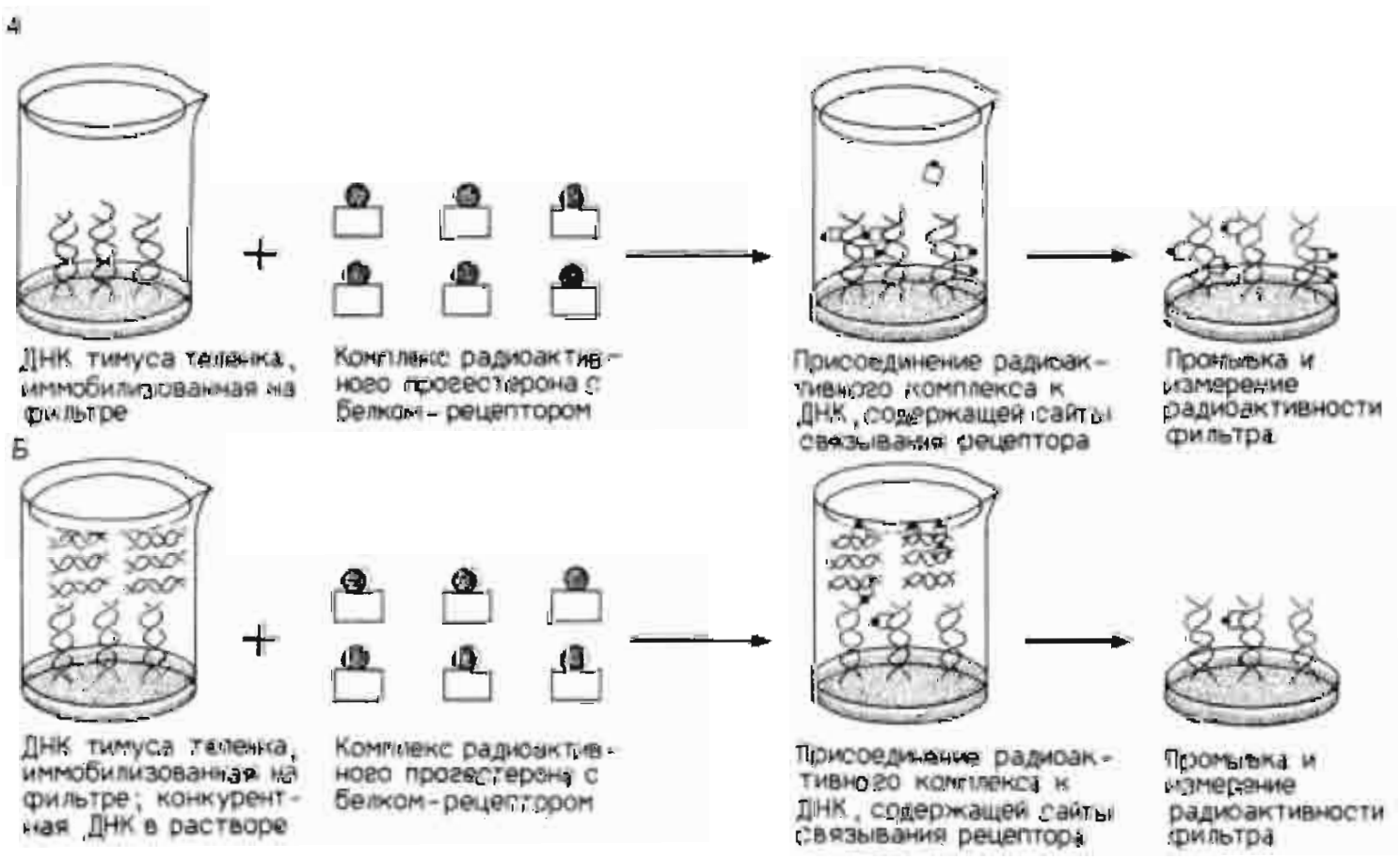


Рис. 12.13. Протокол определения сайта энхансера глюкокортикоидов. Подробности см. в тексте.

цифическую для яичника транскрипцию, была локализована в области 44–350 пар оснований выше гена *yp2* (рис. 12.12).

Энхансеры, реагирующие на гормоны

В ходе развития нередко приходится наблюдать **координированную регуляцию** экспрессии генов. Это явление имеет место, когда в клетках одного типа одновременно синтезируются несколько специфичных для них белков или когда какой-либо гормон индуцирует экспрессию нескольких генов в клетках различного типа. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что по крайней мере в некоторых случаях координированная регуляция генов осуществляется, когда различные структурные гены

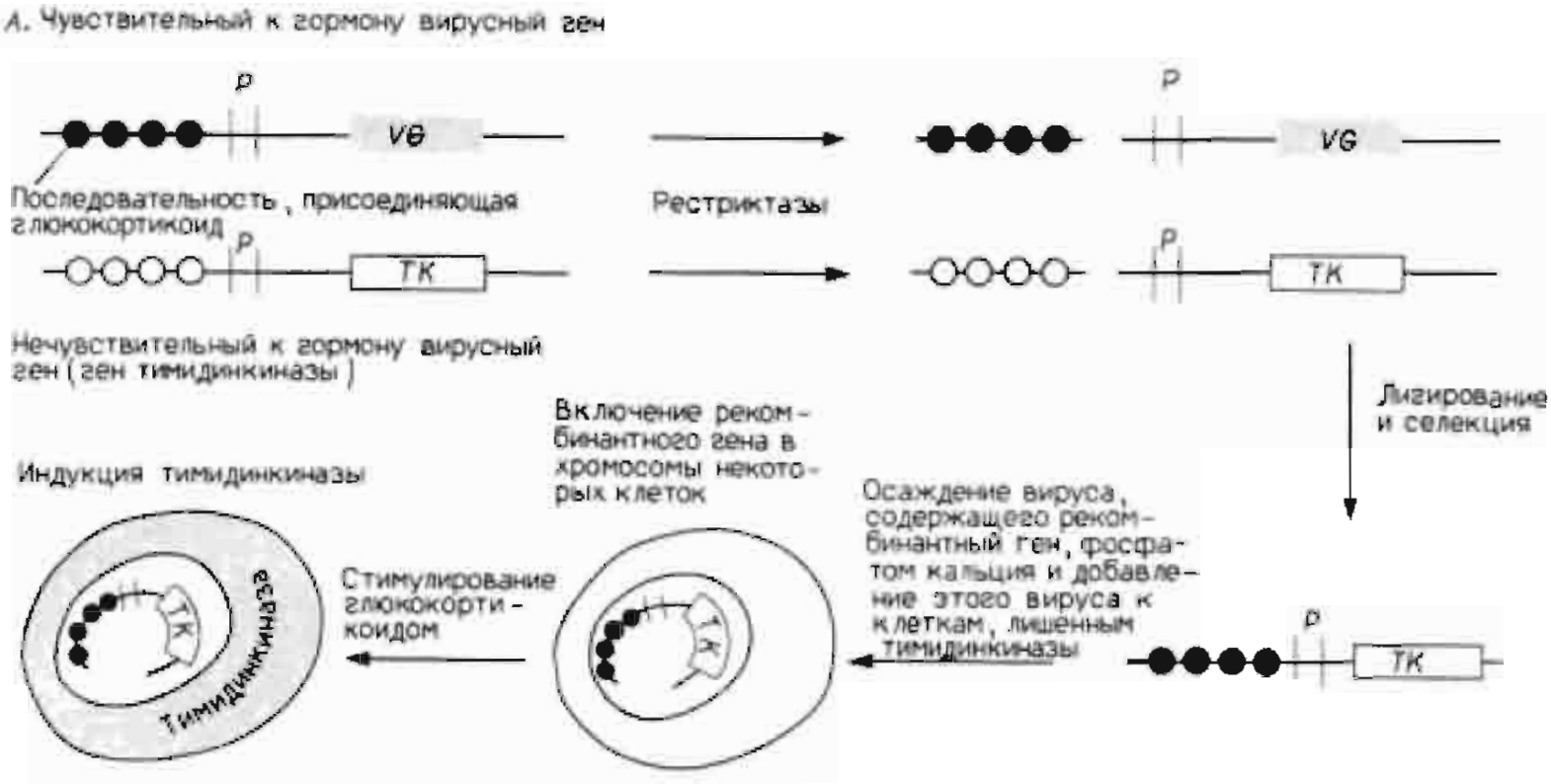


Рис. 12.14. Тест на последовательность энхансера глюкокортикоидов. *А*. Рекомбинантный вирус, содержащий чувствительный к глюкокортикоидам энхансер вируса рака молочной железы мыши и ген тимидинкиназы вируса *Herpes simplex*, может интегрироваться в геном клетки, лишенной гена тимидинкиназы. При обработке глюкокортикоидами рекомбинантный ген транскрибирует вирусную тимидинкиназу. *P* – промотор; *TK* – ген тимидинкиназы; *VG* – ген вируса рака молочной железы мыши. *Б*. Электронная микрофотография энхансерных элементов глюкокортикоидов, показывающая связь рецептора гормона с данным участком гена. (*А* – с изменениями из Chandler, 1983; *Б* – из Payver et al., 1983; фотография с любезного разрешения K. R. Yamamoto.)

присоединены к одинаковым или похожим энхансерам. В поджелудочной железе энхансеры для десяти эндокринных белков имеют консенсусную последовательность из 20 пар оснований. Это позволяет предположить, что похожие последовательности участвуют в активации данных генов в экзокринных клетках поджелудочной железы (Boulet et al., 1986).

Известно, что стероидные гормоны увеличивают транскрипцию многих генов. Полагают, что эти гормоны связываются белковым рецептором, который в такой форме способен специфически присоединяться к определенным последовательностям ДНК (Miesfeld et al., 1986). Одну из групп стероидных гормонов составляют глюкокортикоиды (кортизон, гидрокортизон и синтетический гормон дексаметазон), которые регулируют метаболизм белков и подавляют воспалительные процессы в тканях. Они, по-видимому, функционируют во всех типах клеток. Несколько генов, среди которых гены металлотионеина млекопитающих и некоторые гены опухолеродных вирусов, активируются глюкокортикоидами, поэтому было естественно предположить, что последовательность ДНК, связывающая рецептор с присоединенным гормоном, лежит рядом с этими генами. Один из способов определения глюкокортикоидного энхансера гена заключается в проведении конкурентного связывания, как показано на рис. 12.13. Вначале двухцепочечную ДНК из тимуса теленка (которая, как полагают, имеет много сайтов связывания прогестерона) фиксируют на целлюлозных фильтрах и затем добавляют комплекс радиоактивного глюкокортикоида с рецептором. Этому комплексу позволяют связаться с ДНК и определяют связавшуюся радиоактивность. Затем проводится тот же опыт в присутствии избытка какой-либо другой ДНК в растворе. Если в этой конкурирующей ДНК имеется сайт связывания комплекса глюкокортикоид–рецептор, то она будет конкурировать за радиоактивный комплекс и к ДНК тимуса теленка будет присоединяться меньшее количество радиоактивности (Pfahl, 1982). Использовав различные фрагменты ДНК, полученные с помощью рестриктаз, исследователи постулировали, что последовательность TGTTACAAAATGTTCT способна выполнять роль глюкокортикоидного энхансера (Karin et al., 1984). Было показано, что эти последовательности, связывающие глюкокортикоид, функционируют как энхансеры после их присоединения к генам, активность которых в обычных условиях не зависит от гормона (рис. 12.14; Chandler et al., 1983). В результате эти гены приобретают чувствительность к глюкокортикоиду.

Энхансерные элементы, специфичные к стероидам, очень похожи друг на друга и узнаются близкородственными белками. Каждый стероидный рецептор имеет два функциональных домена: домен, связывающий гормон, и домен прочного связывания ДНК энхансера. Присоединение гормона к первому домену, по-видимому, необходимо для того, чтобы второй домен связался со специфической последовательностью ДНК (Kumar et al., 1986, 1987). ДНК-связывающие домены этих белков очень похожи, но могут различать незначительные изменения в последовательности ДНК. Например, последовательность (палиндромная) 5′-GGTCAGTGTGACC-3′ является сильным эстроген-чувствительным энхансерным элементом, который будет связывать рецептор с присоединенным эстрогеном. Две симметричные мутации в этой последовательности, приводящие к 5′-GGACAGTGTGTCC-3′, будут превращать эту ДНК в глюкокортикоид-чувствительный энхансер (Martinez et al., 1987; Klock et al., 1987). Весьма вероятно, что все стероидные гормоны осуществляют активацию транскрипции по одному общему механизму.

Транскрипция генов легких цепей иммуноглобулинов

Один из наиболее хорошо изученных случаев регуляции генов на уровне транскрипции относится к иммуноглобулиновым генам мыши. За последние пять лет были идентифицированы *цис*- и *транс*-регуляторные элементы, необходимые для специфической транскрипции этих генов в В-клетках.

Делеционное картирование клонированных генов показало, что промотор легкой цепи иммуноглобулина имеет два критических участка – ТАТА-бокс и передний элемент, называемый «окта»-боксом (Bergman et al., 1984; Parslow et al., 1984). Окта-бокс, названный так потому, что состоит из 8 пар оснований, прочитывается как ATTTGCAT. Он был обнаружен во всех изученных промоторах легких цепей иммуноглобулинов и в очень незначительном числе других сайтов. Промоторы генов тяжелых цепей иммуноглобулинов имеют «инвертированный» окта-бокс, ATGCAAAT (рис. 12.15). Если окта-бокс помещают с 5′-стороны от глобинового гена, то транскрипция этого гена в клетке миеломы увеличивается в 11–18 раз. Это увеличение наблюдалось только в лимфоидных клетках и не наблюдалось в фибробластах (Wirth et al., 1987).

Последовательность энхансера генов легких цепей иммуноглобулинов расположена внутри первого интрона между последовательностью VJ и последовательностью константной области (Queen, Baltimore, 1983; Bergman et al., 1984). Если эту последовательность транслировать на клонированные глобиновые гены, то эти гены также приобретают способность специфически транскрибироваться в лимфоцитах (Picard, Schaffner, 1984).

Гены легких цепей мыши

		Окта-бокс		Расстояние от АТГ
	ТГЦЦТАГАЦТГТАТЦТТГЦГ	АТТТГЦАТ	АТТАЦАТТТТЦАГТААЦЦАЦАА	107
K2	ГЦТГТГССТАЦЦЦТТТГЦТГ	АТТТГЦАТ	ГТАЦЦЦАААГЦАТАГЦТТАЦТГ	100
M1738	АТЦЦТААЦТГЦТТЦТТААТГ	АТТТГЦАТ	АТЦЦТЦАЦТАЦАТЦГЦЦТТГГГ	91
M41	АТЦЦТААЦТГЦТЦТЦТТАТА	АТТТГЦАТ	АЦЦЦТЦАЦТГЦАТЦГЦЦТТГГГ	92
M167	——ЦАГЦАЦТГАЦЦААТГГ	АТТТГЦАТ	ААТГЦТЦЦЦТАГГГТЦЦАЦТТЦ	106
T1	ГЦААТААЦТГГТТЦЦЦААТГ	АТТТГЦАТ	ГЦТЦТЦАЦТТЦАЦТГЦЦТТГГГ	97
T2	АГЦААЦАТГААГАЦАГТАТГ	АТТТГЦАТ	ААГТТТТТЦТТТЦТТЦТААТГТ	109
K21C	ААААЦАГТАЦАТАЦТЦЦГЦТТГ	АТТТГЦАТ	АТГААААТААТТТТАТААЦАГЦЦ	93
M11	АЦТТЦЦТТАТТТГАТГАЦТС	АТТТГЦАТ	АГАТЦЦЦТАГАГГЦЦАГЦАЦАГ	73
λ_I	ТАААЦЦТГТАААТГАААГТА	АТТТГЦАТ	ТАЦТАГЦЦЦАГЦЦЦАГЦЦЦАТА	106
λ_{II}	ТАААЦЦТГТАААТГАААГТА	АТТТГЦАТ	ТАЦТАГЦЦЦАГЦЦЦАГЦЦЦАТА	105

Гены легких цепей человека

h101	ГЦЦТГЦЦЦЦАТЦЦЦЦТГЦТЦ	АТТТГЦАТ	ГТТЦЦЦАГАГЦАЦАААЦЦТЦЦТГ	96
h122	ГЦЦТГЦЦЦЦАТЦЦЦЦТГЦТГ	АТТТГЦЦТ	ГТТЦЦТАГАГЦЦАЦАГЦЦЦЦЦТГ	102
h100	ТЦАТТЦТТГЦАТЦТГТТГАА	АТТТТЦАТ	ТТТЦАААААААЦАЦАГЦЦАААЦТ	96

Гены тяжелых цепей

V_H167	ТААТГАТАТАГЦАГАААГАЦ	АТГЦАААТ	ТАГГЦЦАЦЦЦТЦАТЦАЦАТГАА	118
V_H105	ГТААТГЦАЦТГЦТЦАТГААТ	АТГЦАААТ	ЦАЦЦТГГГТЦТАТГГЦАГТААА	114
V_H111	ГТААТГЦАЦТГЦТЦАТГААТ	АТГЦАААТ	ЦАЦГЦААГТЦТТТГГЦАГТААА	108
V_H104	ГААГТАЦЦЦТГЦТЦАТГААТ	АТГААААТ	ТАЦЦЦААГТЦТАТТГТАГТААА	108
V_H108	АААГТЦЦЦЦТГЦТЦАТГААТ	АТГААААТ	ТАЦЦГТТЦТЦТАТГТТГГТТАА	109
V_H101	ТЦТЦТЦАГГААЦЦТЦЦЦЦЦА	АТГААААГ	ЦАГЦЦЦТЦАГГЦАГАГГАТААА	85



Рис. 12.15. Присутствие эволюционно консервативных окта-боксов в промоторах генов иммуноглобулинов. Окта-бокс тяжелых цепей представляет собой инвертированную форму октамера легких цепей (читать А вместо Т, Ц вместо Г и т. д. в обратном направлении). Правая колонка чисел указывает расстояние от конца окта-бокса до начала первого экзона. (Из Parslow et al., 1984.)

При созревании лимфоцитов в ходе перестроек генов происходит сближение энхансеров и промоторов. Количество ядерных транскриптов с перестроенных генов легких цепей (имеющих сближенные промотор и энхансер) более чем в 16 000 раз превышает количество транскриптов с генов, которые не перестроены (Mather, Perry, 1982). При этом энхансер легких цепей иммуноглобулинов стимулирует свои собственные промоторы в 20 раз эффективнее, чем промоторы вируса SV40 или гена металлотионеина. Это наблюдение предполагает синергизм в специфическом взаимодействии между обоими элементами (Garcia et al., 1986). Перестройки сами по себе еще не обеспечивают активацию генов, поскольку перестроенный ген иммуноглобулина не транскрибируется после введения его в фибробласт или в клетку печени. Для начала его транскрипции необходимо присутствие специфических для клетки *транс*-регуляторных факторов.

В 1986 г. были идентифицированы два фактора, связывающиеся с промотором (Staudt et al., 1986). С целью идентификации небольшой фрагмент ДНК, содержащий окта-бокс, инкубировали в ядерных экстрактах из различных клеток. Затем полученные продукты фракционировали в геле. Если ядерный экстракт не содержал белка, связывающегося с этой ДНК, то небольшой фрагмент ДНК быстро двигался через гель. Однако если какой-либо белок *действительно* присоединялся к этой ДНК, то ее миграция через гель затруднялась. Этот опыт по сдвигу подвижности (рис. 12.16) показал, что каждое ядро содержит по крайней мере один фактор, способный присоединяться к данному фрагменту ДНК. Кроме того, клетки В-ряда (пре-В-клетки, В-клетки и плазматические клетки) дополнительно содержат еще один фактор, специфически связывающийся с ДНК окта-бокса. Эти ДНК-связывающие белки были изолированы, и белок, специфический

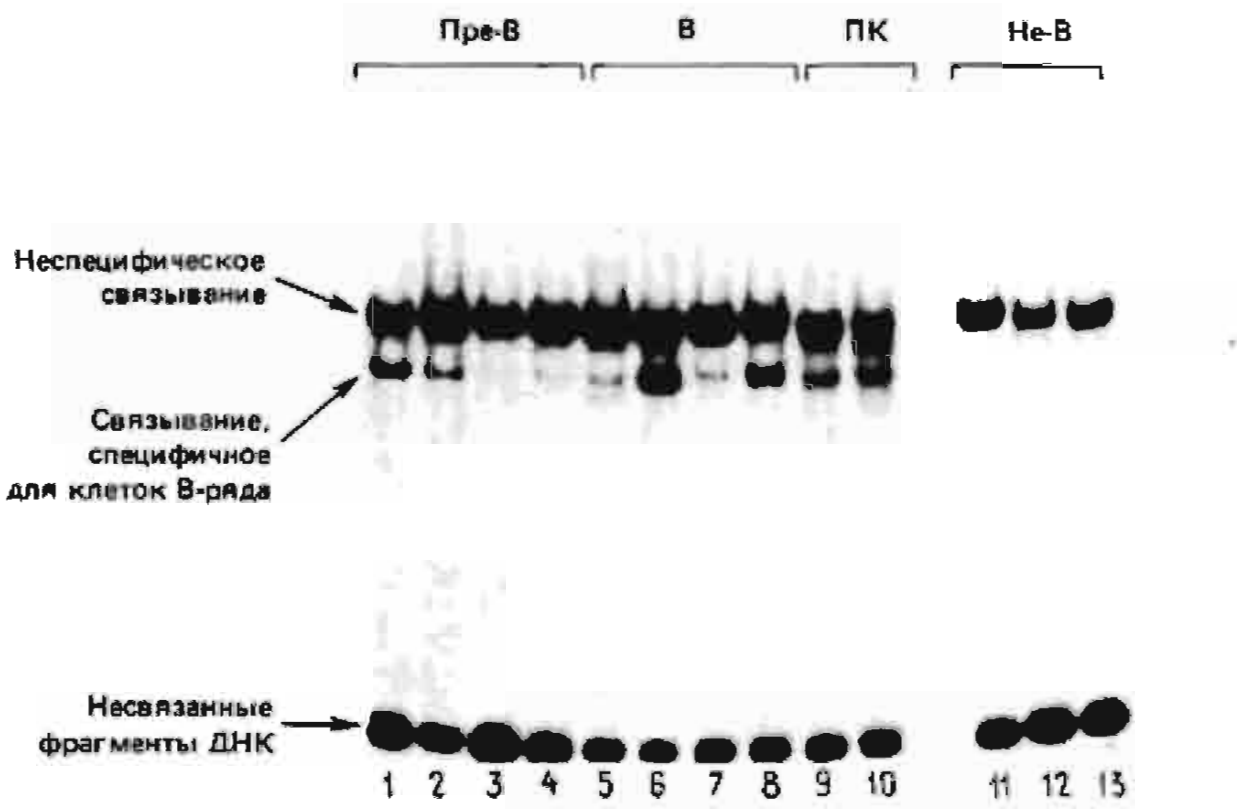


Рис. 12.16. Определение сдвига электрофоретической подвижности. Ядерные экстракты из клеток В-ряда (пре-В, В и плазматические (ПК) клетки) и из клеток, не относящихся к В-ряду (первикальные, фибробласты и клеточные линии предшественников эритроцитов), смешивали с небольшим сегментом ДНК, содержащим октамер. После инкубации смесь фракционировали с помощью электрофореза в геле, переносили на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с радиоактивной ДНК, комплементарной к последовательности октамера. Если фрагменты, содержащие октамер, остаются несвязанными, то они быстро движутся к концу геля. Во всех ядрах имеется белок, связывающийся с октамером неспецифично и существенно замедляющий миграцию. Помимо этого в ядрах из клеток В-ряда содержится другой белок, который затрудняет миграцию из-за присоединения к последовательности октамера. (Из Staudt et al., 1986; фотография с любезного разрешения D. Baltimore.)

для лимфоцитов, был назван NF-A2. Аналогичные методы были использованы для поиска ядерного белка, характерного для клеток В-ряда и специфически связывающегося с энхансерными последовательностями генов легких цепей иммуноглобулинов (Sen, Baltimore, 1986a; Atchinson, Perry, 1987). Этот белок, обозначенный как NF-κB, обнаруживается только в зрелых В-клетках и плазматических клетках, т. е. в единственных известных клетках, синтезирующих иммуноглобулины [1]. Активный NF-κB не обнаружен в клетках какого-либо другого типа (в том числе и в пре-В-клетках), а также в линии плазматических клеток, которые утратили способность синтезировать легкую цепь иммуноглобулинов. Активный белок NF-κB появляется тогда, когда пре-В-клетки индуцируются к образованию В-клеток.

Эти наблюдения поднимают проблему дифференциальной активности генов на другой уровень: что именно контролирует синтез специфических для В-клеток белков – промоторсвязывающего белка NF-A2 и энхансерсвязывающего белка NF-κB? (Иными словами, чтобы объяснить, как осуществляется специфический для клеток синтез иммуноглобулинов, мы должны теперь объяснить, как эти два ядерных белка синтезируются специфическим для клеток образом.) Оказалось, что белок NF-κB в неактивной форме содержится в клетках многих типов, но модифицироваться в активную форму он может только в В-клетках. Когда пре-В-клетки искусственно стимулируются к образованию В-клеток, активный NF-κB появляется даже в отсутствие белкового синтеза (Sen, Baltimore, 1986b). Природа модификации этого белка остается неизвестной.

Анализ специфической для клеток транскрипции генов легких цепей иммуноглобулинов вышел в итоге за уровень исследования продуктов терминальной дифференцировки клеток. Мы знаем, что транскрипция этого иммуноглобулинового гена зависит от исходной активности двух ядерных белков, NF-A2 и NF-κB, которая наблюдается только в клетках В-ряда. Остается выяснить, каким образом вызывается дифференциальная экспрессия этих двух генов в развивающемся лимфоците.

Исследование иммуноглобулинового энхансера дало объяснение и другим биологическим явлениям. Ниже (т. 3, гл. 20) мы обсудим вопрос о том, что

[1] В пре-В-клетке синтезируется только тяжелая цепь иммуноглобулинов и не синтезируется легкая. Вызывает удивление присутствие неспецифического белка, связывающегося с окта-боксом, в клетках, не относящихся к В-ряду. Оказалось, что ген гистона H2B имеет в своем энхансере окта-бокс, и присоединение неспецифического белка, связывающегося с окта-боксом, определяет время его экспрессии, благодаря чему этот ген транскрибируется в течение S-фазы клеточного цикла (Roeder, 1987; Fletcher et al., 1987).

лимфоцитарные опухоли возникают, когда обычный ген фактора роста переносится в область иммуноглобулинового энхансера, благодаря чему ген фактора роста транскрибируется по времени и по количеству как антитела. Кроме того, быстрое размножение вируса СПИДа, HIV-1, объясняется тем, что он имеет энхансер, очень похожий на энхансер легких цепей иммуноглобулинов. Когда этот вирус инфицирует Т-лимфоцит, он способен индуцировать образование активного NF-κB (Sen, Baltimore, 1986b).

Дополнительные сведения и гипотезы

Модульные гены

В 1978 г. Уолтер Гилберт предложил радикальную гипотезу для объяснения существования интронов. Он предположил, что эукариотический геном состоит из модульных единиц, что позволяет «смешивать и сочетать» части. Экзоны кодируют функциональные домены белков и могут сортироваться в ходе эволюции независимо. В 1979 г. начали появляться первые данные в пользу этой гипотезы. Структура тяжелой γ-цепи иммуноглобулина состоит из пяти доменов, каждый из которых имеет специфическую функцию. Домен CH3 участвует во взаимодействиях поверхностей клеток, домен CH2 присоединяет молекулы комплемента, шарнирный домен позволяет изгибаться антигенсвязывающим сайтам, домен CH1 присоединяется к легкой цепи, а домен вариабельной области формирует антигенсвязывающий сайт. Каждый из этих доменов кодируется отдельным экзоном (рис. 12.17) (Sakano et al., 1979). Функциональные домены ряда белков, в том числе глобинов, кристаллинов хрусталика и белков клеточного узнавания большого комплекса тканевой совместимости, также отражают расположение своих экзонов (Inana et al., 1983; Gilbert, 1985).

Рецептор липопротеина низкой плотности (ЛНП) предоставил первое свидетельство **перемешивания экзонов**, которое предполагает, что экзоны могут дуплицироваться в одном гене и затем рекрутироваться для использования в другом гене. Ген этого белка был секвенирован (что оказалось непростым делом, так как он содержит 18 экзонов), и было проведено сравнение его последовательности с другими генами и с функциональными доменами ЛНП-рецептора (Südhof et al., 1985). Оказалось, что участок из 400 аминокислот в ЛНП-рецепторе кодируется восемью соседними экзонами, которые очень похожи на восемь экзонов гена фактора роста эпидермиса. В этом же гене был обнаружен еще один домен ЛНП-рецептора размером в 40 аминокислот. Помимо этого ген ЛНП-рецептора содержит серию экзонов, общих с геном белка C9 комплемента (рис. 12.18). Таким образом, ген ЛНП-рецептора оказывается мозаикой из экзонов, полученных из нескольких различных источников.

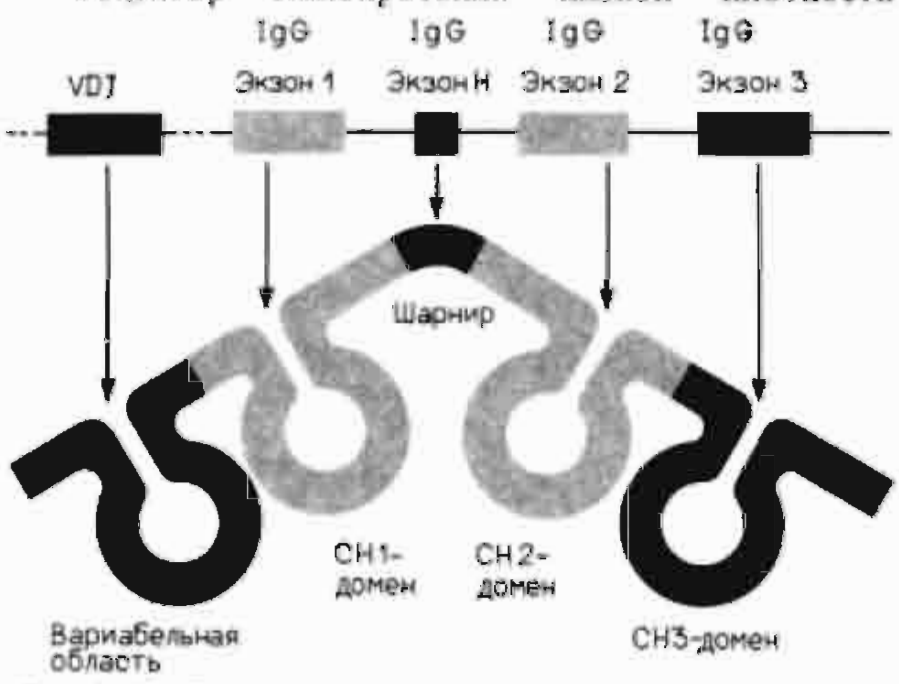


Рис. 12.17. Соотношение между экзонами гена и доменами глобулярного белка для тяжелой цепи IgG. Каждый домен белка кодируется отдельным экзоном. (Данные из Sakano et al., 1979.)

Если экзоны могут быть перемещены в новые гены, не могут ли быть перемещены также и энхансеры? Вопрос этот крайне важен, поскольку многие эволюционные события можно было бы объяснить изменением времени или места экспрессии генов. Эта гипотеза проверялась на гавайских видах дрозофилы (Rabinow, Dickinson, 1986). Видообразование у этих мух идет с исключительно высокой скоростью, и несколько видов обнаруживают различия в тканевой специфичности экспрессии генов. Например, у личинки *D. hawaiiensis* ген алкогольдегидрогеназы (АДГ) экспрессируется в жировых телах и каркасе, тогда как у личинки *D. formella* ген алкогольдегидрогеназы экспрессируется только в жировых телах. Оба фермента можно различить с помощью электрофореза. Эти виды можно спарить друг с другом и получить гибридные личинки. Когда были исследованы жировые тела этих личинок, в них были обнаружены оба фермента АДГ – специфичный для *D. hawaiiensis* и специфичный для *D. formella*. Однако при анализе каркаса был обнаружен белок только из *D. hawaiiensis*. Такое распределение можно ожидать, если гены АДГ контролируются *цис*-регуляторными элементами, которые различаются у этих двух близкородственных видов. (Если бы эк-

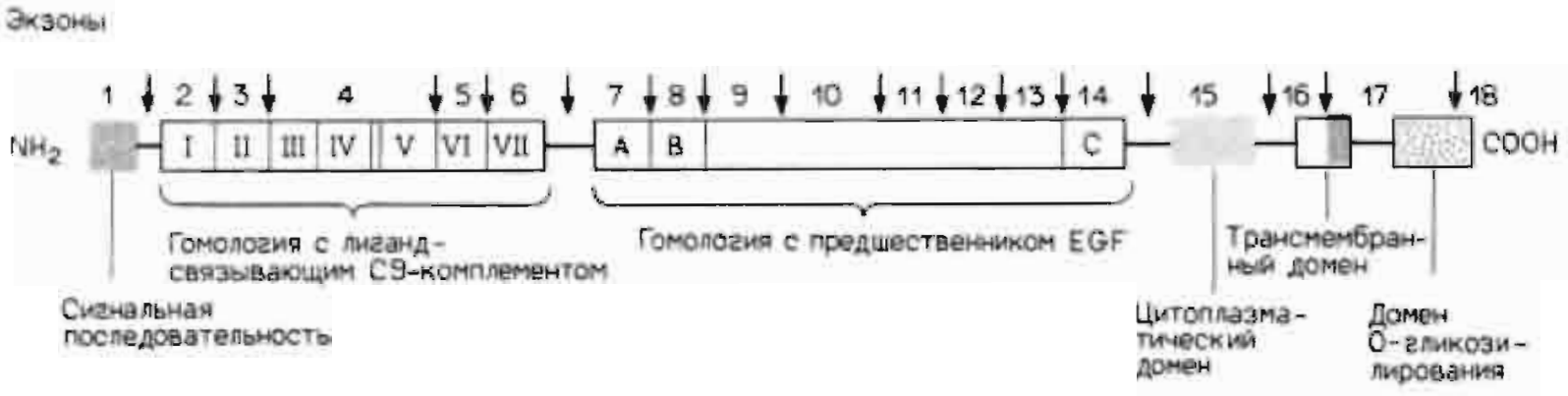


Рис. 12.18. Модульная структура доменов рецептора ЛНП. Шесть доменов белка показаны в виде прямоугольников, кодирующие их экзоны обозначены цифрами между стрелками над картой белка. Области, гомологичные другим группам экзонов, указаны под картой. (Из Südhof et al., 1985.)

прессия определялась *транс*-регуляторными элементами, то оба гена были бы либо включены, либо выключены.) Это наблюдение свидетельствует о том, что энхансеры могут меняться в ходе эволюции, благодаря чему в различных тканях будут синтезироваться различные продукты.

Метилирование ДНК

Нередко полагают, что ген состоит из одних и тех же нуклеотидов, когда он активен и когда он неактивен. Ген β-цепи глобина в предшественнике эритроцитов должен иметь те же нуклеотиды, что и ген β-цепи глобина в фибробласте того же организма. В 1948 г. в ДНК было открыто «пятое основание» – 5-метилцитозин (Hotchkiss, 1948). Это основание образуется ферментативным путем после репликации ДНК, и около 5% цитозинов в ДНК млекопитающих переводится в 5-метилцитозин. Эта конверсия может происходить только в том случае, когда за цитидиновым остатком следует гуанозин (ЦфГ). Недавние исследования показали, что степень метилирования цитозинов в гене может контролировать его транскрипцию. Другими словами, **метилирование ДНК** может менять структуру гена и благодаря этому регулировать его активность.

Первые данные о том, что метилирование ДНК помогает регулировать активность генов, были получены в исследованиях, показавших корреляцию между активностью гена и его неметилированием (гипометилированием), особенно в области промотора гена. В развивающихся эритроцитах человека и курицы ДНК, участвующая в синтезе глобинов, полностью или почти полностью неметилирована, тогда как те же гены в клетках, которые не синтезируют глобины, метилированы в высокой степени (рис. 12.19, *А*). Клетки печени плода, которые синтезируют гемоглобин на ранних стадиях развития, имеют неметилированные гены для фетального гемоглобина. Эти гены становятся метилированными в тканях взрослого организма (van der Ploeg, Flavell, 1980; Groudine, Weintraub, 1981).

Специфическое для органа метилирование наблюдается также в гене овальбумина курицы; этот ген не метилирован в клетках яйцевода, но метилирован в других тканях курицы (Mandel, Chambon, 1979). Деметилирование сопровождает переключение классов при синтезе иммуноглобулинов (Rogers, Wall, 1981) и коррелирует со способностью грызунов продуцировать металлсвязывающий белок металлотионеин I (Compere, Palmiter, 1981). Таким образом, отсутствие метилирования ДНК хорошо коррелирует с тканеспецифической экспрессией определенных генов.

Вторая группа данных, свидетельствующих о том, что метилирование ДНК является регуляторным процессом, получена в опытах, где экспрессию клонированных генов изменяли с помощью введения или удаления метильных групп из остатков цитозина. Один из таких опытов еще раз подтвердил, что гипометилирование необходимо для транскрипции β-глобинового гена человека (Busslinger et al., 1983). Когда глобиновые гены клонировали и добавили к клеткам с помощью переосаждения с фосфатом кальция, клетки захватывали ДНК и нередко включали эту ДНК в ядра. В таких случаях клонированный глобиновый ген транскрибировался. С помощью защиты от метилирования определенных участков клонированных генов перед их добавлением к клеткам можно получить клоны, в которых глобиновые гены имеют идентичные последовательности, но разный характер метилирования (рис. 12.19, *Б*). Полностью неметилированный ген транскрибировался, тогда как полностью метилированный ген (метильная группа на каждом подходящем остатке Ц) не транскрибировался. С использованием частично метилированных клонов было показано, что метилирование в 5'-области глобинового гена (нуклеотиды от −760 до +100) предотвращает транскрипцию. Таким образом, метилирова-

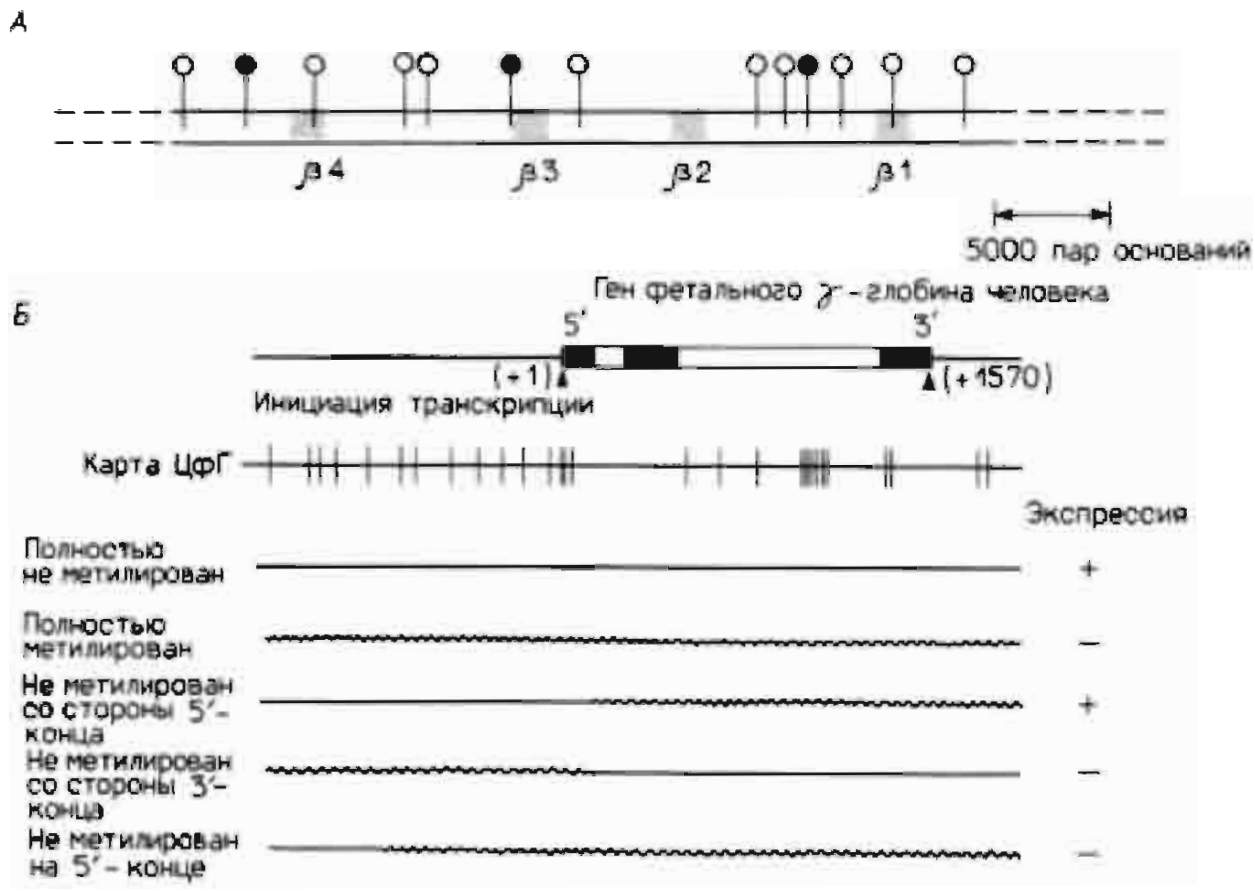


Рис. 12.19. Схема метилирования глобиновых генов. *А*. Метилирование β-цепей глобина кролика (β1, β2, β3, β4). Каждый ген этого кластера представлен серым квадратом. Последовательности ЦГГ обозначены кружками, причем черными кружками обозначены те из них, которые полностью метилированы только в клетках, не транскрибирующих глобины. *Б*. Метилирование контролирует транскрипцию клонированного гена фетального γ-глобина человека. На верхней диаграмме показаны клонированный глобиновый ген и его 5'- и 3'-фланкирующие области. Экзоны обозначены черным цветом, интроны – белым, фланкирующие области – тонкими линиями. Под диаграммой представлена карта возможных сайтов метилирования ДНК, которые представляют собой участки, где присутствует динуклеотид ЦфГ. Под этой картой приведены схемы метилирования пяти клонов, которые были изучены в данной работе. Прямыми линиями изображены неметилированные сегменты, волнистыми – метилированные. Знаки + и – с правой стороны рисунка указывают на то, экспрессировались или не экспрессировались данные сегменты. (*А* – по Shen, Maniatis, 1980; *Б* – по Busslinger et al., 1983.)

ние на 5'-конце гена играет, по-видимому, главную роль в регуляции экспрессии генов.

Третья группа данных получена в экспериментах, в которых изначально неактивные гены активировались при их деметилировании непосредственно внутри ядер. Была получена корреляция между активацией молчащих генов и утратой метильных групп из их цитозинов. Из гл. 10 мы узнали, что неактивные гены, специфичные для печени, могут быть активированы в фибробластах мыши после слияния этих фибробластов с клетками печени. Эта активация сопровождается деметилированием генов, специфических для печени особенно в их 5'-областях (Sellem et al., 1985). Когда 5'-области этих генов деметилированы, они похожи на активные гены, специфические для печени, и активно транскрибируют РНК.

Другой метод деметилирования генов заключается в обработке клеток препаратом **5-азацитидином**. Полагают, что это соединение ингибирует метилтрансферазу, что приводит к деметилированию той ДНК, которая обычно является метилированной (Razin et al., 1984). Когда 5-азацитидин добавляли к колониям мышиных фибробластов C3H10T1/2, эти клетки с высокой частотой превращались в миоциты, адипоциты или хондроциты (Taylor, Jones, 1982; Konieczny, Emerson, 1984). Полученные фенотипы были стабильны, на основании чего можно предположить, что характер метилирования передается через многие циклы клеточных делений. Было показано, что ДНК из миобластов, полученных из обработанных 5-азацитидином клеток C3H10T1/2, способна превращать другие клетки C3H10T1/2 в миобласты, тогда как ДНК из необработанных клеток C3H10T1/2 не обладает этой способностью (Lassar et al., 1986).

Четвертая группа данных, свидетельствующих о регуляции транскрипции с помощью метилирования ДНК, получена в исследованиях инактивации Х-хромосомы у млекопитающих. В этом случае метилирование ДНК играет главную роль в поддержании неактивного состояния одной из двух Х-хромосом в каждой клетке. Предположение о существовании определенных различий в ДНК хромосом впервые возникло на основе данных, полученных в опытах по трансфекции гена гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (ГФРТ), связанного с Х-хромосомой, в мышиные клетки фенотипа ГФРТ$^-$ (Liskay, Evans, 1980). Когда использовали клон клеток, в которых ген находился на *неактивной* Х-хромосоме, получен-

ная ДНК была неспособна вызвать синтез фермента в клетке-хозяине ГФРТ⁻. Когда ДНК получали из клона клеток, имеющих ген ГФРТ на *активной* Х-хромосоме, в трансформированных клетках фермент синтезировался.

Годом позже было получено еще одно подтверждение того, что метилирование играет в инактивации Х-хромосомы определенную роль; тогда было обнаружено, что 5-азацитидин локально реактивирует гены на неактивной Х-хромосоме. Группа исследователей сконструировала гибридные клетки, в которых были активная Х-хромосома *мыши* и неактивная Х-хромосома *человека* (Mohandas et al., 1981). После обработки 5-азацитидином были обнаружены клоны клеток, которые синтезировали фермент ГФРТ с Х-хромосомы человека.

И наконец, оказалось, что некоторые конститутивные ферменты, кодируемые Х-хромосомой (т.е. те ферменты, которые должны присутствовать в каждой клетке, а не только в специализированных), имеют на 5′-концах своих генов кластеры из ЦГ-богатых участков. В активной Х-хромосоме по крайней мере у трех генов 5′-кластеры гипометилированы, тогда как эти же кластеры в аналогичных генах на неактивной Х-хромосоме интенсивно метилированы (Wolf et al., 1982; 1984; Keith et al., 1986). Сходным образом группы ЦфГ на 3′-концах генов более метилированы в неактивной Х-хромосоме, чем в активной. Когда Х-хромосома реактивируется (естественным образом, как в ворсинках хориона или в опыте с 5-азацитидином), эти кластеры становятся гипометилированными[1] (Wolf et al., 1984). Помимо этого, когда клетки тератокарциномы дифференцируются и одна из Х-хромосом инактивируется, ЦфГ-кластеры на этих генах становятся метилированными (Lock et al., 1987). Хотя инициатор инактивации Х-хромосомы до сих пор неизвестен, весьма вероятно, что метилирование ДНК поддерживает неактивное состояние Х-хромосомы и передает его от одного поколения клеток к другому (Kaslow, Migeon, 1987).



Рис. 12.20. Модель передачи характера метилирования дочерним молекулам. В ходе репликации исходный тип метилирования сохраняется лишь в одной из двух цепей ДНК (в «старой»). Другая цепь («новая») не метилирована. Фермент метилирования, специфичный к ЦГ, может присоединяться к тем ЦГ-парам, где остаток Ц метилирован, и затем метилировать остаток Ц на комплементарной цепи. (По Browder, 1984.)

Если предложенная гипотеза о деметилировании справедлива, то распределение метилированных и деметилированных цитозинов должно устойчиво наследоваться на протяжении многих клеточных делений и «стираться» в половых клетках. Так в действительности и происходит. Установленный в клетках специфический характер метилирования стабилен на протяжении более 100 клеточных делений (Wigler et al., 1981; Stein et al., 1982). Предложен механизм для передачи этого распределения (Stein et al., 1982). Когда исследователи трансфицировали клетку гемиметилированной ДНК (т.е. ДНК, в которой только одна цепь метилирована), то метилирование ЦГ было обнаружено у всего клонального потомства этой клетки после многих клеточных делений. Предположили, что ЦГ-специфический метилирующий фермент использует метилированные цитидины как матрицу для метилирования цитидинов на компле-

[1] Бóльшая часть изученных к настоящему времени генов, зависимых от РНК-полимеразы II, являются генами, продукты которых (например, гемоглобин, овальбумин и коллаген) характеризуют клетку определенного типа. Это вызвано тем, что такие гены производят необычно большое количество конкретных мРНК, которые могут быть легко изолированы и затем использованы как зонды для клонированных генов. Эти гены регулируются в развитии так, что их экспрессия происходит в специфических типах клеток в определенные периоды времени. Те гены, которые не регулируются в развитии (их продукты присутствуют в большинстве клеток на всех стадиях), могут контролироваться другим образом и иметь другую структуру. Для таких генов не нужны последовательности ТАТА или ЦААТ (Melton et al., 1986; Reynolds et al., 1984). Они, по-видимому, должны иметь кластеры ЦфГ вблизи 5′-концов. Эти кластеры обычно гипометилированы и находятся в участках, гиперчувствительных к ДНКазе I (Wolf, Migeon, 1984).

ментарной цепи (рис. 12.20). Это объясняет также, почему за метилированными цитидинами всегда следуют гуанозины.

В развивающихся спермиях не наблюдается ни одно из распределений гипометилирования, характерных для соматических клеток. Все специфические для клеток гены (глобинов, овальбумина, иммуноглобулинов и т. д.) являются высокометилированными. Бо́льшая часть гипометилированных сайтов, обнаруженных до сих пор в сперматогониях (предшественниках спермиев), оказываются метилированными в зрелых спермиях. По разнице в метилировании генов спермия и яйца можно определить, получен ли ген от отца или от матери. Если ядра первичных половых клеток и у самцов, и у самок резко гипометилированы (Monk et al., 1987), то гены спермия и яйца интенсивно метилированы. Кроме того, характер метилирования данного гена в яйце и спермии может различаться (Reik et al., 1987; Sapienza et al., 1987). Этот материнский и отцовский **импринтинг** добавляет информацию к наследуемым геномам – информацию, которая может регулировать активность генов и поведение хромосом в пространстве и во времени. В эксперименте была получена линия трансгенных мышей, у которых в геном был встроен ген, индуцирующий образование опухоли (этот процесс будет рассмотрен в гл. 20) (Swain et al., 1987). Если этот ген был унаследован от самца, то он транскрибировался исключительно в сердце, но ни в какой другой ткани. В случае если этот ген наследовался от самки, он не экспрессировался вовсе. Этот характер экспрессии коррелировал со степенью метилирования. Рассматриваемый ген метилировался в ходе созревания яйца и деметилировался при образовании спермия. Такая специфичная для гамет разница в метилировании дает правдоподобное объяснение неспособности к развитию партеногенетических млекопитающих и необходимости присутствия в зиготе обоих пронуклеусов – отцовского и материнского.

Очевидно, что метилирование является важным механизмом регуляции активности генов, но оно не может применяться для всех генов. По-видимому, этот процесс широко распространен среди позвоночных, но даже у них некоторые гены сохраняют способность к транскрипции, хотя и являются метилированными (Gerber-Huber et al., 1983). Кроме того, метилирования ДНК не происходит, очевидно, у дрозофилы, где тканеспецифическая транскрипция генов хорошо документирована.

Дополнительные сведения и гипотезы

Определение сайтов метилирования

Когда происходит метилирование ДНК, оно практически всегда идет по цитидину из ЦфГ-пары. Распределение этих метилированных и неметилированных ЦГ-дуплетов определяется с помощью разрезания ДНК двумя рестриктазами, *Hpa*II и *Msp*I (McGhee, Ginder, 1979). Оба этих фермента разрезают в одном сайте, ЦЦГГ, но *Hpa*II не будет разрезать ДНК, если метилирован центральный Ц, тогда как *Msp*I будет разрезать эту последовательность независимо от того, метилирована она или нет. Следовательно, ДНК из клеток определенного типа может быть гидролизована *Hpa*II и отдельно *Msp*I; затем фрагменты расщепленной ДНК могут быть разделены с помощью электрофореза в геле, перенесены на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизованы с радиоактивным зондом, специфичным для исследуемого гена. Разницу в распределении зон на радиоавтографах для фрагментов, полученных с *Msp*I и с *Hpa*II, можно объяснить разницей в метилировании.

На рис. 12.21 показан результат одного из экспериментов с выделением ДНК спермиев и ее обработкой *Hpa*II и *Msp*I. Зондом являлась радиоактивная ДНК из второго экзона β-глобинового гена. Радиоавтограф фрагментов *Msp*I-гидролизата

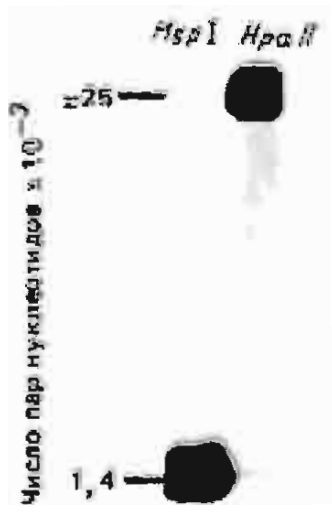


Рис. 12.21. Обнаружение сайтов метилирования в ДНК. ДНК выделяли из спермы петуха и гидролизовали рестриктазой *Msp*I (дорожка 1) или *Hpa*II (дорожка 2). Фрагменты разделяли с помощью электрофореза, переносили на фильтр и гибридизовали с радиоактивным ДНК-зондом из второго экзона β-глобинового гена. Этот зонд связывался с фрагментом длиной 1400 нуклеотидов в *Msp*I-гидролизате и с фрагментом длиной примерно 25000 нуклеотидов в *Hpa*II-гидролизате. (Из Groudine, Conkin, 1985; фотография с любезного разрешения M. Groudine.)

показывает, что этот зонд присоединяется к фрагментам ДНК, у которой ЦЦГГ-сайты лежат друг от друга на расстоянии 1400 пар оснований. Радиоавтограф с *Hpa*II-гидролизатом показывает, что в ДНК спермиев эти сайты метилированы и что исследуемая последовательность ДНК лежит на отрезке ДНК длиной 25 000 пар оснований, на котором все ЦЦГГ-сайты метилированы (Groudine, Conklin, 1985).

ХРОМАТИН ЭУКАРИОТ

Нуклеосомы

До сих пор при рассмотрении транскрипции мРНК мы ограничивались структурой самих генов. Но внутри ядра гены не существуют в «голом» виде, легко доступные для РНК-полимеразы или какого-либо другого белка, связывающегося с энхансером или промотором. Напротив, эукариотические хромосомы содержат столько же белка (по массе), сколько нуклеиновой кислоты, и этот ДНК-белковый комплекс называют **хроматином**. Доминирующими белками хроматина являются **гистоны**. Эти пять белков – H1, H2A, H2B, H3 и H4 – представляют собой сильноосновные полипептиды с высоким содержанием положительно заряженных аминокислот лизина и аргинина. Другой гистон, H5, обнаружен в клетках немногих типов (а именно в эритроцитах птиц и амфибий), в которых ДНК упакована предельно плотно. В этих клетках H5 заменяет H1.

Пять перечисленных главных гистонов имеются у всех представителей царств животных, растений и простейших и в ходе эволюции изменились очень мало. Обычно такой консерватизм означает, что белки должны играть исключительно важную роль во всех изученных клетках. Ключевая функция гистонов заключается в упаковке ДНК в специфические спиральные структуры, называемые **нуклеосомами**. Нуклеосома – это основная единица структуры хроматина; она состоит из гистонового октамера $(H2A, H2B, H3, H4)_2$, вокруг которого намотано два витка ДНК, составляющих примерно 140 пар оснований (рис. 12.22). Между нуклеосомами лежат другие 60 (или около того) пар оснований ДНК; эти «линкерные» нуклеотиды могут быть покрыты гистоном H1. Такая структура предполагается на основе опытов по расщеплению хроматина, когда он подвергается гидролизу небольшими количествами дезоксирибонуклеазы (ДНКазы) из определенных бактерий (*Micrococcus*). Эта обработка приводит к расщеплению ДНК по некоторым сайтам, и полученные фрагменты хроматина могут быть отделены друг от друга с помощью центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (рис. 12.23). Когда ДНК экстрагируют из обработанного хроматина и разделяют в гелях, получается четкая картина. Вместо кусков случайного размера ДНК предстает расщепленной на фрагменты, кратные по длине 200

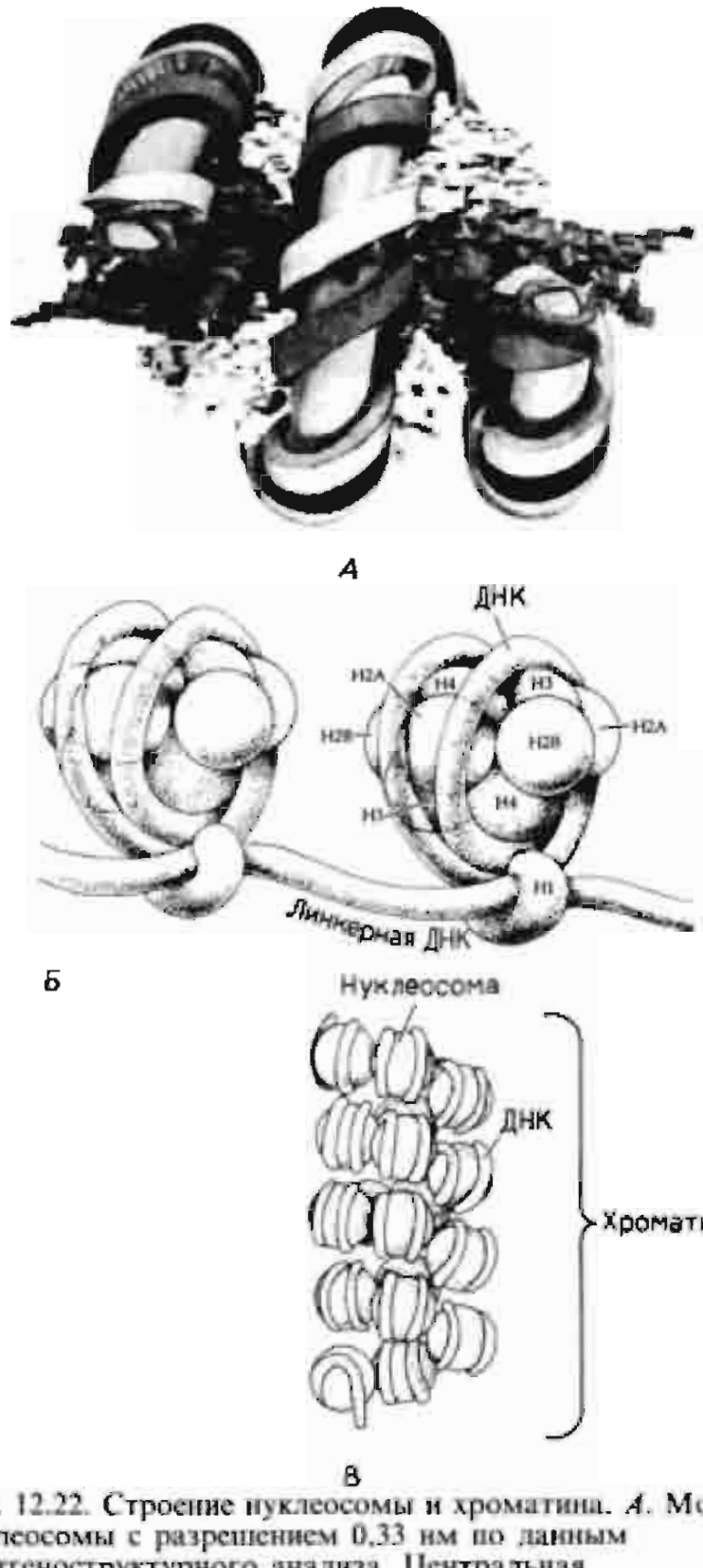


Рис. 12.22. Строение нуклеосомы и хроматина. *А*. Модель нуклеосомы с разрешением 0,33 нм по данным рентгеноструктурного анализа. Центральная двояковогнутая белковая единица (белая) представляет собой тетрамер H3–H4. Каждая из темных яйцевидных структур по бокам от тетрамера является димером H2A–H2B. Модель построена для хроматина из эритроцитов курицы. *Б*. Модель нуклеосомы. Приблизительно 140 пар оснований ДНК накручены на октамер гистонов (включающий гистоны H2A, H2B, H3 и H4), и около 60 пар оснований связывают нуклеосомы друг с другом. *В*. Модель укладки нуклеосом в компактную, напоминающую соленоид структуру хроматина. (*А* – из Burlingame et al., 1985; *В* – по Stewart, Hunt, 1982.)

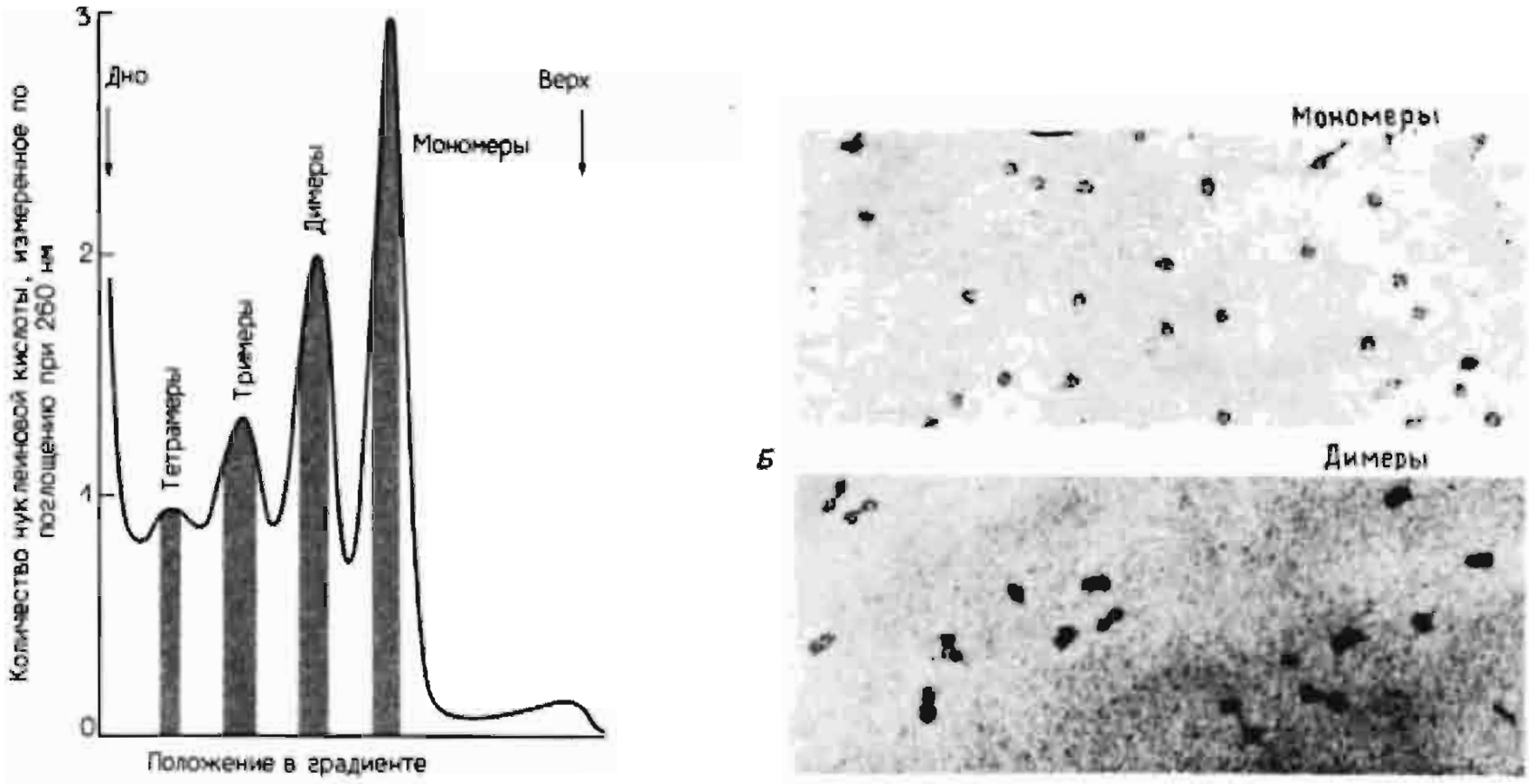


Рис. 12.23. Характеристика мультимеров нуклеосом. *А*. Разделение дискретных групп частиц, полученных после обработки микрококковой нуклеазой хроматина из печени крысы при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. *Б*. Электронные микрофотографии частиц из фракций, соответствующих четырем пикам в градиенте сахарозы; видны мономеры, димеры, тримеры и тетрамеры нуклеосом. *В*. Из фракций, соответствующих каждому пику

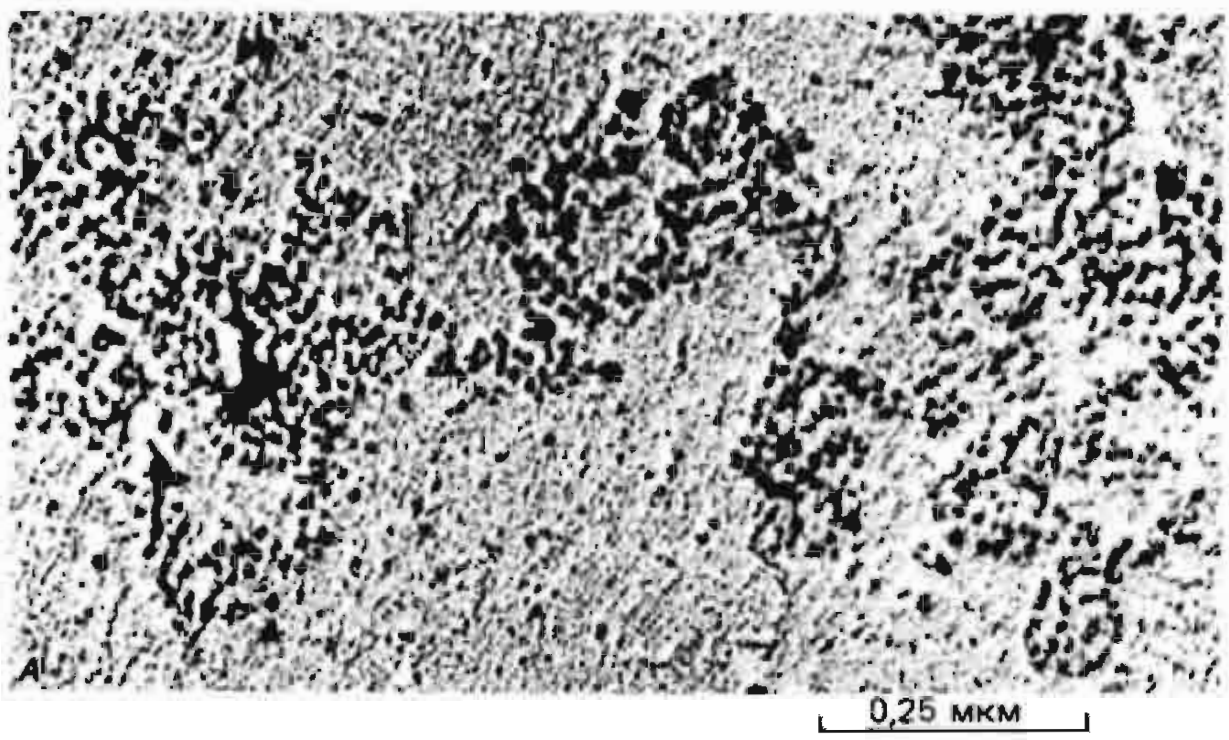
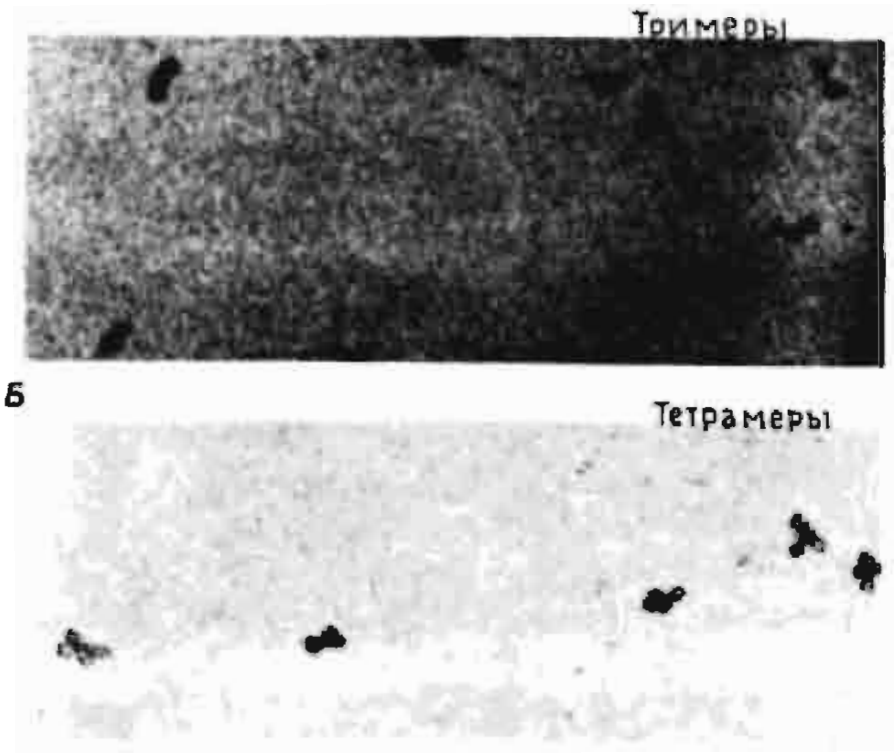
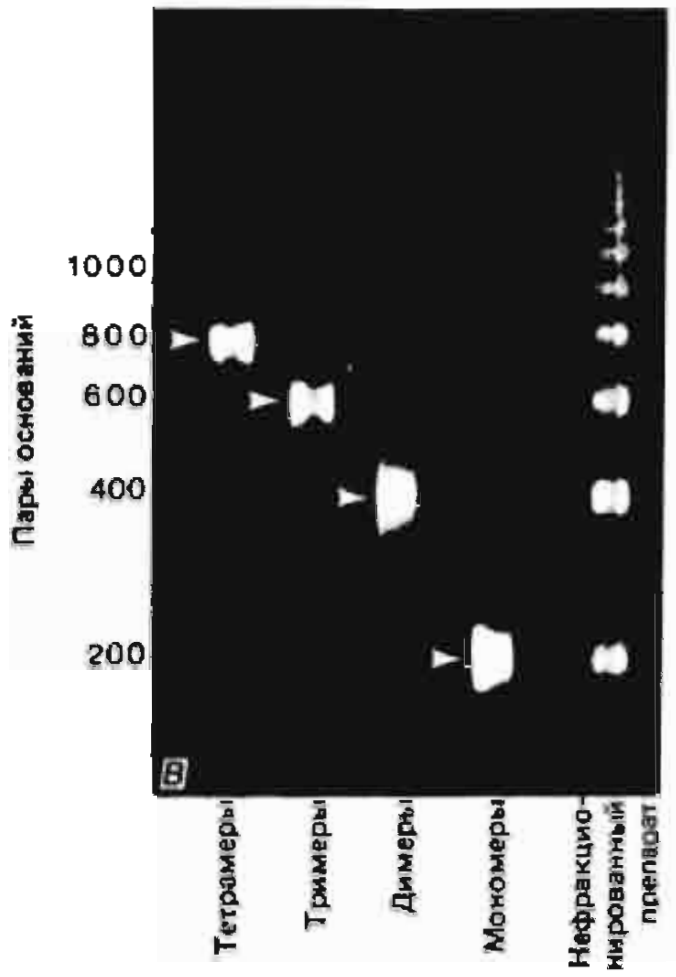
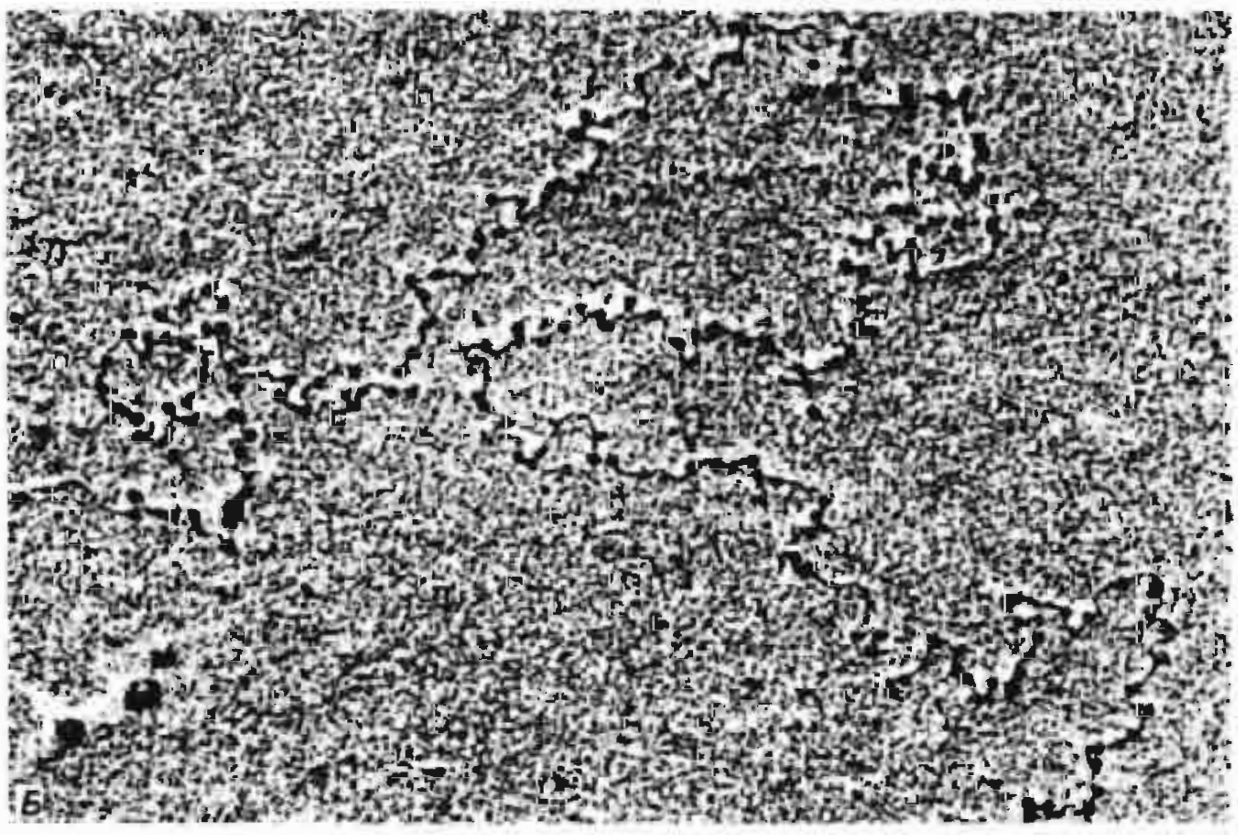


Рис. 12.24. Роль гистона H1 в компактизации хроматина. *А*. Хроматин из клеток печени курицы (электронная микрофотография). Нуклеосомы видны в виде глобул. *Б*. Тот же препарат хроматина после удаления гистона H1





в градиенте, были выделены фрагменты хроматина, из которых была экстрагирована ДНК и подвергнута электрофорезу. На полученной электрофореграмме виден набор дискретных фрагментов, отличающихся друг от друга на 200 пар оснований. На правой дорожке геля показана ДНК, экстрагированная после гидролиза нуклеазой, который был проведен до центрифугирования в градиенте сахарозы. (*Б* и *В* – из Finch et al., 1975.)



с помощью солевой элюции. Хроматин стал значительно менее компактным. (Ms Oudet et al., 1975; фотография с любезного разрешения P. Chambon.)

парам оснований (Hewish, Burgoyne, 1973; Noll, 1974). Если эти фрагменты хроматина, обработанного ДНКазой, рассматривать в электронный микроскоп, то фрагмент, содержащий 200 пар оснований, виден как сферическое тело (глобула) с небольшим хвостом. Последовательность из 400 пар оснований представляется в виде двух связанных глобул, а последовательность из 600 пар оснований содержит три сферические тела, связанные друг с другом (Finch et al., 1975). На основе этих наблюдений был сделан вывод, что главная субъединица хроматина содержит около 200 пар оснований ДНК и что микрококковая ДНКаза расщепляет ДНК преимущественно между нуклеосомами.

Роль гистонов в образовании этой структуры была продемонстрирована в опытах, в которых удалось реконструировать субъединицы хроматина в пробирке (Kornberg, Thomas, 1974). Смешивание гистонов H2A, H2B, H3 и H4 приводит к образованию только тетрамеров из H2A и H2B, а также тетрамеров из H3 и H4. Однако если к этой смеси гистонов добавить ДНК, то нуклеиновые кислоты и гистоны агрегируют с образованием нуклеосомной структуры с теми же самыми физическими и химическими свойствами, что и обычный хроматин.

Таким образом, хроматин можно представить себе как нитку нуклеосомных бус, связанных между собой 10–100 парами оснований ДНК. Гистоновый октамер состоит из двух молекул каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4 и приблизительно 140 пар оснований ДНК, которая намотана на белковую глобулу. Гистон H1 не представлен в нуклеосомах, но в зависимости от физиологического состояния клетки может быть связан с линкерной ДНК между нуклеосомами. Эти нуклеосомы в свою очередь упаковываются в плотные структуры, а H1, по-видимому, участвует в наматывании нуклеосом друг на друга, особенно при подготовке к клеточному делению (рис. 12.24) (Weintraub, 1984). Кроме того, по крайней мере в одном случае, показано, что определяемая H1 конформация нуклеосом ингибирует транскрипцию специфических генов в соматических клетках (Schlissel, Brown, 1984).

Активация репрессированного хроматина

Доступность для *транс*-регуляторных факторов

Эксперименты по гибридизации в растворах свидетельствуют, что в геноме большинства позвоночных имеется по меньшей мере 10 000 тканеспецифических генов; и в клетках любого конкретного типа активность почти всех этих генов репрессирована. Обычно считают, что «молчащее» состояние хроматина является репрессированным и что тканеспецифические гены активируются локальным удалением ингибирующих факторов (Weintraub, 1985). Как отмечено выше, главным механизмом общей репрессии генов является, вероятно, компактизация ДНК в кластеры нуклеосом. Если ДНК оказывается закрученной в эти плотные структуры, *транс*-регуляторные факторы инициации транскрипции не в состоянии найти последовательности ДНК, с которыми они могли бы связаться (Schlissel, Brown, 1984). Когда ДНК, содержащая промотор, входит в состав нуклеосом, соответствующие гены не могут транскрибироваться (Workman, Roeder, 1987). Однако, если к этим генам перед сборкой нуклеосом или во время сборки добавлен белок, связывающийся с TATA-боксом (TFIID), то реконструированный хроматин оказывается транскрипционно активным.

Специфическая для клеточного типа активация генов может проходить поэтому в два этапа. Во-первых, участок хроматина должен развернуться так, чтобы ген и его промотор стали доступными для транскрипционных факторов и РНК-полимеразы. Во-вторых, чтобы связаться с экспонированной ДНК, эти транскрипционные факторы должны присутствовать в ядрах.

Имеются данные, что в любой конкретной клетке транскрибируемые гены более доступны для РНК-полимеразы и *транс*-регуляторных факторов, чем нетранскрибируемые. (Иными словами, репрессирующая система отменена локально в этих участках.) Основные данные в пользу этого положения получены в работах по определению чувствительности специфических генов различных клеток к ДНКазе. Доступность гена к ядерным белкам может быть оценена при обработке хроматина ткани небольшими количествами ДНКазы I (ДНКаза, отличающаяся по специфичности от микрококковой ДНКазы). Из обработанного хроматина экстрагируют ДНК и смешивают с радиоактивной кДНК для конкретного гена (рис. 12.25). Если кДНК находит последовательности для связывания, значит, соответствующий ген был защищен белками хроматина от переваривания ДНКазой (он был для нее недоступен), и этот ген будет, вероятно, недоступен также для РНК-полимеразы. Однако если зонд кДНК не находит последовательности для связывания, значит, этот ген был экспонирован для ДНКазы и будет, вероятно, доступен для РНК-полимеразы и *транс*-регуляторных факторов.

Было обнаружено, что чувствительность определенного гена к ДНКазе I зависит от типа клеток, в которых он находится (табл. 12.2) (Weintraub, Groudine, 1976). Когда хроматин из развивающихся *эритроцитов* курицы был обработан ДНКазой I,

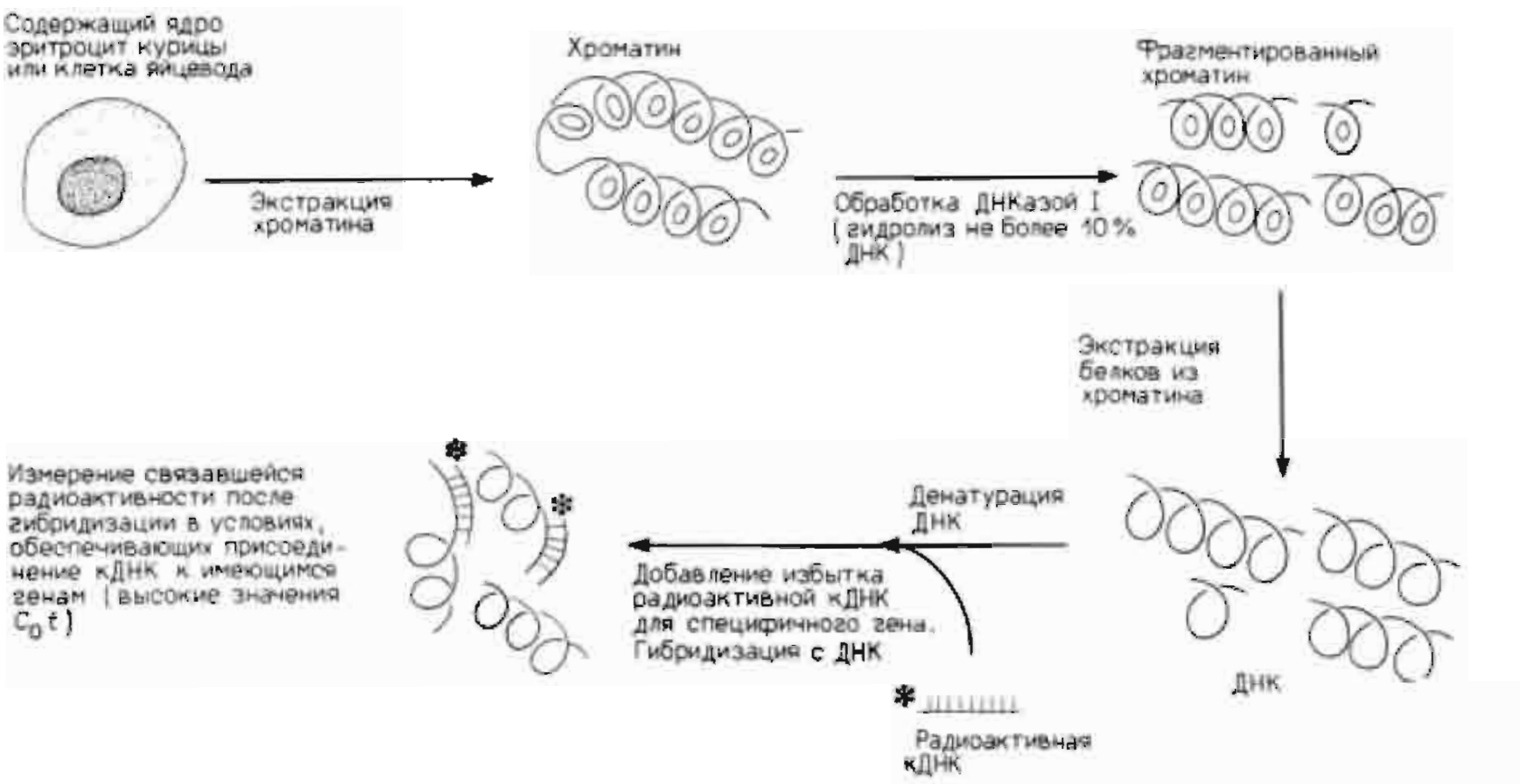


Рис. 12.25. Протокол опыта по определению специфичности гидролиза хроматина ДНКазой I. Результаты опыта см. в табл. 12.2.

затем из него была экстрагирована ДНК и смешана с радиоактивной глобиновой кДНК, глобиновой кДНК практически не было с чем связываться. Глобиновые гены в хроматине оказались гидролизованными небольшими количествами ДНКазы I. Однако обработка теми же количествами ДНКазы I хроматина из клеток *мозга* не приводила к деградации глобиновых генов. Поэтому глобиновые гены доступны для экзогенных ферментов в хроматине развивающихся эритроцитов, но не в хроматине клеток мозга.

Сходным образом ген овальбумина доступен для переваривания ДНКазой I в хроматине яйцевода и недоступен в хроматине эритроцитов. Когда хроматин обрабатывают ДНКазой I и экстрагируют ДНК, овальбуминовая кДНК способна найти комплементарные последовательности в препаратах из эритроцитов, но не в ДНК из хроматина яйцевода. Таким образом, здесь мы имеем четкую корреляцию между дифференциальной регуляцией генов и структурой хроматина.

Сайты, гиперчувствительные к ДНКазе

Помимо сайтов, чувствительных к ДНКазе I, существуют сайты, *гиперчувствительные к ДНКазе I*. Эти сайты, идентифицированные с помощью небольших радиоактивных фрагментов ДНК, гидролизуются крайне низкими количествами ДНКазы I, что свидетельствует об их чрезвычайной доступности для внешних молекул. Почти все гиперчувствительные участки, связанные с генами, активность которых регулируется в развитии, тканеспецифичны (Elgin, 1981; Conklin, Groudine, 1984). Сайты, гиперчувствительные к ДНКазе I, содержатся в глобиновых генах эритроцитов и их непосредственных пред-

Таблица 12.2. Опыты по связыванию кДНК-зондов с хроматином, обработанным ДНКазой I

Источник хроматина, обработанного ДНКазой I	Радиоактивный кДНК-зонд	Максимальное связывание радиоактивной кДНК с ДНК, экстрагированной из обработанного хроматина, %
ДНК эритроцитов курицы (без обработки ДНКазой)	Глобиновая кДНК	94
Хроматин клеток мозга курицы	Глобиновая кДНК	90–100
Хроматин фибробластов курицы	Глобиновая кДНК	90–100
Хроматин эритроцитов курицы	Глобиновая кДНК	25
Хроматин эритроцитов курицы	Овальбуминовая кДНК	90–100

Источник: Weintraub, Groudine, 1976.

шественников, но не содержатся в глобиновых генах других клеток (Stalder et al., 1980). В предшественниках эритроцитов из печени плода сайты, гиперчувствительные к ДНКазе I, лежат в пределах 200 пар оснований с 5′-стороны от кэп-сайтов в генах β-, γ- и δ-цепей глобина. Если хроматин экстрагируют из клеток костного мозга взрослых особей, то только δ- и β(взрослые)-глобиновые гены обнаруживают гиперчувствительность к ДНКазе I (Groudine et al., 1983). 5′-Фланкирующая область гена вителлогенина курицы содержит несколько гиперчувствительных сайтов в хроматине из печени кур-несушек, но эти сайты отсутствуют в хроматине печени петухов, хроматине эмбриональной печени, хроматине лимфоцитов и клеток мозга (Burch, Weintraub, 1983). Когда сайт, гиперчувствительный к ДНКазе I, был делетирован из 5′-области регулируемого в развитии гена белка из клеток слюнных желез дрозофилы, транскрипты этого гена не обнаруживались, а молекулы РНК-полимеразы не связывались с промотором этого гена (Shermoen, Beckendorf, 1982; Steiner et al., 1984).

Такие гиперчувствительные сайты располагаются обычно внутри или поблизости от сайтов, которые выполняют функции энхансеров. При исследовании энхансера, отвечающего на глюкокортикоид в вирусе рака молочной железы мыши, было обнаружено, что перед добавлением гормона к клеткам, несущим вирус, эта энхансерная последовательность не обладает повышенной чувствительностью к ДНКазе I (Zaret, Yamamoto, 1984). После введения гормона в этом участке появляется дискретный сайт, гиперчувствительный к ДНКазе I. Образование гиперчувствительного сайта совпадает с инициацией транскрипции вирусных генов; когда гормон удаляют, гиперчувствительный сайт исчезает и транскрипция вирусных генов прекращается. Исследователи полагают, что взаимодействие между комплексом глюкокортикоид–рецептор и ДНК энхансера изменяет конфигурацию хроматина, способствуя транскрипции с ближайшего промотора.

Внутри гиперчувствительного участка овальбуминового гена курицы картирован сайт связывания прогестерона (Mulvihill et al., 1982). Введение эстрогена способно индуцировать образование четырех сайтов, чувствительных к ДНКазе I, в 5′-фланкирующей области этого гена (Kaye et al., 1986), однако после удаления эстрогена три из этих сайтов исчезают. Энхансеры для гена инсулина крысы и β-глобинового гена курицы также лежат внутри участков, гиперчувствительных к ДНКазе I (Emerson et al., 1985; Ohlsson, Edlund, 1986).

Гиперчувствительность к ДНКазе и характер метилирования

Во взаимоотношениях между сайтами, гиперчувствительными к ДНКазе, энхансерными элементами и сайтами метилирования легко запутаться. У курицы активность гена главного желточного белка вителлогенина II регулируется эстрогеном, и синтезируется этот белок только в печени кур-несушек. В генах вителлогенина, находящихся в хроматине печени, уже до стимуляции гормоном имеются четыре сайта, гиперчувствительные к ДНКазе I. Следовательно, они существуют прежде, чем в этом локусе начинается транскрипция (Burch, Weintraub, 1983). Эти гиперчувствительные сайты (указаны стрелками «А» на рис. 12.26, *Г*) находятся в середине и в 3′-фланкирующей области гена в хроматине печени, но отсутствуют в хроматине эритроцитов, фибробластов и нейронов. После стимуляции эстрогеном возникают три новых сайта, гиперчувствительных к ДНКазе I. Они лежат в 5′-фланкирующей области гена и связаны с энхансерными элементами, которые присоединяют рецептор эстрогена (Burch, Weintraub, 1983). Кроме того, расположенный в этой области ЦГ-сайт, который обычно метилирован у зародышей и у петухов, при добавлении эстрогена становится неметилированным (указан кружком на рис. 12.26). После удаления эстрогена один из 5′-чувствительных сайтов исчезает, хотя другие сайты (и характер деметилирования) сохраняются. Ни деметилирования, ни возникновения новых гиперчувствительных сайтов в гене вителлогенина в клетках других типов не наблюдается.

Высказано предположение, что деметилирование необходимо для появления сайтов, гиперчувствительных к ДНКазе I (Keshet et al., 1986). Если неметилированные глобиновые гены трансфицировали в ядра фибробластов мыши, то в них обнаруживались сайты, чувствительные к ДНКазе (независимо от способности генов к транскрипции). Если же эти гены были метилированы по каждому ЦфГ-сайту, то чувствительные к ДНКазе участки не возникали.

Регуляция активности генов

Как могут существовать участки, гиперчувствительные к ДНКазе I, если ДНК единообразно упакована в нуклеосомы? На этот вопрос возможны два ответа. Первый – в хроматине существуют области, свободные от нуклеосом, и второй – существуют факторы, которые присоединяются к нуклеосомам и заставляют их ослаблять связь с ДНК.

Отсутствие нуклеосом обеспечивает доступность всей ДНК в этой области для РНК-полимеразы и возможность осуществления эффективной транс-

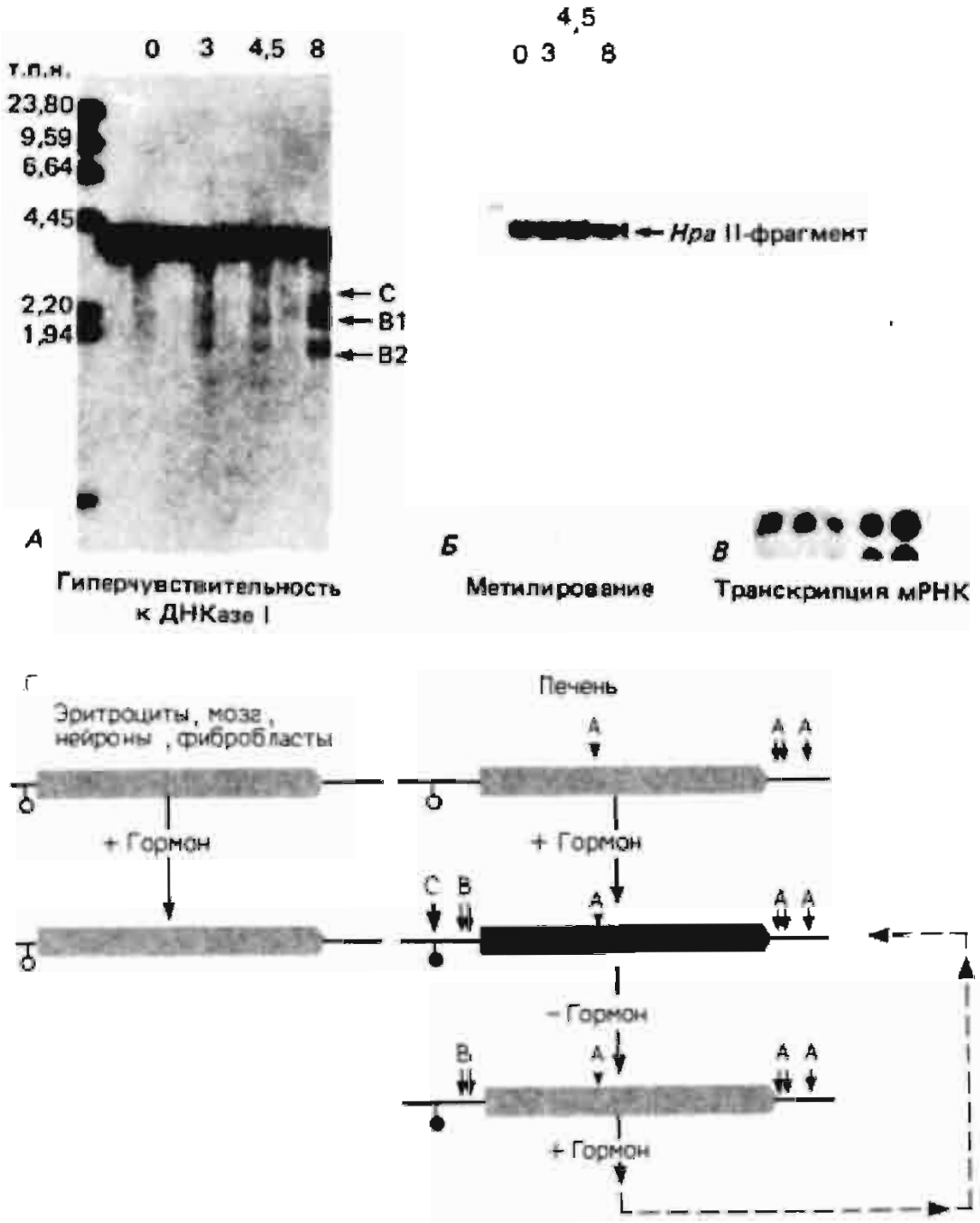


Рис. 12.26. Корреляция транскрипции с гиперчувствительностью к ДНКазе I и гипометилированием в сайтах энхансеров. *А*. Определение гиперчувствительности к ДНКазе I при гидролизе хроматина печени через 0; 3; 4,5 и 8 ч после обработки эстрогеном. Левая дорожка для каждого времени соответствует негидролизованному хроматину. Появление новых коротких фрагментов через 8 ч после обработки эстрогеном указывает на расщепление ДНКазой соответствующих участков. Радиоактивный зонд свидетельствует о присутствии ДНК из 5′-конца гена. C, B1 и B2 соответствуют сайтам гена, показанным на схеме *Г*. *Б*. Определение метилирования в ДНК печени в различные сроки после обработки гормоном. ДНК гидролизовали рестриктазой *Hpa*II. В период до 8 ч зонд узнает ДНК в большом *Hpa*II-фрагменте. Через 8 ч появляется второй фрагмент. Это означает, что исходно метилированная последовательность ЦЦГГ в соответствующем участке стала неметилированной. *В*. Дот-блот-гибридизация цитоплазматической мРНК с кДНК-зондом для вителлогенина. Впервые транскрипция наблюдается приблизительно на 8-м часу. *Г*. Результаты опытов. Перед добавлением гормона в хроматине печени имеются три сайта, гиперчувствительных к ДНКазе I; в хроматине из других клеток не имеется ни одного гиперчувствительного сайта. Добавление гормона вызывает появление в клетках печени трех новых сайтов, гиперчувствительных к ДНКазе I, на 5′-конце гена и гипометилирование этого участка (обозначено черным кружком). В клетках из других органов не наблюдается ни гипометилирования, ни гиперчувствительности к ДНКазе I. Удаление гормона приводит к исчезновению в хроматине печени одного гиперчувствительного сайта, специфичного для гормона, и к потере транскрипционной активности. (Из Burch, Weintraub, 1983; фотография с любезного разрешения авторов.)

крипции. У клопа-наземника *Oncopeltus fasciatus* часть генома, содержащая гены рибосомной РНК, практически полностью свободна от нуклеосом и ДНК в этой области транскрибируется очень активно (Foe et al., 1976). Результаты электронно-микроскопических исследований подтвердили это наблюдение для *Oncopeltus* и некоторых других видов (рис. 12.27) (Labhart, Koller, 1982).

Транскрипция глобиновых генов мыши тоже может происходить с нарушениями в распределении

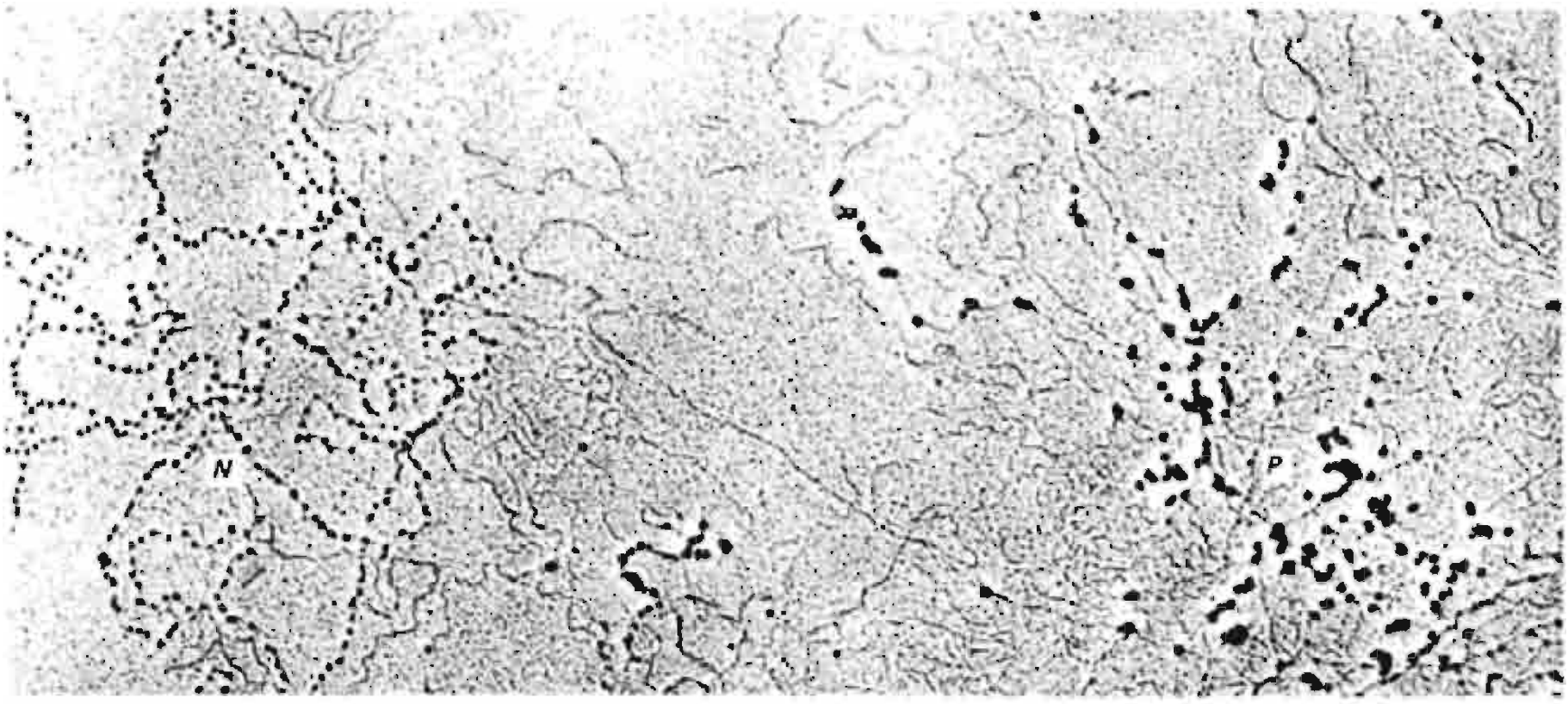


Рис. 12.27. Активные и неактивные области в геноме *Xenopus*. Хроматин, выделенный из клеток этой лягушки, обрабатывали РНКазой для удаления новообразованных цепей РНК и фиксировали для электронной микроскопии. Видны две области хроматина: в области *P* (*справа*) присутствуют крупные белковые молекулы (предположительно РНК-полимеразы); в области *N* (*слева*) видны нуклеосомы без РНК-полимераз. (Из Labhart, Koller, 1982; фотография с любезного разрешения T. Koller.)

нуклеосом. В клетках, которые не относятся к эритроидному ряду, нуклеосомы на всем протяжении глобиновых генов располагаются регулярно. Однако в предшественниках эритроцитов регулярное расположение нуклеосом нарушается, так что 5′-конец гена (от −200 до +500) оказывается свободным от этих структур. Когда клетки индуцируются к синтезу гемоглобина, может происходить дальнейшее разрушение нуклеосом (Cohen, Sheffery, 1985; Benezra et al., 1986).

Данные, полученные в других исследованиях, также свидетельствуют о том, что большинство участков, гиперчувствительных к ДНКазе I (а возможно, и все такие участки), лишены нуклеосом. Гены легких цепей иммуноглобулинов становятся гипометилированными и чувствительными к ДНКазе I в ходе развития пре-В-клеток в В-клетки (Rose, Gartard, 1984). Кроме того, в это время меняется распределение нуклеосом, так что большие области иммуноглобулинового гена становятся относительно свободными от них. Остающиеся нуклеосомы оказываются без гистона H1 и содержат вместо него белки HMG 14 и HMG 17 (см. ниже).

Не исключено, что способ взаимодействия метильных групп с гистонами позволяет образовывать нуклеосомы только на метилированной ДНК, но не на неметилированной (Keshet et al., 1986). Это ограничение будет приводить к появлению участков гиперчувствительности к ДНКазе. После образования таких участков другим *транс*-регуляторным фактором станет проще находить эти свободные от нуклеосом области. Такая последовательность событий могла бы объяснить, почему ген вителлогенина в печени курицы содержит ряд сайтов, гиперчувствительных к ДНКазе, уже перед добавлением гормона. Присоединение *транс*-регуляторного рецептора гормона будет создавать впоследствии новые гиперчувствительные сайты, связанные с активной транскрипцией.

Формирование активного участка хроматина не требует полного удаления нуклеосом. Многие активно транскрибируемые гены лежат внутри районов с обычным распределением нуклеосом. Тем не менее нуклеосомы могут быть модифицированы в определенных специфических локусах. Одна из таких наиболее важных модификаций включает присоединение двух пептидов, называемых **белками группы высокой подвижности:** HMG 14 и HMG 17.

Когда хроматин гидролизуется ДНКазой I, происходит преимущественное высвобождение двух негистоновых белков хроматина: HMG 14 и HMG 17. Эти два низкомолекулярных белка могут быть экстрагированы из хроматина с помощью 0,35 M NaCl. Они, по-видимому, обеспечивают чувствительность, но не гиперчувствительность генов к ДНКазе I, когда связываются поблизости от нуклеосом. Если

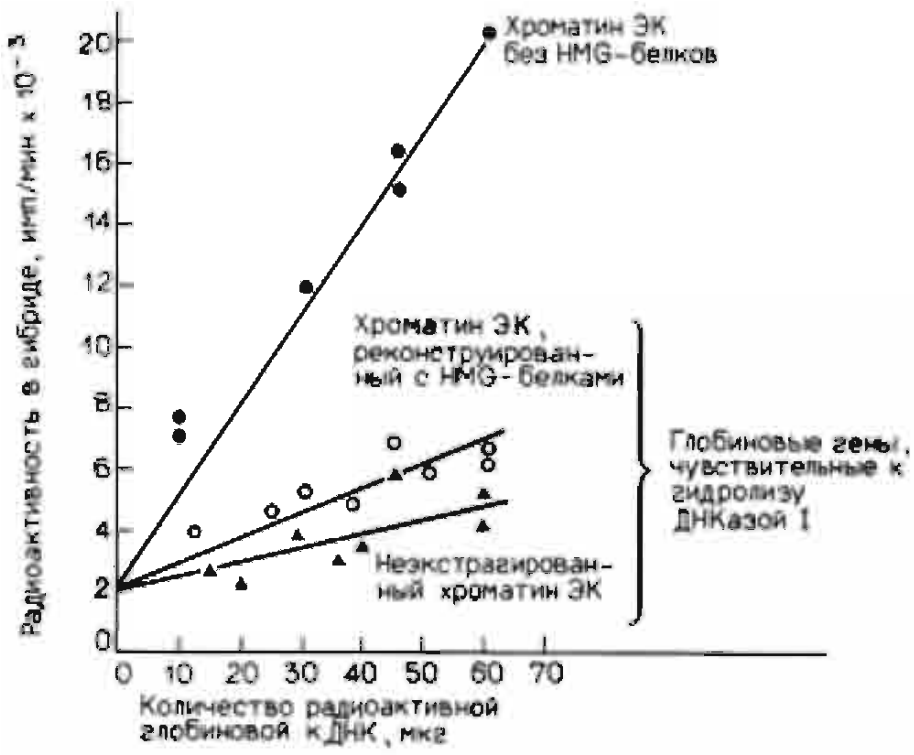


Рис. 12.28. Реконструкция чувствительности к ДНКазе I области глобинового гена. Из хроматина эритроцитов курицы (ЭК) удаляли HMG-белки. Одну фракцию хроматина инкубировали без HMG-белков, а другую фракцию реконструировали, добавляя эти белки. К обеим фракциям и неэкстрагированному хроматину ЭК добавляли ДНКазу I в количестве, достаточном для гидролиза 10% ДНК. Эффективность связывания радиоактивной глобиновой кДНК с комплементарными последовательностями в препарате хроматина, лишенного HMG-белков, была намного выше, чем в других препаратах. (Данные из Weisbrod, Weintraub, 1979.)

белки HMG 14 и HMG 17 удаляют из хроматина, то одновременно исчезает дифференциальная чувствительность специфических генов к ДНКазе I. Таким образом, когда белки HMG экстрагированы из хроматина эритроцитов, глобиновые гены утрачивают чувствительность к перевариванию ДНКазой I (рис. 12.28). Однако, когда эти белки добавляют к такому обедненному хроматину, дифференциальная чувствительность глобиновых генов восстанавливается (Weisbrod, Weintraub, 1979; Weisbrod et al., 1980; Gazit et al., 1980). Способность этих белков восстанавливать чувствительность по-прежнему определяется хроматином. HMG 14 и HMG 17, выделенные из мозга, восстанавливают чувствительность к ДНКазе I глобиновых генов из эритроцитов, но не из клеток мозга. Таким образом, два негистоновых белка хроматина оказываются необходимыми (но не достаточными) для осуществления транскрипции специфических генов в разных тканях.

Связь активной ДНК с ядерным матриксом

Присоединение активного хроматина к ядерному матриксу

Внутри ядра репликативные ферменты должны каким-то образом найти сайты для инициации синтеза ДНК; транскрипционные факторы и полимеразы должны найти свои промоторы и энхансеры; факторы процессинга РНК должны найти сайты для сплайсинга РНК, а мРНК должна успешно найти поры, через которые она уйдет из ядра. Это слишком сложная задача для молекул в растворе. Нам пришлось бы предположить, что различные факторы, участвующие в транскрипции, плавают в ядерном соке, сталкиваясь случайно с ДНК. Молекулы РНК, образованные таким образом, будут затем подвергаться сплайсингу и сталкиваться в ядре до тех пор, пока не найдут ядерные поры, через которые покинут ядро.

Альтернативная модель предполагает, что РНК транскрибируется на твердом субстрате, где собраны вместе все ферменты, необходимые для транскрипции, процессинга и транспорта. Для таких представлений имеются прецеденты. Подобным упорядоченным агрегатом является цепь транспорта электронов в митохондриях, и давно известно, что ДНК-синтезирующие ферменты бактерий собраны на внутренней поверхности клеточной мембраны. В таком случае можно поставить следующие вопросы: существует ли ядерный ретикулум, где могли бы находиться подобные ферменты? Если такой матрикс существует, локализованы ли на нем активно



Рис. 12.29. Участок ядерного матрикса (*слева*) и окружающая цитоплазма (электронная микрофотография; × 47 000). Хорошо видны филаменты цитоскелета. Ядра выделяли из фибробластов мыши, экстрагировали детергентом для удаления липидов и затем обрабатывали ДНКазой I. (Из Capco et al., 1982; фотография с любезного разрешения S. Penman.)



Рис. 12.30. Саузерн-блот, демонстрирующий фрагменты ДНК, защищенные ядерным матриксом, а также фрагменты, которые высвобождались из ядер после обработки рестриктазой *Eco*RI. ДНК, высвобождаемую обработкой *Eco*RI, фракционировали с помощью электрофореза одновременно с ДНК, выделенной из ядерного матрикса и не солюбилизировавшейся при обработке *Eco*RI, а также с общей клеточной ДНК из яйцевода курицы, стимулированного эстрогеном. ДНК переносили блоттингом на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с радиоактивными рестрикционными фрагментами из генов овальбумина и β-глобина. Глобиновый ген не связывался с матриксом, а овальбуминовый ген присоединялся к фракции матрикса. (Из Ciejek et al., 1983; фотография с любезного разрешения B. W. O'Malley.)

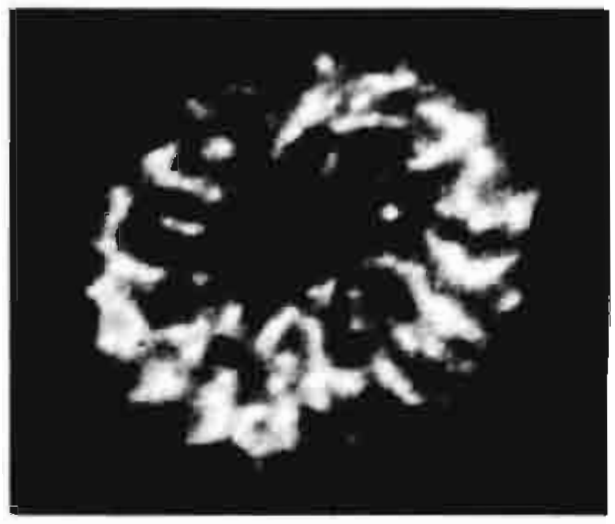


Рис. 12.31. Расположение активного хроматина на периферии ядра и вдоль каналов. Ядра эритроцитов обрабатывали ДНКазой I, которая, как полагают, создает разрывы в участках хроматина, активных в транскрипции. Такие разрывы репарируются в ядрах с помощью ник-трансляции в присутствии меченых нуклеотидов, которые можно визуализовать по флуоресценции. Эти меченые нуклеотиды обнаруживаются на периферии ядра и вдоль структур, идущих от ядерной оболочки внутрь ядра. (Из Hutchinson, Weintraub, 1985; фотография с любезного разрешения N. Hutchinson.)

транскрибируемые гены? Если такой матрикс существует, находятся ли на нем РНК-синтезирующие ферменты?

Ядерный матрикс можно выделить путем суспендирования ядер в детергентах и гидролиза большей части ДНК с помощью ДНКаз (Berezney, Coffey, 1977; Capco et al., 1982). На электронной микрофотографии подобных комплексов выявляется сеть белков, которая пронизывает ядро и присоединяется на ядерной оболочке к цитоскелету (рис. 12.29). Такой матрикс наблюдали во всех эукариотических ядрах, исследованных до настоящего времени (Nelson et al., 1986).

При выделении матрикса данным методом ДНКаза удаляет до 98% ДНК. Содержит ли ДНК, которая остается связанной с матриксом (и, вероятно, защищенная от ДНКаз благодаря прочной связи с ним), активно транскрибируемые гены? Мы располагаем данными, что это и в самом деле так, по крайней мере для некоторых генов. Было показано, что ген овальбумина связан предпочтительно с ядерным матриксом в клетках яйцевода, но не в клетках печени или эритроцитах курицы (Robinson et al., 1982). При этом с ядерным матриксом клеток яйцевода не были ассоциированы глобиновые гены. Другая группа исследователей подтвердила и развила эти наблюдения (Ciejek et al., 1983), показав, что вся индуцируемая гормоном единица транскрипции (включающая ген овальбумина и два соседних гена X и Y) связана с ядерным матриксом (рис. 12.30). Других генов, ассоциированных с матриксом, не было среди исследованных 100 000 пар оснований ДНК. Когда у животных удаляли эстроген, исчезало специфическое присоединение этих генов к ядерному матриксу. Оказалось, что эти гены связаны с ядерным матриксом, только когда они активированы.

В 1985 г. Хатчинсон и Вайнтрауб (Hutchinson, Weintraub, 1985) обнаружили, что сайты, чувствительные к ДНКазе I, распределяются по ядру неравномерно. Эти авторы обрабатывали ядра ДНКазой I и затем, не разрушая ядер, проводили в них реакцию ник-трансляции. При этом меченая ДНК должна представлять только активно транскрибируемые (т. е. чувствительные к ДНКазе I) гены. Результаты этого опыта (рис. 12.31) показали, что ДНК, чувствительная к ДНКазе I, располагается на периферии ядер и вдоль каналов или волокон, которые присоединены к ядерной оболочке. В этом случае активные гены, вероятно, специфически ассоциированы с ядерным матриксом.

Третья группа данных, свидетельствующих об участии ядерного матрикса в транскрипции, включает наблюдения, что бóльшая часть (в некоторых сообщениях 95%) новосинтезированной РНК оказывается присоединенной к ядерному матриксу (Miller et al., 1976; Herman et al., 1978; Mariman et al., 1982; van Eekelen, van Venrooij, 1981). Эта связь, по-видимому, осуществляется при участии особого белка ядерного матрикса. С учетом того, что активные

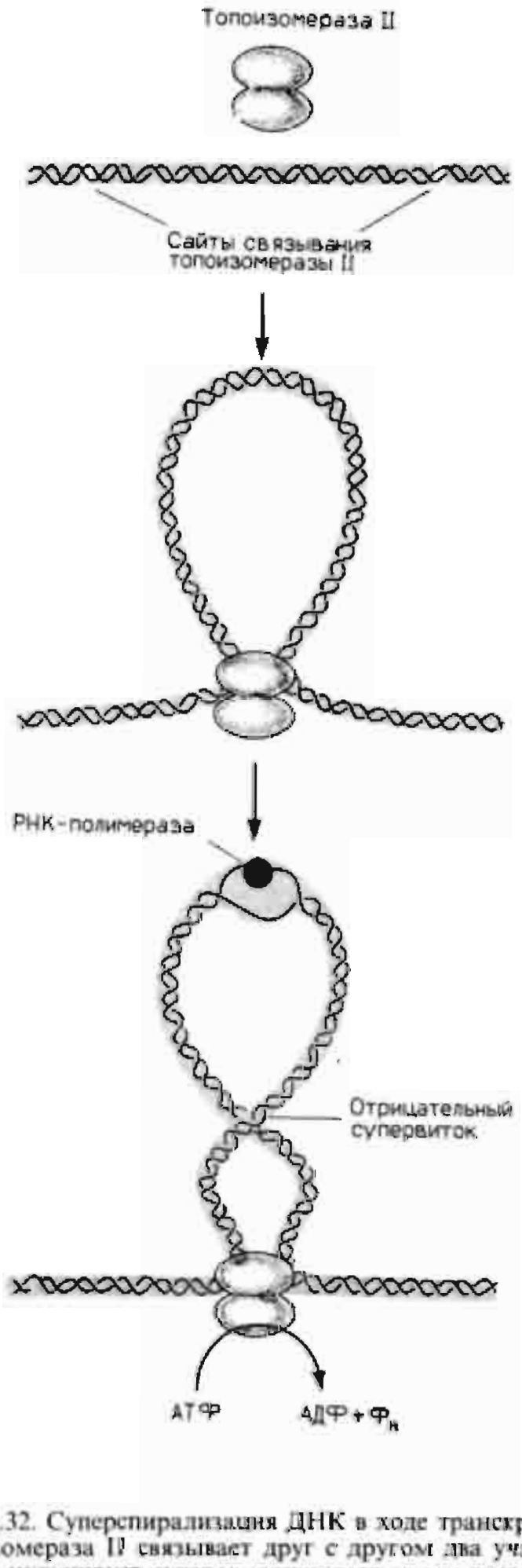


Рис. 12.32. Суперспирализация ДНК в ходе транскрипции. Топоизомераза II связывает друг с другом два участка ДНК и индуцирует суперспирализацию путем временного разрыва и последующего воссоединения цепей ДНК. В результате упругого напряжения участок двойной спирали разделяется на две цепи, что позволяет РНК-полимеразе (предположительно и другим *trans*-регуляторным белкам) инициировать транскрипцию. Сайты связывания топоизомеразы обнаружены в ДНК, ассоциированной с матриксом (Cockerill, Garrard, 1986). (По Darnell et al., 1986.)

гены, РНК-полимераза и новосинтезированные транскрипты оказываются связанными с ядерным матриксом, было высказано предположение (Jackson, Cook, 1985), что транскрипция не осуществляется мобильной полимеразой, передвигающейся вдоль гена. По представлениям этих исследователей, вероятнее, что РНК-полимераза прикреплена к ядерному матриксу, а ДНК протягивается через нее.

Топоизомеразы и транскрипция генов

Полагают, что репликация ДНК происходит на ядерном матриксе и один из связанных с матриксом ферментов обеспечивает раскручивание спирали ДНК. Нужен ли подобный фермент для транскрипции РНК? Недавние исследования показали, что раскручивание спирали ДНК играет важную роль, способствуя транскрипции РНК. Чтобы цепи ДНК разошлись, транскрипционно активный хроматин должен быть закручен (Ryoji, Worcel, 1984), и это закручивание осуществляется с помощью суперспирализации ДНК (рис. 12.32). Если суперспирализованные кольцевые плазмиды инъецировали в ядра ооцитов *Xenopus*, то эти плазмиды транскрибировались. Если же эти плазмиды линеаризовали (раскрывая их с помощью рестриктазы), то после инъекции в клетки они не транскрибировались (Harland et al., 1983; Pruitt, Reeder, 1984). Показано, что чувствительные к ДНКазе I сайты в активных генах возникают только в тех случаях, когда эти гены находятся под торзионным напряжением (Villeponteau et al., 1984). Ферментом, который ответствен за скручивание ДНК, позволяющее цепям ДНК разделиться, является **топоизомераза II**. С помощью антител к этому белку продемонстрировано, что топоизомераза II расположена в комплексе внутреннего ядерного матрикса с ядерной оболочкой (Berrios et al., 1985).

Когда к ядерным препаратам добавляется ингибитор топоизомеразы II новобиоцин, напряжение с генов снимается, сайты, чувствительные к ДНКазе, исчезают, и транскрипция прекращается (Han et al., 1985; Glikin et al., 1984). Прикрепление ДНК к матриксу может быть необходимо также для предотвращения свободного вращения ДНК, что позволяет связанным с матриксом топоизомеразам скручивать хроматин (Cockerill, Garrard, 1986).

Z-ДНК и петлевые структуры

Одним из результатов суперспирализации может быть переход ДНК в альтернативную конформацию, отличающуюся от стандартной B-формы двойной спирали Уотсона–Крика. Суперспирализация

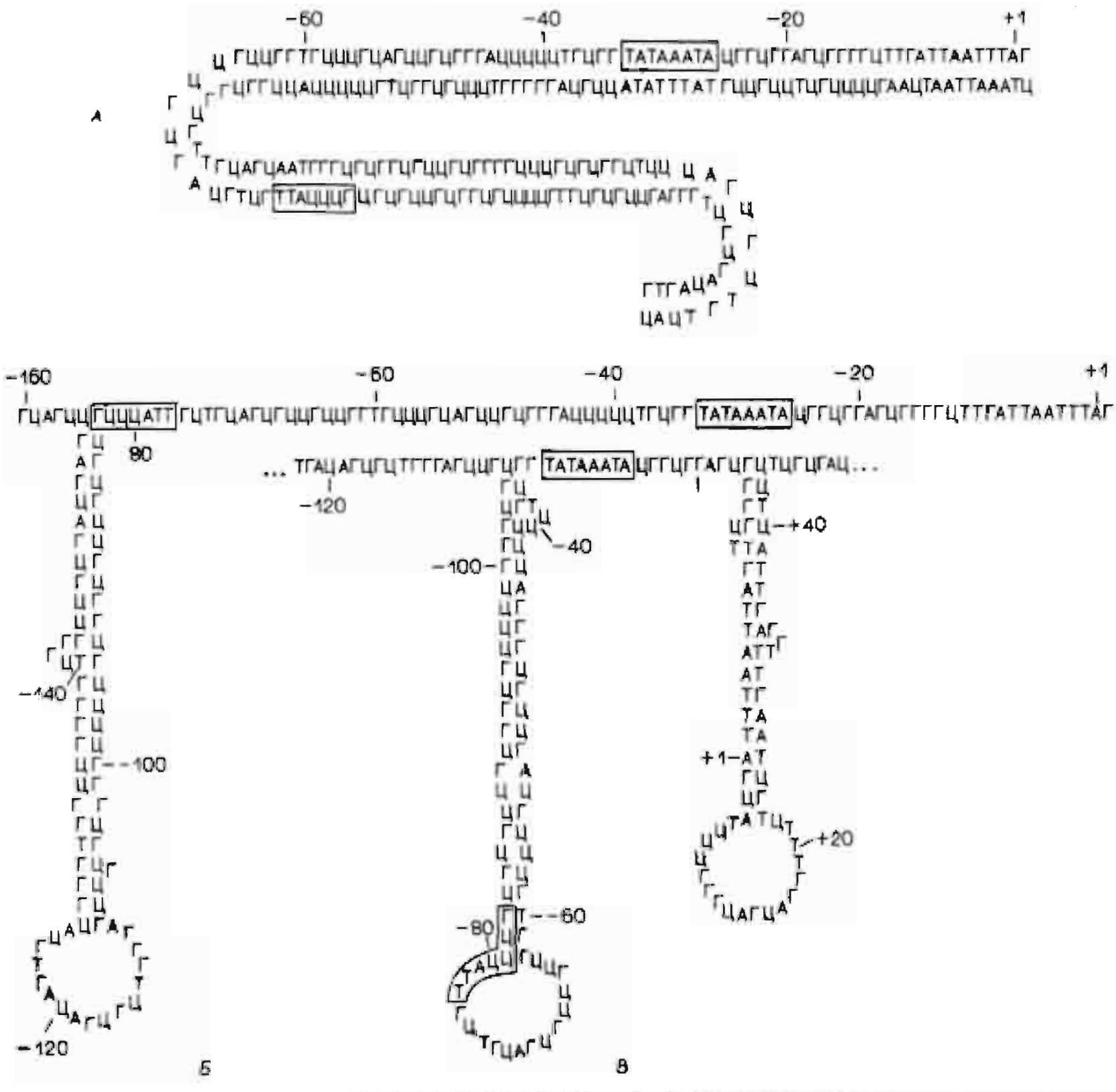


Рис. 12.33. Возможные вторичные структуры, образуемые областью промотора гена α2 коллагена курицы. Последовательности ТАТА и ЦААТ заключены в прямоугольники; + 1 указывает место инициации синтеза РНК. *А*. Стандартное соединение комплементарных оснований. *Б*, *В*. Стабильные «шпилечные» структуры, содержащие одноцепочечные участки. Изображена только одна из комплементарных цепей, другая цепь образует аналогичную петлю. (По Vogeli et al., 1981.)

ДНК может привести к образованию «левозакрученной» Z-ДНК или петлевых структур. Образование петель постулируется в тех случаях, когда по термодинамическим причинам может происходить спаривание двух комплементарных участков одной цепи ДНК с большей вероятностью, чем спаривание двух цепей. На рис. 12.33 показано возможное спаривание оснований внутри одной цепи на 5'-конце гена коллагена 22 курицы. Высказано предположение (Larsen, Weintraub, 1982), что такие петлевые структуры являются сайтами узнавания для *транс*-регуляторных белков, и эти белки, будучи связанными, предотвращают образование нуклеосом в этой области ДНК.

Другой конформационный переход, который может происходить под действием скручивания,– это переход в Z-ДНК (Johnston, Rich, 1985; Kohwi-Shigematsu, Kohwi, 1985). Бóльшая часть ядерной ДНК представлена правозакрученной двойной спиралью в B-форме, описанной Уотсоном и Криком. Одна-

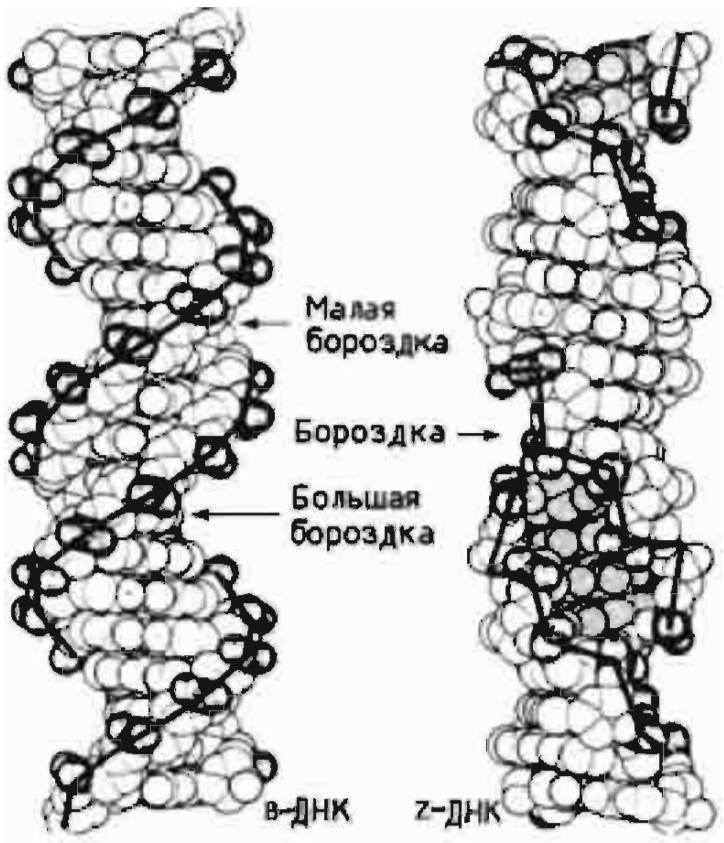


Рис. 12.34. Сравнение правозакрученной (B) и левозакрученной (Z) ДНК. Видна разница в строении этих двух спиральных структур. (Из Wang et al., 1979; с любезного разрешения A. Rich.)

ко Рич и его коллеги обнаружили, что определенные ЦГ-богатые последовательности, такие как ЦГЦГЦГ, образуют предпочтительно *левозакрученные* двойные спирали (Wang et al., 1979). Физические свойства этой левозакрученной структуры отличаются от свойств стандартной ДНК. Левозакрученная спираль содержит 12 пар оснований на 1 виток (а не 10) и принимает конформацию «зиг-заг» (отсюда название «Z-ДНК»). Помимо этого в Z-ДНК нет большой бороздки, которая обеспечивает присоединение ряда молекул к B-ДНК (рис. 12.34).

Такая левозакрученная Z-ДНК обнаружена в геномах млекопитающих и дрозофилы. С помощью антител к Z-ДНК было показано, что Z-ДНК имеется на всем протяжении политенных хромосом дрозофилы (рис. 12.35). При этом она локализована в зонах между дисками. Считают, что эти междисковые зоны контролируют экспрессию генов, лежащих внутри дисков (Nordheim et al., 1981).

Вначале полагали, что переход из B-ДНК в Z-ДНК может происходить только в условиях высокой концентрации солей. Однако позже было показано (Behe, Felsenfeld, 1981), что Z-ДНК формируется естественным образом при физиологических концентрациях солей, если остатки цитидинов в чередующихся ГЦ-полимерах метилированы. Таким образом, метилирование цитидина может позволить B-ДНК перейти в Z-конформацию. Кроме того, в отличие от B-ДНК, которая ускоряет формирование нуклеосом из гистонов, Z-ДНК эффективно подавляет формирование нуклеосом (Nickol et al., 1982). На самом деле гистоны будут связываться с Z-ДНК, но они не будут ассоциироваться в нуклеосомный октамер.

РЕЗЮМЕ

В данный момент у нас в руках части одной или нескольких головоломок. Мы не уверены, что имеем все части, и даже не знаем, сколько всего головоломок. Вполне вероятно, что существует несколько способов активации транскрипции. За прошедшие пять лет выяснилось, что образования «активных генов» еще недостаточно для транскрипции. Помимо этого требуется «активный хроматин». В настоящее время изучается взаимоотношение между альтернативными структурами генов (метилирован-



Рис. 12.35. Политенные хромосомы из слюнных желез дрозофилы, окрашенные флуоресцентными антителами к Z-ДНК. Антитела связываются с многочисленными междисковыми участками. (Из Nordheim et al., 1981; фотография с любезного разрешения A. Rich.)

ными и неметилированными; B-ДНК и петлями, или Z-ДНК) и альтернативными структурами хроматина (HMG-модифицированными нуклеосомами и немодифицированными; свободными от нуклеосом областями и областями, содержащими нуклеосомы). Участие гистона H1 в общем подавлении транскрипции и участие скручивания в активации специфических локальных участков представляются ключевыми элементами в регуляции генов. Остается выяснить, каким образом хроматин информируется о том, какую структуру ему следует принять.

Вероятно, существуют определенные реципрокные взаимодействия между ДНК и хроматином. Посредством этих взаимодействий ДНК может управлять формообразованием хроматина в конкретном направлении, а данное изменение в структуре хроматина может в свою очередь позволить ДНК изменить свою структуру определенным образом. Одна из моделей заключается в следующем: когда ДНК реплицируется, нуклеосомы разрушаются. На этом этапе характер метилирования может быть изменен или сохранен[1]. В активных генах некоторые из *транс*-регуляторных факторов (такие, как TATA-связывающий белок) могут присоединяться к ДНК и эти участки ДНК избегнут конденсации с участием гистона H1. Вместе с тем нуклеосомы в гипометилированных участках могут изменить конформацию так, что окажутся способными присоединить HMG 14 и HMG 17. Экспонированная ДНК может затем связаться с топоизомеразами на ядерном матриксе. Это присоединение позволит ДНК закрутиться таким образом, что в участках промоторных и энхансерных последовательностей возникнут альтернативные структуры. В этих местах *цис*-последовательности могли бы затем присоединить *транс*-регуляторные белки и РНК-полимеразу для осуществления транскрипции. Это лишь одна из возможных моделей, удовлетворяющих экспериментальным данным, но и против нее имеются возражения. Как заметил Альбер Клод, мы только начали составлять опись обретенного нами богатства.

ЛИТЕРАТУРА

Atchinson M.L., Perry R.P. (1987). The role of κ-enhancer and its binding factor NF-κB in the developmental regulation of κ gene transcription. Cell **48**, 121–128.

Banerji J., Olson L., Schaffner W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located down-stream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. Cell **33**, 729–740.

Behe M., Felsenfeld G. (1981). Effects of methylation on a synthetic polynucleotide. The B–Z transition in poly(dG-m^{5}dC)·poly(dG-m^{5}dC). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 1619–1623.

Benezra R., Cantor C.R., Axel R. (1986). Nucleosomes are phased along the mouse β-major globin gene in erythroid and non-erythroid cells. Cell **44**, 697–704.

Berezney R., Coffey D.S. (1977). Nuclear matrix: Isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. J. Cell Biol. **73**, 616–637.

Bergman Y., Rice D., Grosschedl R., Baltimore D. (1984). Two regulatory elements for immunoglobulin κ light chain gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7041–7045.

Berrios M., Osheroff N., Fisher P.A. (1985). In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the *Drosophila* nuclear matrix fraction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 4142–4146.

Bodner M., Karin M. (1987). A pituitary-specific *trans*-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of non-expressing cells. Cell **50**, 267–275.

Boulet A.M., Erwin C.R., Rutter W.J. (1986). Cell-specific enhancers in the rat exocrine pancreas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3599–3603.

Browder L.W. (1984). Developmental Biology. Saunders, Philadelphia.

Burch J.B., Weintraub H. (1983). Temporal order of chromatin structural changes associated with activation of the major chicken vitellogenin gene. Cell **33**, 65–76.

Burlingame R.W., Love W.E., Wang B.-C., Hamlin R., Xuong N.-H., Moudrianakis E.N. (1985). Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. Science **228**, 246–253.

Busslinger M., Hurst J., Flavell R.A. (1983). DNA methylation and the regulation of globin gene expression. Cell **34**, 197–206.

Capco D.G., Wan K.M., Penman S. (1982). The nuclear matrix: Three-dimensional architecture and protein composition. Cell **29**, 847–858.

Chandler V.L., Maler B.A., Yamamoto K.R. (1983). DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. Cell **33**, 489–499.

Ciejek E.M., Tsai M.-J., O'Malley B.W. (1983). Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. Nature **306**, 607–609.

Cockerill P.N., Garard W.T. (1986). Chromosome loop anchorage of the κ immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. Cell **44**, 273–282.

Cohen R.B., Sheffery M. (1985). Nucleosome disruption precedes transcription and is largely limited to the transcribed domain of globin genes in murine erythroleukemia cells. J. Mol. Biol. **182**, 109–129.

Compere S.J., Palmiter R.D. (1981). DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells. Cell **25**, 233–240.

Conklin K.F., Groudine M. (1984). Chromatin structure and gene expression. In: A. Razin, H. Cedar and A.D. Riggs (eds.), DNA Methylation. Springer-Verlag, New York, pp. 293–351.

Darnell J., Lodish H., Baltimore D. (1986). Molecular Cell Biology. Scientific American Books, New York.

Davison B.L., Egly J.M., Mulvihill E.R., Chambon P. (1983). Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences. Nature **301**, 680–686.

Dierks P., van Ooyen A., Chochran M.D., Dobkin C., Reiser J., Weissman C. (1983). Three regions upstream from the cap site are required for efficient and accurate transcription of the rabbit β-globin gene in mouse 3T6 cells. Cell **32**, 695–706.

[1] Вновь образующиеся нуклеосомы могут располагаться в соответствии с распределением метилированных оснований.

Dynan W.S., Tjian R. (1985). Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. Nature **316**, 774–778.

Efstratiadis A. and fouteen others. (1980). The structure and evolution of the human β-globin gene family. Cell **21**, 653–668.

Elgin S. (1981). DNase I hypersensitive sites of chromatin. Cell **27**, 413–415.

Emerson B.M., Lewis C.D., Felsenfeld G. (1985). Interaction of specific nuclear factors with the nuclease-hypersensitive region of the chick adult β-globin gene: Nature of the binding domain. Cell **41**, 21–30.

Finch J.T., Noll M., Kornberg R.D. (1975). Electron microscopy of defined lengths of chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3320–3322.

Fletcher C., Heintz N., Roeder R. (1987). Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of a human histone H2b gene. Cell **51**, 773–781.

Foe V.E., Wilkinson L.E., Laird C.D. (1976). Comparative organization of active transcription units in *Oncopeltus fasciatus*. Cell **9**, 131–146.

Garabedian M.J., Hung M.-C., Wensink P.C. (1985). Independent control elements that determine yolk protein gene expression in alternative *Drosophila* tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 1396–1400.

Garabedian M.J., Shepherd B.M., Wensink P.C. (1986). A tissue-specific transcription enhancer from the *Drosophila* yolk protein 1 gene. Cell **45**, 859–867.

Garcia J.V., Bich-Thuy L.T., Stafford J., Queen C. (1986). Synergism between immunoglobulin enhancers and promoters. Nature **322**, 383–385.

Gazit B., Panet A., Cedar H. (1980). Reconstitution of deoxyribonuclease I-sensitive structure on active genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 1787–1790.

Gedamu L., Dixon G.H. (1978). Effect of enzymatic decapping on protamine messenger RNA translation in wheat-germ S-30. Biochem. Biophys. Res. Commun. **85**, 114–124.

Gerber-Huber S., May F.E.B., Westley B.R., Felber B.K., Hosbach H.A., Andres A.-C., Ryffel G.U. (1983). In contrast to other *Xenopus* genes the estrogen-induced vitellogenin genes are expressed when totally methylated. Cell **33**, 43–51.

Gilbert W. (1978). Why genes in pieces? Nature **271**, 501.

Gilbert W. (1985). Genes-in-pieces revisited. Science **228**, 823–824.

Gillies S.D., Morrison S.L., Oi V.T., Tonegawa S. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element in located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. Cell **33**, 717–728.

Glickin G.C., Ruberti I., Worcel A. (1984). Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: In vitro studies. Cell **37**, 33–41.

Grosschedl R., Birnstiel M.L. (1980). Spacer DNA upstream from the TATAATA sequence are essential for promotion of H2A histone gene transcription in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 7102–7106.

Grosveld G.C., de Boer E., Shewmaker C.K., Flavell R.A. (1982). DNA sequences necessary for the transcription of the rabbit β-globin gene in vivo. Nature **295**, 120–126.

Groudine M., Conklin K.F. (1985). Chromatin structure and de novo methylation of sperm DNA: Implications for activation of the paternal genome. Science **228**, 1061–1068.

Groudine M., Kohwi-Shigematsu T., Gelinas R., Stamatoyannopoulos G., Papayannopoulo T. (1983). Human fetal to adult hemoglobin switching: Changes in chromatin structure of the β-globin gene locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 7551–7555.

Groudine M., Weintraub H. (1981). Activation of globin genes during chick development. Cell **24**, 393–401.

Hamer D.H., Leder P. (1979). Splicing and the formation of stable RNA. Cell **18**, 1299–1302.

Han S., Uvardy A., Schedl P. (1985). Novobiocin blocks the *Drosophila* heat shock response. J. Mol. Biol. **183**, 13–29.

Harland R.M., Weintraub H., McKnight S.L. (1983). Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology. Nature **302**, 38–43.

Herman R., Weymouth L., Penman S. (1978). Heterogeneous nuclear RNA-protein fibers in chromatin depleted nuclei. J. Cell Biol. **78**, 663–674.

Hewish D.R., Burgoyne L.A. (1973). Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spread sites by nuclear DNase. Biochem. Biophys. Res. Commun. **52**, 504–510.

Hotchkiss R.D. (1948). The quantitative separation of purines, purimidines, and nucleosides by paper chromatography. J. Biol. Chem. **175**, 315–332.

Hutchinson N., Weintraub H. (1985). Localization of DNAase I-sensitive sequences to specific regions of interphase nuclei. Cell **43**, 471–482.

Inana G., Piatigorsky J., Norman B., Slingsby C., Blundell T. (1983). Gene and protein structure of a β-crystallin polypeptide in murine lens: Relationships of exons and structural motifs. Nature **302**, 310–315.

Jackson D.A., McCready S.J., Cook P.R. (1981). RNA is synthesized at the nuclear cage. Nature **292**, 552–555.

Johnston B.H., Rich A. (1985). Chemical probes of DNA conformation: Detection of Z-DNA at nucleotide resolution. Cell **42**, 713–724.

Jones K.A., Kadonaga J.T., Rosenfeld P.J., Kelly T.J., Tjian R. (1987). A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. Cell **48**, 79–89.

Kantor J.A., Turner P.H., Nienhuis A.W. (1980). β Thalassemia: Mutations which affect processing of the β-globin mRNA precursor. Cell **21**, 149–157.

Karin M., Haslinger A., Holtgreve H., Richards R.I., Krauter P., Westphal H.M., Beato M. (1984). Characterization of DNA sequences through which cadmium and glucocorticoid hormones induce human metallothionein-II gene. Nature **308**, 513–519.

Kaslow D.C., Migeon B.R. (1987). DNA methylation stabilizes X chromosome inactivation in eutherian but not in marsupial: Evidence for multistep maintenance of mammalian X dosage compensation: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6210–6214.

Kaye J.S., Pratt-Kaye S., Bellard M., Dretzen G., Bellard F., Chambon P. (1986). Steroid hormone dependence of four DNase I-hypersensitive regions located within the 7000-bp 5′ flanking segment of the ovalbumin gene. EMBO J. **5**, 277–285.

Keith D.H., Singersam J., Riggs A.D. (1986). Active X-chromosome DNA is unmethylated at eight CCGG sites clustered in a guanine-plus-cytosine-rich island at the 5′ end of the gene for phosphoglycerate kinase. Mol. Cell Biol. **6**, 4122–4125.

Keshet I., Lieman-Hurwitz J., Cedar H. (1986). DNA methylation affects the formation of active chromatin. Cell **44**, 535–543.

Klock G., Strahle U., Schutz G. (1987). Oestrogen and glucocorticoid responsive elements are closely related but distinct. Nature **329**, 734–736.

Kohwi-Schigematsu T., Kohwi Y. (1985). Poly (dG) – Poly (dC) sequences, under torsional stress, induce an altered DNA conformation upon neighboring DNA sequences. Cell **43**, 199–206.

Konieczny S.F., Emerson C.P., Jr. (1984). 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: Evidence for regulatory genes controlling determination. Cell **38**, 791–800.

Kornberg R.D., Thomas J.D. (1974). Chromatin structure: Oligomers of histones. Science **184**, 865–868.

Krieg P. A., Melton D. A. (1987). An enhancer responsible for activating transcription at the mid-blastula transition in *Xenopus* development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 2331–2335.

Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., Jin J.-R., Chambon P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. Cell **51**, 941–951.

Labhart P., Koller T. (1982). Structure of the active nucleolar chromatin of *Xenopus laevis* oocytes. Cell **28**, 279–292.

Larsen A., Weintraub H. (1982). An altered DNA conformation detected by S1 nuclease occurs at specific regions in active chick globin chromatin. Cell **29**, 609–622.

Lassar A. B., Paterson B. M., Weintraub H. (1986). Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts into myoblasts. Cell **47**, 649–656.

Lawn R. M., Efstratiadis A., O'Connell C., Maniatis T. (1980). The nucleotide sequence of the human β-globin gene. Cell **21**, 647–651.

Liskay R. M., Evans R. (1980). Inactive X chromosome DNA does not function in DNA-mediate cell transformation for the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 4895–4898.

Lock L. F., Takagi N., Martin G. R. (1987). Methylation of the HPRT gene on the inactive X chromosome occurs after chromosome inactivation. Cell **48**, 39–46.

Logan J., Flack-Pedersen E., Darnell J. E., Jr., Shenk T. (1987). A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse β maj-globin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 8306–8310.

Mandel J. L., Chambon P. (1979). DNA methylation differences: Organ-specific variations in methylation pattern within and around ovalbumin and other chick genes. Nucleic Acid Res. **7**, 2081–2103.

Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J. A. (1987). Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. Science **236**, 1237–1245.

Maquat L. E., Kinniburgh A. J., Beach L. R., Honig G. R., Lazerson J., Ershler W. B., Ross J. (1980). Processing of human β-globin mRNA precursor to mRNA is defective in three patients with β^+ thalassemias. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 4287–4291.

Marbaix G., Huez G., Burny A., Cleuter Y., Hubert E., Leclercq M., Chantrenne H., Soreq H., Nudel U., Littauer U. Z. (1975). Absence of polyadenylate segment in globin messenger RNA accelerates its degradation in *Xenopus* oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3065–3067.

Mariman E. C. M., van Eekelen C. A. G., Reinders R. J., Berns A. J. M., van Venrooij W. J. (1982). Adenoviral heterogeneous nuclear RNA is associated with the host nuclear matrix during splicing. J. Mol. Biol. **154**, 103–119.

Martinez E., Givel F., Wahl W. (1987). An estrogenresponsive element as an inducible enhancer: DNA sequence requirements and conversion to a glucocorticoid-responsive element. EMBO J. **6**, 3719–3727.

Mather E. L., Perry R. P. (1982). Transcriptional regulation of the immunoglobulin-V genes. Nucleic Acid Res. **9**, 6855–6867.

McGhee J. D., Grinder G. D. (1979). Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chick β-globin genes. Nature **280**, 419–420.

McKnight S., Tjian R. (1986). Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. Cell **46**, 795–805.

Melton D. W., McEwan C., McKie A. B., Reid A. M. (1986). Expression of the mouse HPRT gene: Deletion analysis of the promoter region of an X-chromosome linked housekeeping gene. Cell **44**, 319–328.

Merkel C. G., Kwan S.-P., Lingrel J. B. (1975). Size of the poly(A) region of newly synthesized globin mRNA. J. Biol. Chem. **250**, 3725–3728.

Miesfeld R. and seven others. (1986). Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by a cloned receptor cDNA. Cell **46**, 389–399.

Mohandas T., Sparkes R. S., Shapiro L. J. (1981). Reactivation of an inactive human X chromosome: Evidence for X inactivation by DNA methylation. Science **211**, 393–396.

Monk M., Boubelik M., Lehnert S. (1987). Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic, and germ cell lineages during mouse embryo development. Development **99**, 371–382.

Mulvihill E. R., Lepennec J. P., Chambon P. (1982). Chick oviduct progesterone receptor: Location of specific regions of high-affinity binding in cloned DNA fragments of hormone-responsive genes. Cell **28**, 621–632.

Myers R. M., Tilly K., Maniatis T. (1986). Fine structure genetic analysis of a β-globin promoter. Science **232**, 613–618.

Nabel G., Baltimore D. (1986). Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a posttranslational mechanism. Cell **47**, 921–928.

Nelson W. G., Pienta K. J., Barrack E. R., Coffey D. S. (1986). The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. Annu. Rev. Biophys. Bioph. Chem. **15**, 457–475.

Nickol J., Behe M. N., Felsenfeld G. (1982). Effect of the B–Z transformation in poly(dG-m^5dC); bi-poly(dG-m^5dC) on nucleosome formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 1771–1775.

Nokin P., Burny A., Huez G., Marbaix G. (1976). Globin mRNA from anaemic rabbit spleen. Size of its polyadenylate segment. Eur. J. Biochem. **68**, 431–436.

Noll M. (1974). Subunit structure of chromatin. Nature **251**, 249–251.

Nordheim A., Pardue M. L., Lafer E. M., Moller A., Stollar B. D., Rich A. (1981). Antibodies to lefthanded Z-DNA bind to interband regions of *Drosophila* polytene chromosomes. Nature **294**, 417–422.

Ohlsson H., Edlund T. (1986). Sequence-specific interactions of nuclear factors with the insulin gene enhancer. Cell **45**, 34–44.

Orkin S., Kazazian H. H. (1984). The mutation and polymorphism of the human β-globin gene and its surrounding DNA. Annu. Rev. Genet. **18**, 131–171.

Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P. (1975). Electron microscope and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. Cell **4**, 281–300.

Parker C. S., Topol J. (1984). A *Drosophila* RNA polymerase II transcription factor contains a promoter region-specific DNA-binding activity. Cell **36**, 357–369.

Parslow T. G., Blair D. L., Murphy W. J., Granner D. K. (1984). Structure of the 5′ ends of immunoglobulin genes: A novel conserved sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 2650–2654.

Payvar F. and seven others. (1983). Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. Cell **35**, 381–392.

Pfahl M. (1982). Specific binding of the glucocorticoid-receptor complex to the mouse mammary tumor proviral promoter region. Cell **31**, 475–482.

Picard D., Schaffner W. (1984). A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin κ gene. Nature **307**, 80–82.

Pruitt S. C., Reeder R. H. (1984). Effect of topological constraint on transcription of ribosomal DNA in *Xenopus* oocytes. J. Mol. Biol. **174**, 121–139.

Queen C., Baltimore D. (1983). Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements. Cell **33**, 741–748.

Rabinow L., Dickinson W. J. (1986). Comlex *cis*-acting regulators and locus structure of *Drosophila* tissue-specific ADH variants. Genetics **112**, 523–537.

Razin A., Cedar H., Riggs A. (1984). DNA Methylation:

Biochemistry and Biological Significance. Springer-Verlag, New York.

Reik W., Collick A., Norris M.L., Barton S.C., Surani M.A. (1987). Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. Nature **328**, 248–250.

Reynolds G.A., Basu S.K., Osborne T.F., Chin D.J., Gil G., Brown M.S., Goldstein J.L., Luskey K.L. (1984). HMG CoA reductase: A negatively regulated gene with unusual promoter and 5′ untranslated regions. Cell **38**, 275–285.

Robinson S.I., Nelkin B.D., Vogelstein B. (1982). The ovalbumin gene is associated with the nuclear matrix of chicken oviduct cells. Cell **28**, 99–106.

Roeder R. (1987). Transcription factors and mechanisms for growth- and developmentally-regulated genes. (Lecture at Summer Symposium in Molecular Biology, Penn State University.)

Rogers J., Wall R. (1981). Immunoglobulin heavychain genes: Demethylation accompanies class switching. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 7497–7501.

Rose S., Garrard W.T. (1984). Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. J. Biol. Chem. **259**, 8534–8544.

Rottman F.A., Shatkin A.J., Perry R.P. (1974). Sequences containing methylated nucleotides at the 5′ termini of messenger RNAs: Possible implications for processing. Cell **3**, 197–199.

Ryoji M., Worcel A. (1984). Chromatin assembly in *Xenopus* oocytes: In vitro studies. Cell **37**, 21–32.

Sakano H. and seven others. (1979). Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain gene are encoded in separate DNA segments. Nature **277**, 627–633.

Sapienza C., Peterson A.C., Rossant J., Balling R. (1987). Degree of methylation of transgenes is dependent of gamete of origin. Nature **328**, 251–254.

Schlissel M.S., Brown D.D. (1984). The transcriptional regulation of *Xenopus* 5 S RNA genes in chromatin: The roles of active stable transcription complex and histone H1. Cell **37**, 903–913.

Sellem C.H., Weiss M.C., Cassio D. (1985). Activation of a silent gene is accompanied by its demethylation. J. Mol. Biol. **181**, 363–371.

Sen R., Baltimore D. (1986a). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell **46**, 705–716.

Sen R., Baltimore D. (1986b). Inducibility of κ immunoglobilin enhancer-binding protein NF-κB by a post-translational mechanism. Cell **47**, 921–928.

Shatkin A.J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. Cell **9**, 645–653.

Sheiness D., Darnell J.E. (1973). Polyadenylic segment in mRNA becomes shorter with age. Nature New Biol. **241**, 265–268.

Shen C.K.J., Maniatis T. (1980). Tissue-specific DNA methylation in a cluster of rabbit β-like globin genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 6634–6638.

Shermoen A.W., Beckendorf S.K. (1982). A complex of DNAase I-hypersensitive sites near the *Drosophila* glue protein gene, *Sgs-4*. Cell **29**, 601–607.

Shi Z.P., Lee R., Weinmann R. (1986). Protein factor(s) binding independently to two different regions of the adenovirus-2 major late promoter. Nucleic Acid Res. **14**, 3729–3744.

Spritz R.A. and nine others. (1981). Base substitution in an intervening sequence of a β$^+$-thalassemic human globin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 2455–2459.

Stalder J., Larsen A., Engel J.D., Dolan M., Groundine M., Weintraub H. (1980). Tissue-specific DNA cleavages in the globin chromatin domain introduced by DNase I. Cell **20**, 451–460.

Staudt L.M., Singh H., Sen R., Wirth T., Sharp P.A., Baltimore D. (1986). A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. Nature **323**, 640–643.

Stein R., Gruenbaum Y., Pollack Y., Razin A., Cedar H. (1982). Clonal inheritance of the pattern of methylation in mouse cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 61–65.

Steiner E.K., Eissenbert J.C., Elgin S.C.R. (1984). A cytological approach to the ordering of events in gene activation using the *Sgs-4* locus of *Drosophila melanogaster*. J. Cell Biol. **99**, 233–238.

Stewart A.D., Hunt D.M. (1982). The Genetic Basis of Development. Wiley, New York.

Südhof T.C., Goldstein J.L., Brown M.S., Russell D.W. (1985). The LDL gene: A mosaic of exons shared with different proteins. Science **228**, 815–822.

Swain J.L., Stewart T.A., Leder R. (1987). Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: A molecular mechanism for parental imprinting. Cell **50**, 719–727.

Taylor S.M., Jones P.A. (1982). Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. J. Cell Physiol. **111**, 187–194.

Tiemeier D.C., Tilghman S.M., Polsky F.I., Seidman J.G., Leder A., Edgell M.H., Leder P. (1978). A comparison of two cloned mouse globin genes and their surrounding intervening sequences. Cell **14**, 237–246.

Trudel M., Constantini F. (1987). A 3′ enhancer contributes to the stage-specific expression of the human β-globin gene. Genes and Dev. **1**, 954–961.

van der Ploeg L.H.T., Flavell R.D. (1980). DNA methylation in the human γ-δ-β globin locus in erythroid and non-erythroid cells. Cell **19**, 947–958.

van Eekelen C.A.G., van Venrooij W.J. (1981). HnRNA and its attachment to a nuclear protein matrix. J. Cell Biol. **88**, 554–563.

Villeponteau B., Lundell M., Martinson H. (1984). Torsional stress promotes the DNase hypersensitivity of active genes. Cell **39**, 469–478.

Vogeli G., Ohkubo H., Sobel M.E., Yamada Y., Pastan I., de Cromburgghe B. (1981). Structure of the promoter for chicken type I collagen gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 5334–5338.

Walker M.D., Edlund T., Boulet A.M., Rutter W.J. (1983). Cell-specific expression controlled by the 5′ flanking region of the insulin and chymotrypsin genes. Nature **306**, 557–561.

Wang A.H.J., Quigley G.J., Kolpack F.J., Crawford J.L., vanBoom J.H., van der Marel G., Rich A. (1979). Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. Nature **282**, 680–686.

Wasylyk B., Kedinger C., Corden J., Brison D., Chambon P. (1980). Specific in vitro initiation of transcription on conalbumin and ovalbumin genes and comparison with adenovirus 2 early and late genes. Nature **285**, 367–373.

Weintraub H. (1984). Histone H1-dependent chromatin superstructures and the suppression of gene activity. Cell **38**, 17–27.

Weintraub H. (1985). Assembly and propagation of repressed and derepressed chromosomal states. Cell **42**, 705–711.

Weintraub H., Groudine M. (1976). Chromosomal subunits in active genes have an altered configuration. Science **193**, 848–856.

Weisbrod S., Groudine M., Weintraub H. (1980). Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribing genes. Cell **19**, 289–301.

Weisbrod S., Weintraub H. (1979). Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I-sensitive structure on globin chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 630–634.

Wigler M., Levy D., Perucho M. (1981). The somatic replication of DNA methylation. Cell **24**, 33–40.

Wirth T., Staudt L., Baltimore D. (1987). An octamer oligonucleotide upstream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. Nature **329**, 174–178.

Wolf S.F., Dintzis S., Toniolo D., Persico G., Lunnen K.D., Axelman J., Migeon B.R. (1984). Complete concordance between glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and hypomethylation of 3′ CpG clusters: Implication for X chromosome dosage compensation. Nucleic Acid Res. **12**, 9333–9348.

Wolf S.F., Jolly D.J., Lunnen K., Friedmann T., Migeon B.R. (1982). Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: Implications for X-chromosome inactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 2806–2810.

Wolf S.F., Migeon B.R. (1984). Clusters of CpG dinucleotides implicated by nuclease sensitivity as control elements of housekeeping genes. Nature **314**, 467–469.

Workman J.L., Roeder R.G. (1987). Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during in vitro nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. Cell **51**, 613–622.

Zaret K.S., Yamamoto K.R. (1984). Reversible and persistent changes in chromatin structure accompany activation of a glucocorticoid-dependent enhancer element. Cell **38**, 29–38.

Zheng X.-M., Moncollin V., Egly J.-M., Chambon P. (1987). A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). Cell **50**, 361–368.

Глава 13

Контроль развития на уровне процессинга РНК

Возможно, что новые концепции, возникшие при изучении микроорганизмов, будут весьма полезны при интерпретации и анализе дифференцировки... Однако в конечном итоге дифференцировку следует изучать на примере дифференцированных клеток.

Ж. МОНО и Ф. ЖАКОБ (1961)

Между идеей
и творением...
Между силой
и жизнью
Между парением
и падением
Опускается тень.

Т. ЭЛИОТ (1936)

Введение

Сущность дифференцировки заключается в продукции различных наборов белков в клетках разных типов. У бактерий дифференциальная экспрессия генов может контролироваться на уровнях транскрипции, трансляции и деградации белков. У эукариот существует еще один возможный уровень регуляции, а именно контроль на уровне процессинга РНК. В настоящей главе будут представлены некоторые новые данные, указывающие на то, что этот тип регуляции имеет решающее значение для развития и что различные клетки могут осуществлять процессинг одних и тех же транскрибированных РНК различными способами, создавая таким образом разные популяции цитоплазматических мРНК из одинаковых наборов ядерных транскриптов.

В шестидесятых годах биологи развития явно склонялись к объяснению дифференцировки на основе транскрипционной регуляции экспрессии генов. Во-первых, изучение политенных хромосом и их продуктов в ходе развития насекомых свидетельствовало о том, что и в самом деле регуляция на уровне транскрипции имеет место. Во-вторых, опыты по ДНК–РНК-гибридизации показали, что, несмотря на идентичность ДНК в клетках различных типов, РНК-продукты в этих клетках различаются (McCarthy, Hoyer, 1964). В-третьих, экспрессию генов было проще изучать на бактериях, чем на клетках эукариот, и это исследование продемонстрировало важность регуляции на уровне транскрипции в формировании различных физиологических состояний клеток *Escherichia coli*. Например, *lac*-оперон *E. coli* способен транскрибировать мРНК только в присутствии молекулы определенного индуктора (в данном случае лактозы). Это представлялось убедительной аналогией дифференциальной экспрессии генов в клетках эукариот.

Гетерогенная ядерная РНК

Однако вскоре стало ясно, что мРНК не является первичным продуктом транскрипции. Существует **ядерная РНК** (яРНК), которая по размерам намного больше, чем мРНК, и которая характеризуется существенно более коротким временем полужизни, чем цитоплазматические мРНК. Из-за большого разнообразия в размерах эти молекулы были названы **гетерогенной ядерной РНК** (гяРНК). Молекулы гяРНК имеют длину приблизительно $5–19 \cdot 10^3$ нуклеотидов, тогда как размеры мРНК составляют обычно $2 \cdot 10^3$ оснований, и распадаются с периодом полужизни, измеряемым минутами вместо часов, как для мРНК (см. обзор Lewin, 1980). У зародышей морского ежа период полужизни мРНК составляет около 5 ч, а период полужизни ядерной РНК – около 20 мин. Взаимоотношение между гетерогенной ядерной РНК и цитоплазматической мРНК оставалось

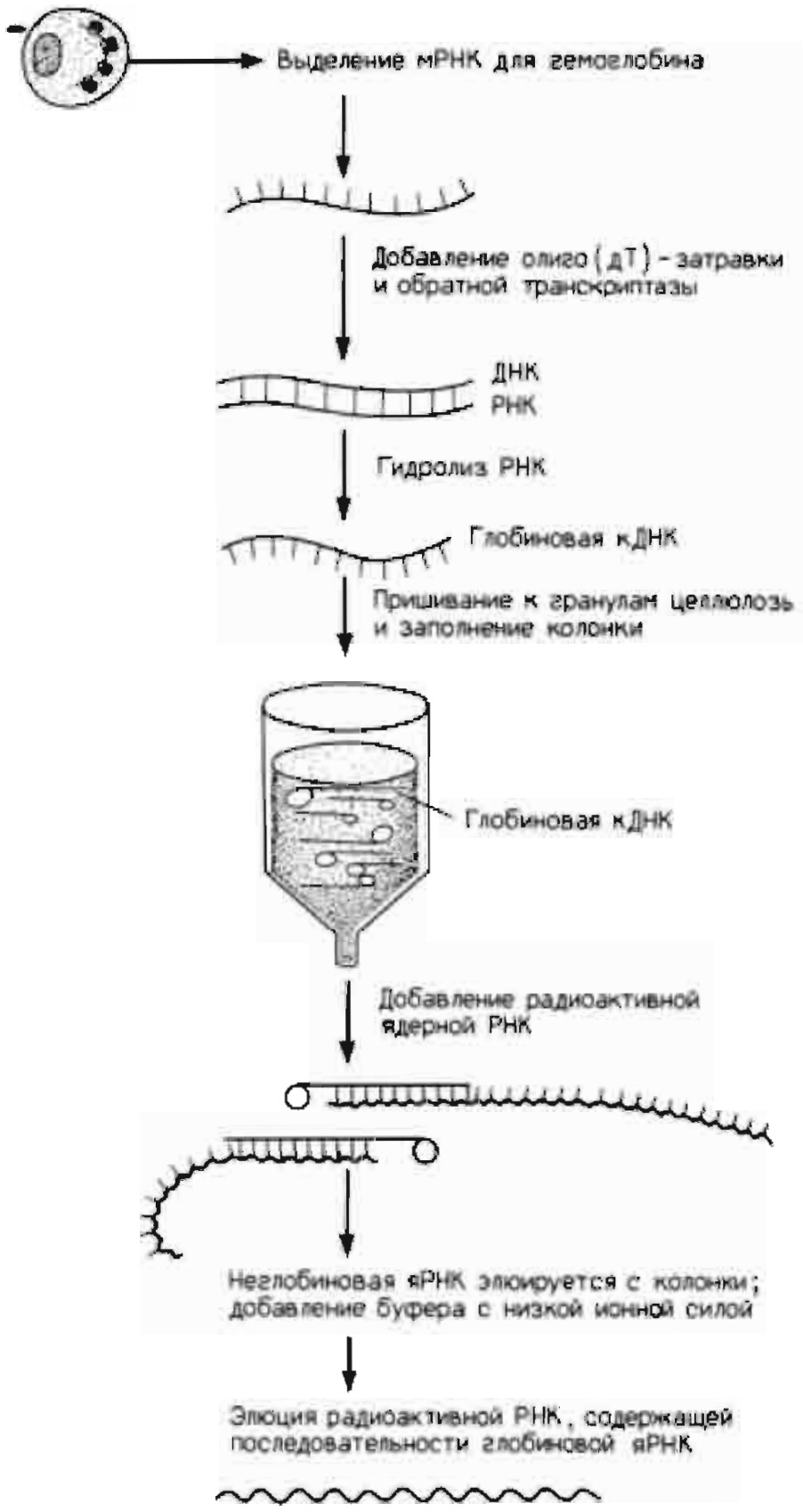


Рис. 13.1. Схема выделения ядерной РНК (яРНК), содержащей последовательности, кодирующие глобины.

предметом споров до 1977 г., когда в нескольких лабораториях в составе больших молекул ядерной РНК [1] были обнаружены последовательности мРНК.

[1] Термины *ядерная РНК* (яРНК) и *гетерогенная ядерная РНК* (гяРНК) часто используются как синонимы, однако на самом деле они несколько различаются по значению. Термин гяРНК относится обычно к предшественникам мРНК (называемым иногда пре-мРНК), тогда как яРНК относится к общей нефракционированной РНК, экстрагированной из ядра. Мы будем использовать обозначение яРНК, а не гяРНК.

Исследователи (Bastos, Aviv, 1977) изолировали глобиновую мРНК мыши и получили к ней комплементарную ДНК (кДНК) с помощью обратной транскриптазы (рис. 13.1). Затем эту кДНК пришили к гранулам целлюлозы. В присутствии радиоактивного уридина были выращены гемоглобинсинтезирующие клетки. Из этих клеток экстрагировали радиоактивную РНК и пропустили ее через приготовленную колонку. Все РНК-последовательности, кодирующие глобины, должны были связаться на колонке. Никакие другие РНК-последовательности не могут быть «выловлены» подобным образом. Связавшуюся РНК экстрагировали, промывая колонку растворами с низкой ионной силой, которые разрывают связи, удерживающие комплементарные молекулы друг с другом. Если клетки метили в течение 5 мин, то бóльшая часть радиоактивной РНК, связавшейся на колонке, характеризовалась коэффициентом седиментации 27 S, а размеры ее составляли около 5000 нуклеотидов (приблизительно в восемь раз длиннее, чем цитоплазматическая глобиновая мРНК).

Однако если мечение останавливали, а РНК экстрагировали 5 минутами позже, то глобиновые последовательности обнаруживали в меньшей по размерам фракции – 15 S. Окончательно кодирующие глобины РНК выявлялись как 10S-последовательности (600 нуклеотидов), характерные для цитоплазматической мРНК. Таким образом, гетерогенная ядерная РНК содержит предшественники цитоплазматической глобиновой мРНК. Другая группа исследователей (Hames, Perry, 1977) получила сходный результат, когда использовала кДНК ко *всей* популяции мРНК из культивируемых клеток мыши: кДНК-зонд связывался с гигантскими последовательностями гетерогенной ядерной РНК. Следовательно, эукариотическая ДНК транскрибирует большие ядерные РНК, которые служат предшественниками для меньших цитоплазматических мРНК.

Сложность ядерной и цитоплазматической РНК

Следующий вопрос касается числа различных типов последовательностей РНК, присутствующих в ядре и цитоплазме. Содержится ли в ядре большее разнообразие последовательностей, чем в цитоплазме, или и там, и там разнообразие последовательностей примерно одинаковое? Ответ на этот вопрос покажет нам, какая часть генома транскрибируется в яРНК и насколько адекватно можно судить об этой части по набору мРНК. Разнообразие нуклеотидных последовательностей называют **сложностью.** Для измерения сложности определенное количество радиоактивной РНК добавляют к избытку денатурированной ДНК и дают им возможность ренатурировать. Чем выше сложность РНК,

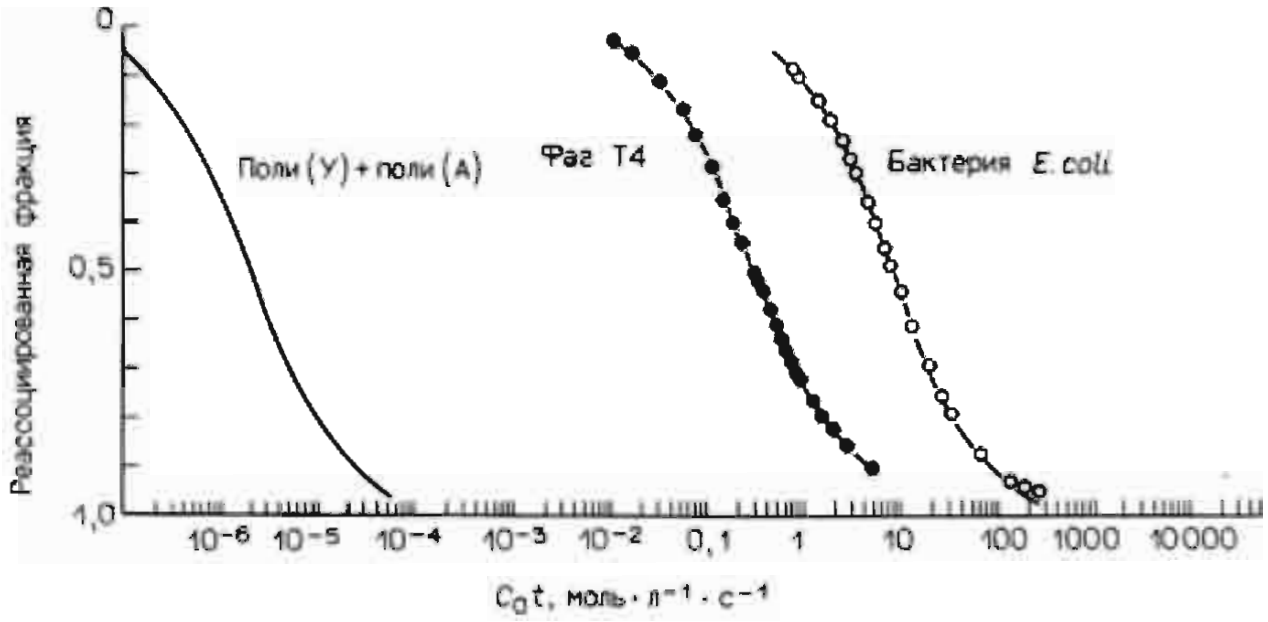


Рис. 13.2. Реассоциация нуклеиновых кислот различного происхождения. Каждая кривая представляет нормальную кинетику, ожидаемую в том случае, когда все гены присутствуют с одинаковой частотой. Так как для реакции гибридизации необходима встреча двух комплементарных последовательностей, скорость гибридизации может быть описана как $dC/dt = -kC^2$, где C – концентрация одноцепочечных последовательностей в момент времени t, а k – константа реассоциации. Обратите внимание, что 0% соответствует верхнему значению оси ординат, а ось C_0t представлена логарифмической шкалой. Видно, что ДНК *E. coli* содержит примерно в 100 раз больше последовательностей, чем ДНК бактериофага Т4. (По Britten, Kohne, 1968.)

тем ниже скорость ее ренатурации с ДНК. Другими словами, если присутствует только один тип РНК (сложность = 1), то эта РНК-последовательность довольно быстро распределяется в реакционной смеси, найдя свой ДНК-гомолог. Однако если это же количество РНК содержит тысячу последовательностей (сложность = 1000), то каждая индивидуальная последовательность будет в тысячу раз более разбавленной и вероятность найти свой гомолог за то же самое время будет крайне мала. Двухцепочечные ДНК–РНК-гибриды можно легко отделить от негибридизованной РНК и затем вычислить долю радиоактивной РНК, которая нашла себе комплементарную ДНК.

Определение сложности обычно представляют графически в виде кривых C_0t, причем C_0 – исходная концентрация меченой нуклеиновой кислоты (в молях на 1 л), t – время (в секундах). Степень реассо-

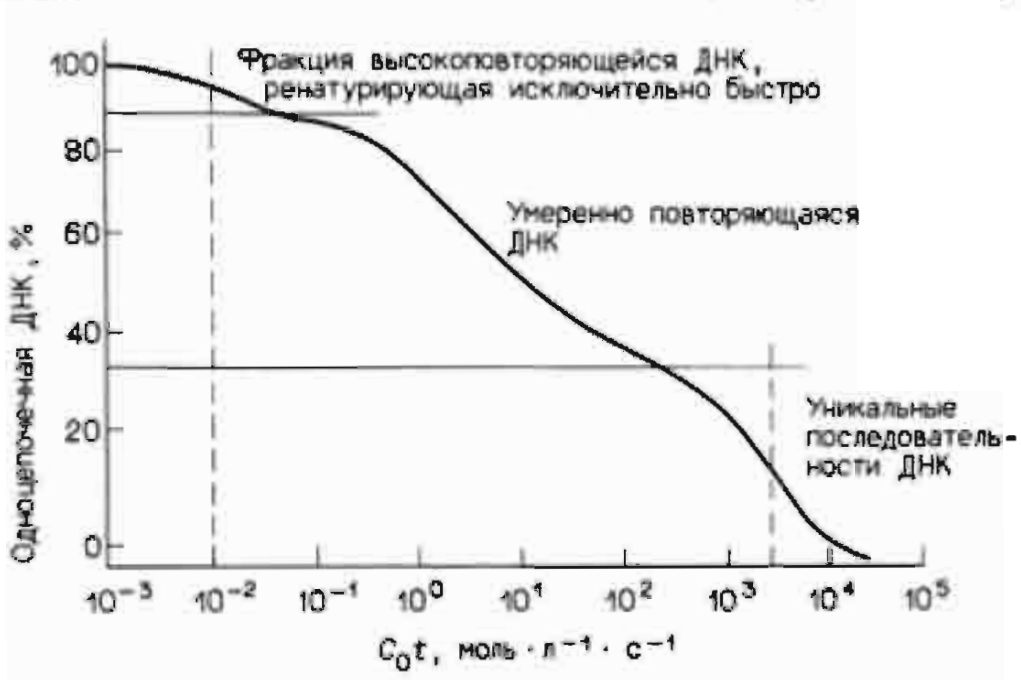


Рис. 13.3. Реассоциация ДНК типичного эукариотического организма. ДНК разрезают до коротких фрагментов – около 500 пар оснований – и денатурируют в щелочи с целью получения отдельных цепей. Затем снижают значение pH, позволяя цепям ДНК ренатурировать. Кривая показывает быстро ренатурирующую фракцию, которая представляет высокоповторяющиеся последовательности ДНК, фракцию умеренно повторяющейся ДНК и фракцию уникальных последовательностей ДНК. Показанные на рисунке высокоповторяющиеся последовательности представлены с примерно в миллион раз большей частотой, чем уникальные гены. Высокоповторяющаяся ДНК локализована обычно в центромерах и выполняет структурную функцию. Уникальная ДНК включает в себя гены, такие, как гены ферментов и структурных белков. Умеренно повторяющаяся ДНК, как полагают, содержит регуляторные последовательности, обнаруживаемые в интронах и в 5'- и 3'-фланкирующих областях генов. (По Hood et al., 1975.)

циации должна быть функцией концентрации и времени. Поэтому долю ренатурированной РНК в процентах наносят на график относительно значения C_0t (рис. 13.2). Опыты такого типа были проведены как с ДНК, так и с РНК; результаты показали, что некоторые последовательности ДНК представлены в геноме миллионы раз (фракция высокоповторяющихся последовательностей), некоторые последовательности представлены тысячи раз (фракция умеренных повторов) и, наконец, некоторые ДНК (такие, как гены, кодирующие ферменты) представлены единственной копией на гаплоидный геном (рис. 13.3) (Britten, Kohne, 1968).

Определенная с помощью этого метода сложность яРНК оказалась существенно большей, чем сложность мРНК из тех же клеток. Во-первых, определенные последовательности яРНК ассоциировали с ДНК очень быстро. Это означает, что они содержат РНК, транскрибированную с повторяющихся последовательностей ДНК. Цитоплазматическая мРНК из клеток бластулы морского ежа не содержит последовательности, которые гибридизуются с ДНК-повторами, тогда как приблизительно 25% яРНК, разрезанной на фрагменты размером около 1100 нуклеотидов, ассоциируют с ДНК при низких значениях C_0t. Исходя из того, что у морского ежа средняя длина повторов в яРНК составляет примерно 300 оснований, можно получить оценку, согласно которой 70% молекул яРНК содержат по крайней мере одну повторяющуюся последовательность (Smith et al., 1974). В том случае, если РНК гибридизовали с очищенной неповторяющейся (уникальной) ДНК (чтобы повторы не усложняли картину гибридизации), сложность яРНК обычно в 4–20 раз превосходила сложность мРНК из того же органа или типа клеток (табл. 13.1). По оценкам, полученным в таких работах, у зародышей морского ежа только 10–20% яРНК входят в популяцию цитоплазматических мРНК. В печени крысы только 11% типов последовательностей яРНК становятся информационными РНК, а в культивируемых клетках насекомых эта оценка снижается до 5%. На основе приведенных данных можно прийти к выводу, что ядерные транскрипты содержат: 1) небольшую фракцию гяРНК, которая является предшественником мРНК клетки; 2) большую фракцию яРНК, которая очень быстро обменивается внутри ядра. Популяция молекул яРНК содержит многочисленные последовательности, отличающиеся от тех, которые проходят процессинг в мРНК.

Таблица 13.1. Примерные кинетические характеристики и относительная сложность популяций мРНК и яРНК у различных видов

Организм	Доля яРНК, переходящая в поли(А)$^+$-содержащую мРНК	
	от исходной массы, %	от исходной сложности, %
Drosophila	14–20	28–40
Aedes (комар)	~3	~13
Морской еж	4–7	17–29
Клетки карциномы человека (клетки HeLa) в культуре	3–6	15–30

Источник: Lewin (1980).

Контроль развития на уровне процессинга яРНК

Из предыдущего раздела мы узнали, что в геноме транскрибируется намного больше последовательностей по сравнению с теми, которые становятся мРНК. Этот вывод предполагает, что контроль дифференцировки может эффективно осуществляться после транскрипции путем дифференциального процессинга предшественников специфических мРНК. Недавние исследования на морском еже и крысе подтвердили это.

Из клеток бластулы морского ежа была получена уникальная ДНК с помощью денатурации ДНК и выделения фракции, которая не реассоциировала при значении C_0t, равном 200 (Kleene, Humphreys, 1977). Ядерная РНК из клеток бластулы связывала 15% этой ДНК. Сходным образом яРНК со стадии плутеуса также связывала только 15% этой ДНК, даже если ее добавляли в большом избытке. Поскольку только одна цепь ДНК комплементарна РНК, 15% гибридизованной ДНК соответствуют 30% генома. Следовательно, около 30% генома активно транскрибируют яРНК на стадии бластулы и около 30% генома активно транскрибируют яРНК на стадии плутеуса. Одинаковы ли эти два набора последовательностей ДНК? Ответ на этот вопрос был получен в опытах, в которых ядерные РНК со стадий бластулы и плутеуса смешивали и затем добавляли их смесь к денатурированной уникальной ДНК. Если эти последовательности отличаются полностью, то следует ожидать, что свяжется 30% ДНК (т.е. 60% генома будут кодировать совместный набор мРНК для бластулы и плутеуса). Если они идентичны, то следует ожидать, что свяжется 15% ДНК. Полученные результаты представлены на рис. 13.4. Смесь связывала только 15% ДНК. Последовательности яРНК бластулы и плутеуса присоединялись к одной и той же ДНК. В пределах ошибки эксперимента можно считать, что популяции яРНК в клетках бластулы и плутеуса идентичны.

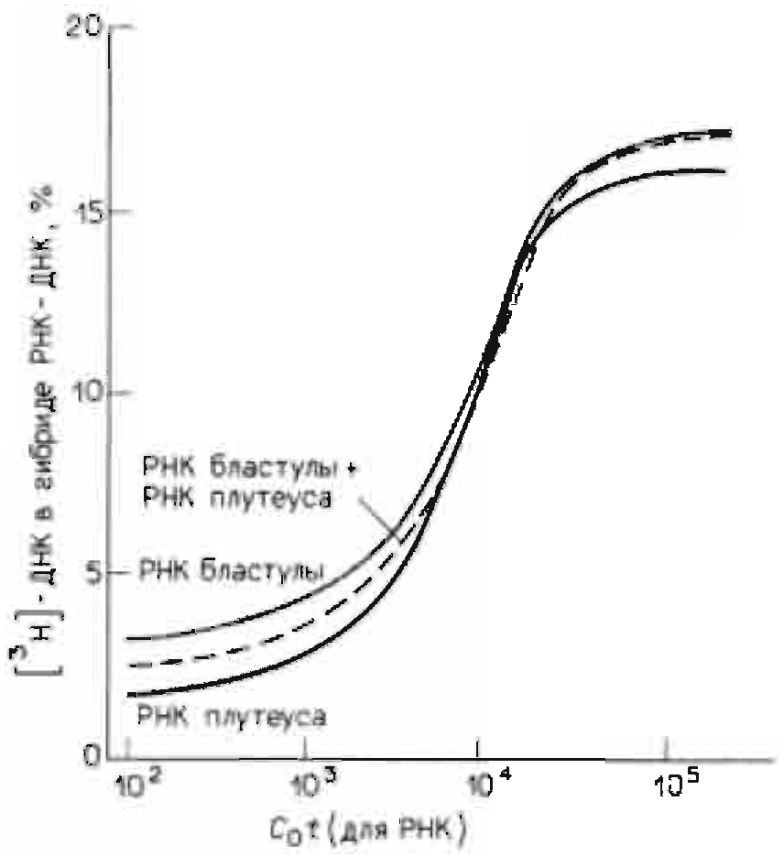


Рис. 13.4. Гибридизация ядерной РНК с уникальной [³H]-ДНК. Радиоактивную уникальную ДНК смешивали с РНК бластулы, РНК плутеуса или со смесью РНК бластулы и плутеуса. Смеси инкубировали в условиях, обеспечивающих гибридизацию всех комплементарных последовательностей. Во всех трех случаях с РНК гибридизовалось около 15% ДНК. (По Kleene, Humphreys, 1977.)

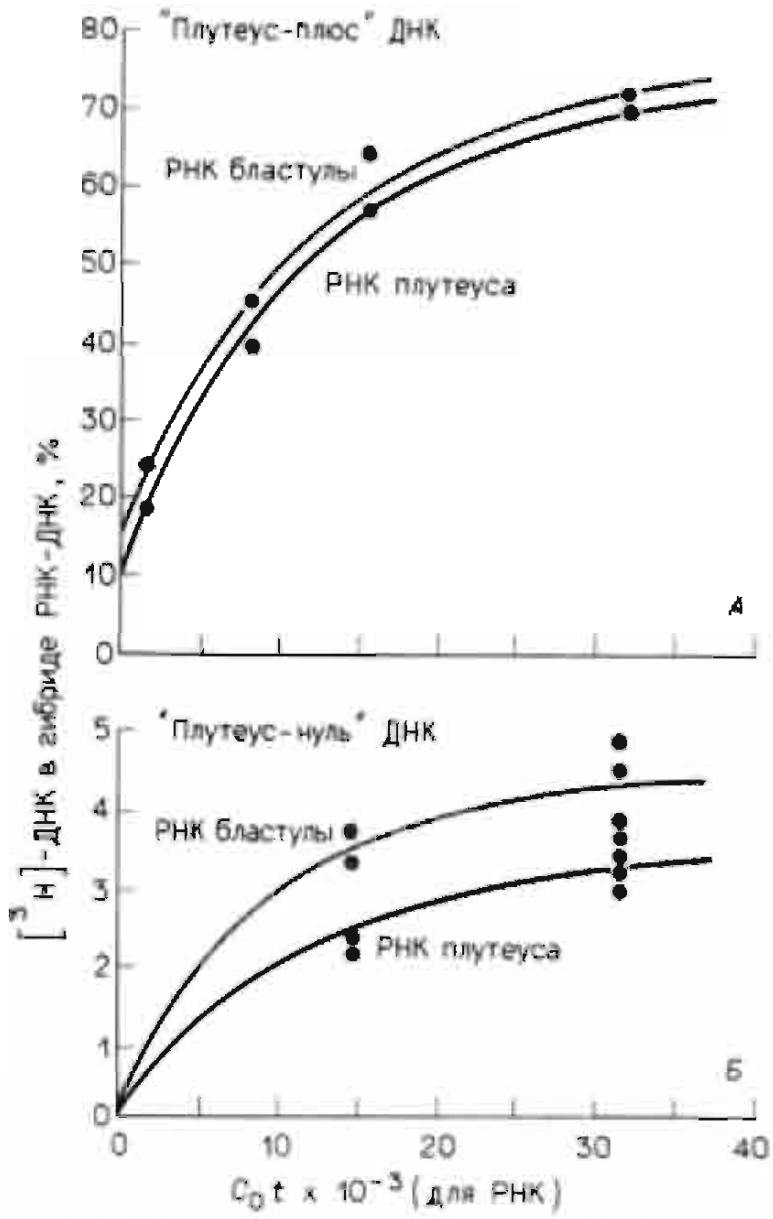


Рис. 13.5. Гибридизация «плутеус-плюс» ДНК и «плутеус-нуль» ДНК с РНК плутеуса и бластулы. *А*. РНК плутеуса и РНК бластулы связывают одинаковые количества «плутеус-плюс» ДНК. *Б*. Ни одна из этих РНК не связывает существенного количества «плутеус-нуль» ДНК. (По Kleene, Humphreys, 1977.)

Чтобы проверить это неожиданное наблюдение, те же исследователи (Kleene, Humphreys, 1977, 1985) выделили радиоактивную уникальную ДНК и смешали ее с РНК бластулы или плутеуса при высоком значении C_0t (чтобы все последовательности ДНК могли присоединить РНК в случае, если комплементарные к ним последовательности РНК имелись в реакции). Затем они выделили те фрагменты ДНК, которые не связались с яРНК бластулы (бластула-нуль-ДНК), и те фрагменты ДНК, которые не связались с яРНК плутеуса (плутеус-нуль-ДНК). Когда бластула-нуль-ДНК денатурировали и смешали с новыми порциями яРНК *плутеуса* и когда плутеус-нуль-ДНК смешали с яРНК *бластулы*, гибридизации выше фоновых значений не наблюдалось (рис. 13.5). Таким образом, последовательности ДНК, транскрибируемые на стадии бластулы, действительно идентичны последовательностям ДНК, транскрибируемым на стадии плутеуса.

Некоторые наиболее убедительные данные, свидетельствующие о контроле за развитием на уровне процессинга, были получены в лаборатории Э. Дэвидсона и Р. Бриттена. Эти авторы впервые обнаружили, что у морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* в ходе развития сложность мРНК прогрессивно уменьшается (Galau et al., 1976). мРНК ооцита связывает приблизительно 4,5% генома и имеет сложность (измеренную по C_0t) около 37 000 000 оснований. При средней длине мРНК в 2000 оснований это соответствует приблизительно 18 500 различным видам информационных РНК. мРНК бластулы связывает только 3,1% генома и представляет около 13 000 видов мРНК, а мРНК гаструлы связывает всего лишь 2,0% ДНК и имеет 8000 видов мРНК. После завершения дифференцировки тканей каждая из них содержит около 6000 видов мРНК, которые гибридизуются только с 0,75% генома (рис. 13.6). Таким образом, часть генома, которая экспрессируется в цитоплазматическую мРНК, постепенно уменьшается.

Следующий вопрос, которым задались исследователи: не вызвано ли такое уменьшение изменениями в транскрипции генома? Другими словами, не уменьшается ли сходным образом разнообразие яРНК? Для ответа на этот вопрос была выделена мРНК бластулы, которую гибридизовали с денатурированной радиоактивной ДНК (Wold et al., 1978).

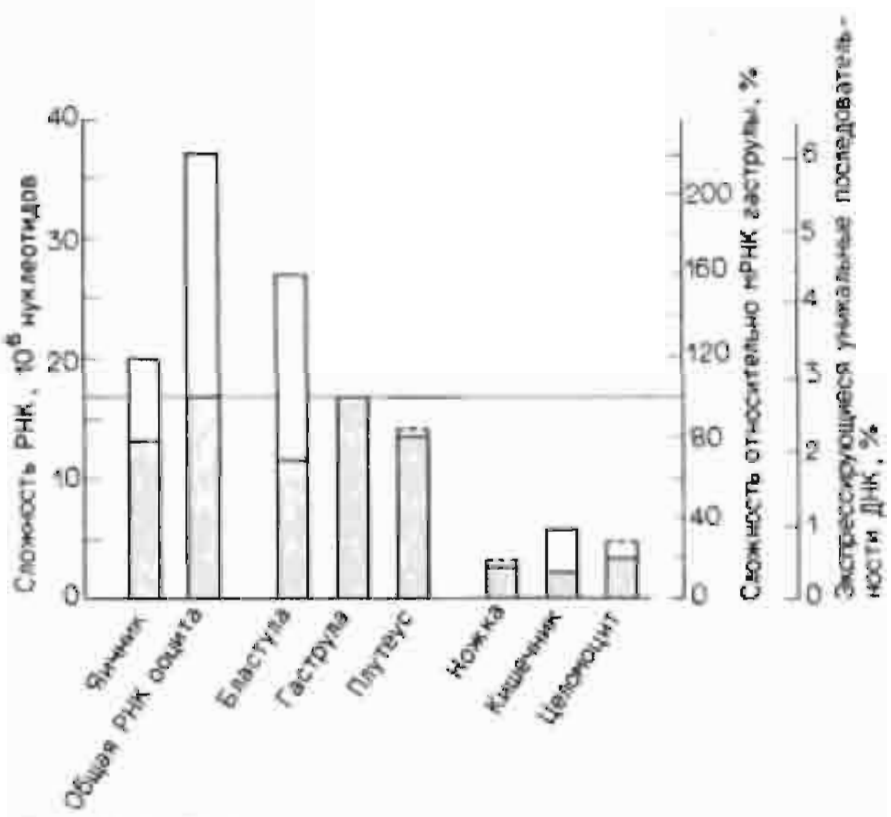


Рис. 13.6. Наборы структурных генов, представленные своими мРНК, в различных тканях морского ежа. Закрашенная часть каждого столбца соответствует фракции мРНК данной ткани, которая идентична мРНК гаструлы. Незакрашенная часть столбца соответствует фракции мРНК, которая отличается от мРНК гаструлы. Сложность указана на оси ординат тремя различными способами; горизонтальная черта соответствует 100% сложности мРНК гаструлы. (По Galau et al., 1976.)

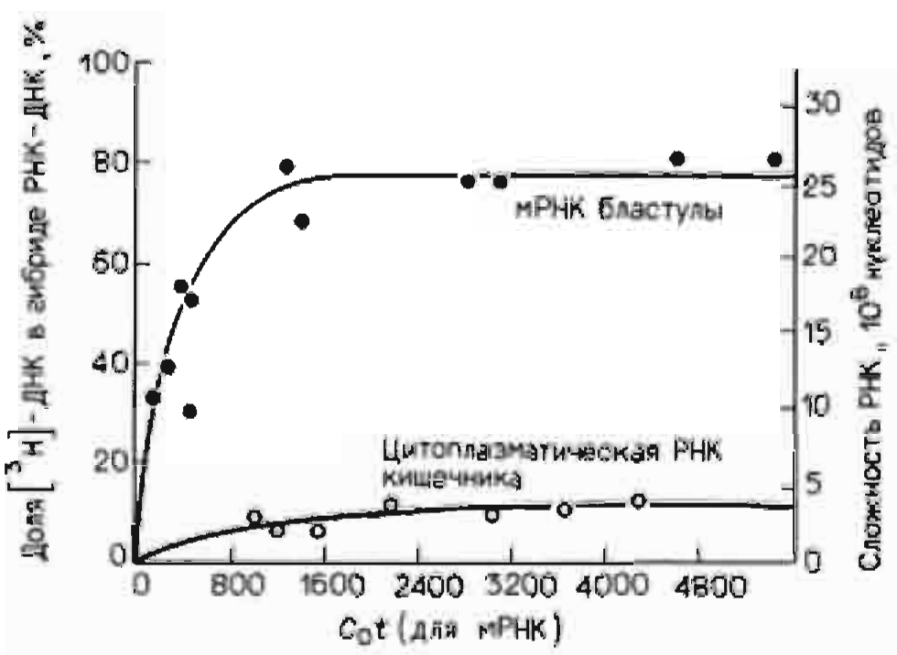


Рис. 13.7. Специфичность мДНК бластулы у морского ежа. Гибридизация мДНК (кДНК для мРНК бластулы) с мРНК бластулы и цитоплазматической РНК кишечника. (По Wold et al., 1978.)

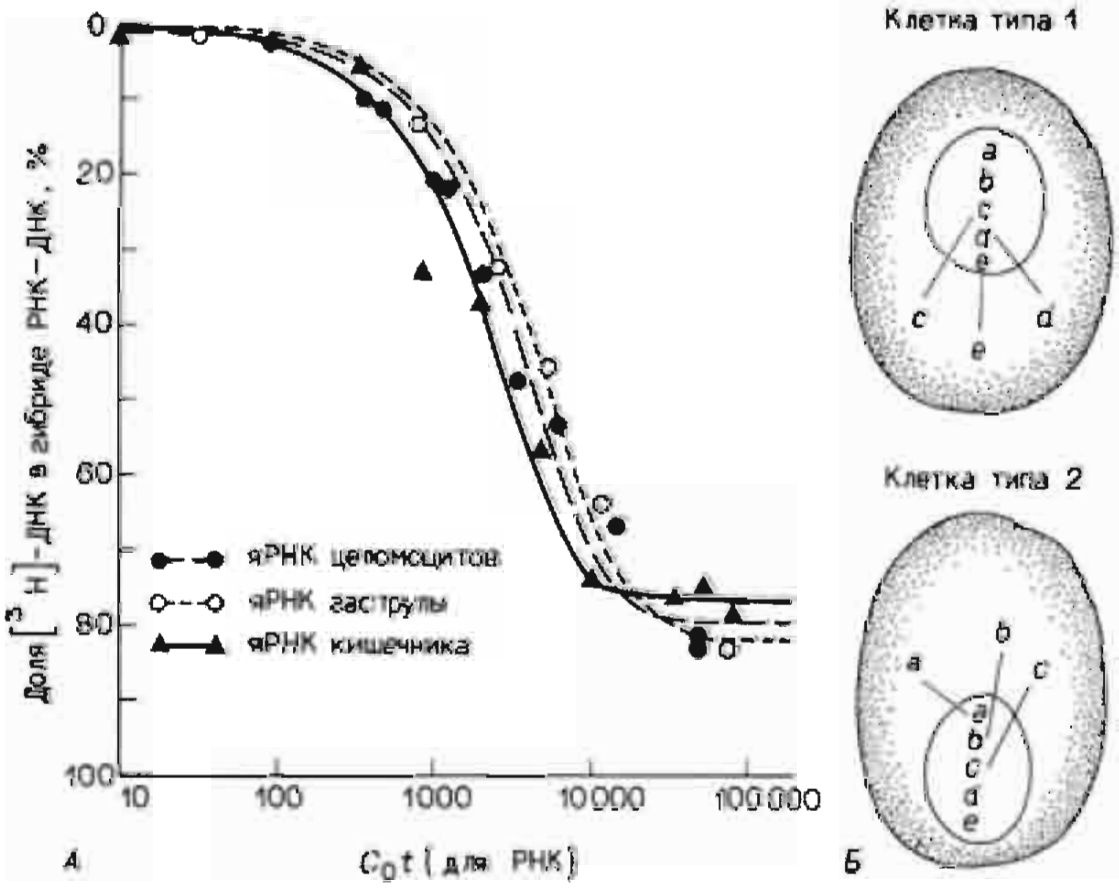


Рис. 13.8. Идентичность (в пределах точности экспериментов) ядерной РНК из дифференцированных тканей морского ежа. *А*. Гибридизация мДНК бластулы с *ядерной* РНК кишечника, целомоцитов и гаструлы. Смеси для гибридизации инкубировали при значениях C_0t достаточно высоких, чтобы обеспечить спаривание всех комплементарных последовательностей. Все последовательности бластулы были обнаружены в каждой популяции ядерных РНК, но не среди цитоплазматических РНК (рис. 13.7). *Б*. Схематическое изображение модели, основанной на дифференциальном процессинге РНК. В клетках обоих типов транскрибируются одинаковые наборы РНК (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*), но процессинг в цитоплазму в клетках одного типа проходят последовательности *c*, *d* и *e*, а в клетках другого типа — последовательности *a*, *b* и *c*. (*А* – из Wold et al., 1978.)

Таблица 13.2. Сравнение тканей по последовательностям структурных генов, представленным в мРНК и яРНК

Источник кДНК-зонда	Нормированная реакция с гомологичной мРНК		Нормированная реакция с гетерологичной мРНК		Нормированная реакция с яРНК	
	мРНК	%	мРНК	%	яРНК	%
Морской еж						
мРНК бластулы (уникальная ДНК)	Бластула	100	Кишечник	12	Кишечник	97
			Целомоциты	13	Целомоциты	101
Мышь						
мРНК мозга (общая кДНК)	Мозг	100	Почки	78	Почки	102
мРНК мозга (кДНК, представляющая редкие мРНК)	Мозг	100	Почки	56	Почки	100

Источник: Davidson, Britten, 1979.

Полученные гибриды элюировали, денатурировали и отделили ДНК от связавшейся с ней РНК. Таким способом был получен ДНК-зонд, который узнает последовательности мРНК бластулы. Эта ДНК обладала высокой специфичностью в отношении последовательностей мРНК бластулы (рис. 13.7): около 78% такой «ДНК бластулы» могли связаться с мРНК бластулы, тогда как с мРНК кишечника взрослой особи могли связаться менее 10% этой ДНК.

Затем эту «мДНК бластулы» использовали для идентификации последовательностей мРНК бластулы в препаратах РНК из различных дифференцированных тканей. Полученные результаты представлены на рис. 13.8 и в табл. 13.2. Последовательности мРНК бластулы были обнаружены в РНК из всех трех использованных в эксперименте тканей взрослых особей. Около 80% мДНК бластулы гибридизовались с яРНК гаструлы, кишечника и целомоцитов. Таким образом, только 10% зонда, узнающего *мРНК бластулы*, будут взаимодействовать с *мРНК кишечника*, но около 80% этого зонда будут взаимодействовать с *ядерной РНК кишечника*. Поскольку контрольный опыт (гибридизация мДНК бластулы с мРНК бластулы) также дает величину 75–80%, выясняется, что *все* последовательности мРНК бластулы присутствуют среди транскриптов яРНК во всех ядрах клеток кишечника, целомоцитов и клеток гаструлы, несмотря на отсутствие этих мРНК в цитоплазме. Ядро транскрибирует специфические для бластулы последовательности даже в дифференцированных целомоцитах и клетках кишечника. Итак, представляется вероятным, что контроль экспрессии генов у морского ежа осуществляется преимущественно на уровне процессинга РНК. Помимо этого аналогичные эксперименты на крысах и мышах свидетельствуют о практически полной идентичности ядерных РНК из мозга, печени и почки (Chikaraishi et al., 1978).

Дополнительные сведения и гипотезы

Механизмы специфического процессинга ядерных РНК

В 1979 г. Дэвидсон и Бриттен предложили модель дифференцировки, основанную на специфическом процессинге ядерных предшественников мРНК. Это довольно гипотетичная модель, и она продолжает оставаться объектом горячих споров. Хотя в этой модели сохранены элементы транскрипционной регуляции, она прямо декларирует независимость биологии развития от моделей «по образцу клеток *colii*», где экспрессия генов контролируется почти исключительно на уровне дифференциальной транскрипции.

Согласно этой модели, молекулы мРНК делятся на три класса в зависимости от их сложности:

1. *Класс сложных (уникальных) мРНК.* 1–15 копий на клетку. Различных видов мРНК этого класса достаточно для кодирования более 10^4 разных белков.
2. *Умеренно повторяющиеся мРНК.* 15–300 копий на клетку. Различных видов мРНК этого класса достаточно для кодирования 500–1000 различных белков.
3. *Избыточные (высокоповторяющиеся) мРНК.*

Этот вид мРНК обнаруживается в дифференцированных клетках, синтезирующих белки какой-либо одной группы. В одной клетке может содержаться от 10^4 до 10^5 копий. Например, клетки яйцевода кур-несушек содержат $1{,}0–1{,}5 \cdot 10^5$ молекул овальбуминовой мРНК. Ретикулоциты мыши и курицы содержат соответственно $4 \cdot 10^4$ и $1{,}5 \cdot 10^5$ молекул глобиновых мРНК на клетку. мРНК кольца Бальбиани 2 из клеток слюнных желез *Chironomus tentans* является еще одним представителем этого класса избыточных мРНК.

Бóльшая часть данных, свидетельствующих о регуляции на уровне транскрипции, получена для класса избыточных мРНК (так как их проще всего очистить и изучить). Однако они могут представлять собой исключение. Обычно эти мРНК кодируют белки, характеризующие определенную клетку, и поэтому представляют конечную стадию дифференцировки, а не ее первопричину. Например, эритроцит проходит долгий путь дифференцировки, прежде чем достигнет стадии, когда начинает синтезироваться глобин. Из предыдущего раздела мы узнали, что последовательности мРНК, специфические для конкретной клетки, можно обнаружить в яРНК клеток всех типов. В табл. 13.2 суммированы некоторые из этих данных. Для уникальных последовательностей РНК, кодирующих белки, характерна цитоплазматическая, а не ядерная специфичность. Противоположная ситуация наблюдается для повторяющихся последовательностей РНК. Транскрипты с умеренно повторяющихся генов не обнаруживаются в мРНК морского ежа, тем не менее внутри ядра проявляется клеточная специфичность в отношении этих последовательностей! В ядерных РНК морского ежа, культивируемых клеток человека и клеток асцитной опухоли крысы повторяющиеся последовательности перемешаны с уникальными (напоминая этим последовательности ДНК). Было обнаружено, что в яРНК зародышей морского ежа имеются специфические РНК-повторы, представленные на различных стадиях развития. Более того, эти повторы в яРНК были представлены *обеими* комплементарными цепями.

Дэвидсон и Бриттен использовали эти данные для построения своей модели экспрессии генов. Во-первых, они предположили, что уникальные гены, которые образуют классы сложных и умеренно повторяющихся мРНК, транскрибируются постоянно с одной и той же скоростью в клетках всех типов. Во-вторых, экспрессия генов регулируется путем определения количества каждого предшественника мРНК, который подвергается процессингу и поступает в цитоплазму. В-третьих, внутриядерные дуплексы РНК–РНК, образуемые комплементарными повторяющимися транскриптами, определяют, какой предшественник мРНК претерпит процессинг. Образование дуплексов в клетках данного типа зависит от внутриядерной концентрации специфических повторов яРНК.

Модель регуляции Дэвидсона и Бриттена представлена на рис. 13.9. «Конститутивная единица транскрипции» (КЕТ) транскрибируется постоянно в клетках всех типов. В результате синтезируется конститутивный транскрипт (КТ), состоящий из кодирующей белок РНК (включая интроны и фланкирующие последовательности) и последовательностей с промежуточной повторяющейся ДНК. В другой области генома находятся «интегрирующие регуляторные единицы транскрипции» (ИРЕТ), которые не содержат структурных генов и транскрибируются специфическим для клеток образом[1]. Эти гены содержат последовательность ДНК (сенсор), которая может включить ИРЕТ в ответ на какой-то конкретный сигнал. ИРЕТ содержит специфические ДНК-повторы и транскрибируется, обеспечивая клетку специфическими интегрирующими регуляторными транскриптами (ИРТ). Между повторами из КТ и комплементарными повторами из ИРТ образуются дуплексы РНК–РНК. Эти дуплексы требуются для сохранения и процессинга яРНК. Если двухцепочечные участки не образуются, то яРНК подвергается гидролизу нуклеазами. Если дуплексы формируются, то яРНК сохраняется, чтобы пройти процессинг и стать мРНК.

Существует множество вариаций на эту тему. Одна из интересных гипотез заключается в том, что активация ИРЕТ может быть эквивалентом того, что принято называть детерминацией. Чтобы ген экспрессировался, требуется активировать как специфический ген (КЕТ), так и ИРЕТ. Если ген не экспрессируется постоянно, необходим двухступенчатый процесс: активация транскрипции структурного гена и активация транскрипции ИРЕТ. Первая активация может представлять детерминацию, тогда как вторая активация будет вызывать экспрессию гена и дифференцировку. В этом случае детерминация клетки может повлечь за собой дифференцировку ядра.

---

[1] Мы вновь видим специфическую для клеток дифференциальную транскрипцию, хотя в этой модели постулируется дифференциальная транскрипция специфических для ядер повторяющихся последовательностей, а не генов, кодирующих белки. Вся дифференцировка возвращается в конце концов к активации специфических генов компонентами цитоплазмы ооцитов или внешними факторами (что, возможно, справедливо для плода млекопитающих).

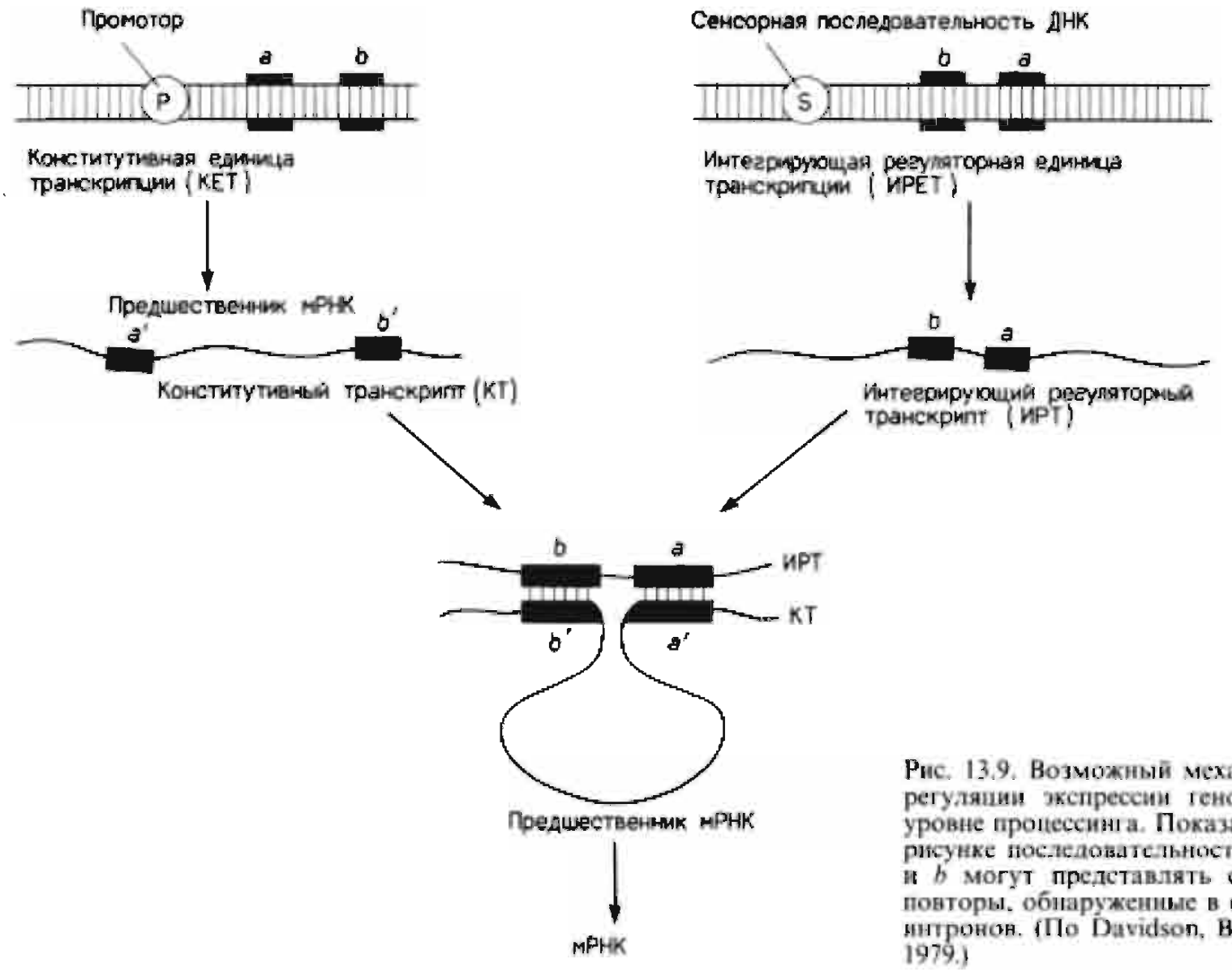


Рис. 13.9. Возможный механизм регуляции экспрессии генов на уровне процессинга. Показанные на рисунке последовательности *a* и *b* могут представлять собой повторы, обнаруженные в областях интронов. (По Davidson, Britten, 1979.)

Присутствие в ядре предшественников мРНК, не прошедших процессинг

Данные, полученные на морском еже, свидетельствуют, что популяции яРНК в различных дифференцированных клетках идентичны, поэтому можно ожидать, что зонды для мРНК, специфичных для одного типа клеток, будут находить комплементарные последовательности в ядрах из неэкспрессирующих клеток. С помощью кДНК глобиновой мРНК были обнаружены предшественники глобиновой мРНК в общей клеточной РНК из печени, мозга и культивируемых клеточных линий мыши (Humphries et al., 1976), а также в яРНК из неиндуцированных клеток больных эритролейкозом Френда (Gottesfeld, Partington, 1977) и из ооцитов *Xenopus* (Perlman et al., 1977). Слабая транскрипция овальбуминовых генов была обнаружена в печени, селезенке, мозге и сердце курицы (Axel et al., 1976; Tsai et al., 1979). Ее уровень соответствует приблизительно одной молекуле, кодирующей овальбумин, на каждые два клеточных ядра; даже те РНК, которые, как известно, регулируются на уровне транскрипции, можно обнаружить в очень небольших количествах в ядрах клеток другой специфичности.

Некоторые из наиболее убедительных данных, свидетельствующих о контроле транскриптов РНК на уровне процессинга, получены в экспериментах с вирусами клеток мыши. В этом случае сплайсинг яРНК с образованием конкретных мРНК может осуществляться в клетках одних типов и не может в других. Вирус полиомы и вакуолизирующий обезьяний вирус 40 (SV40) инфицируют клетки и интегрируются в хозяйские хромосомы. При этом они синтезируют свою собственную РНК, которая продуцирует вирусоспецифические белки. Подобно РНК клетки хозяина, транскрипты вирусов полиомы и SV40 должны вначале подвергнуться сплайсингу, чтобы избавиться от интронов. Стабильные вирусные мРНК могут накапливаться в цитоплазме только после процессинга вирусной РНК. (Молекулы РНК некоторых других вирусов, реплицирующихся в цитоплазме, не нуждаются в сплайсинге.) Недифференцированные стволовые клетки тератокарциномы (гл. 6) непермиссивны для инфицирования и экспрессии генов вирусов полиомы и SV40. Однако, если эти стволовые клетки дифференциру-

ются в клетки соматических типов, они неожиданно становятся доступными для инфицирования этими двумя вирусами. Причиной исходной непермиссивности является, очевидно, неспособность к процессингу РНК. Недифференцированные клетки тератокарциномы не осуществляют сплайсинг предшественников мРНК вируса SV40, тогда как дифференцированные клетки делают это. В стволовых клетках гигантские предшественники мРНК накапливаются и в конце концов разрушаются. Только дифференцированные клетки способны преобразовывать эту ядерную РНК в цитоплазматическую мРНК (Segal et al., 1979). Вирусы, которые не нуждаются в процессинге РНК для экспрессии генов (Синдбис и вирус осповакцины), способны к полноценному росту как в стволовых клетках тератокарциномы, так и в ее дифференцированных производных. Данные о том, что сплайсинг проходит только в дифференцированных клетках мыши (Topp et al., 1977) и производных тератокарциномы, свидетельствуют о зависимости развития клетки от экспрессии собственно ферментов сплайсинга (или их специфических ИРТ-«кофакторов»). Эти агенты, ответственные за процессинг РНК SV40, играют, без сомнения, более подходящую для них роль в клетке и могут отвечать за процессинг некоторых предшественников мРНК, необходимых для клеточной дифференцировки.

Образование альтернативных белков на одном гене: дифференциальный процессинг РНК в иммунной системе

Дифференциальный процессинг РНК оказался чрезвычайно важным для образования ряда специфических белков. Наиболее хорошо изученные случаи относятся к образованию различных иммуноглобулинов (антител) в ходе дифференцировки В-лимфоцитов. Экспрессия генов, кодирующих антитела, в процессе развития лимфоцитов и их ответ на антиген включают в себя многочисленные события, связанные с селекцией и перестройкой генных сегментов. Эти селекция и перестройка осуществляются преимущественно на уровне ДНК (см. гл. 10 и 11). Но некоторые аспекты регуляции экспрессии генов антител проявляются на уровне процессинга РНК.

В процессе своего развития В-лимфоцит, прежде чем он станет клеткой, секретирующей антитела, синтезирует пробные антитела, которые могут секретироваться и встраиваться в плазматическую мембрану. Здесь они функционируют как рецепторы антигена. Поверхностные иммуноглобулины могут принадлежать к классам IgM или IgD в зависимости от стадии развития лимфоцита и от того, контактировал ли он с антигеном того типа, с которым реагируют его антитела. Вначале поверхностные иммуноглобулины относятся к классу IgM; после первой стимуляции антигеном они могут быть одновременно IgM и IgD; впоследствии на клеточной поверхности могут присутствовать только IgD. Но «вариабельная» (антигенсвязывающая) часть иммуноглобулина остается неизменной на протяжении всей жизни конкретного лимфоцита и его дочерних клеток. При этом, как было показано Маки и др. (Maki et al., 1981), переключение с IgM на IgD происходит на уровне процессинга РНК. Синтезируется единый РНК-транскрипт, который содержит экзоны, кодирующие вариабельную (антигенсвязывающую) область и константные области мю (IgM) и дельта

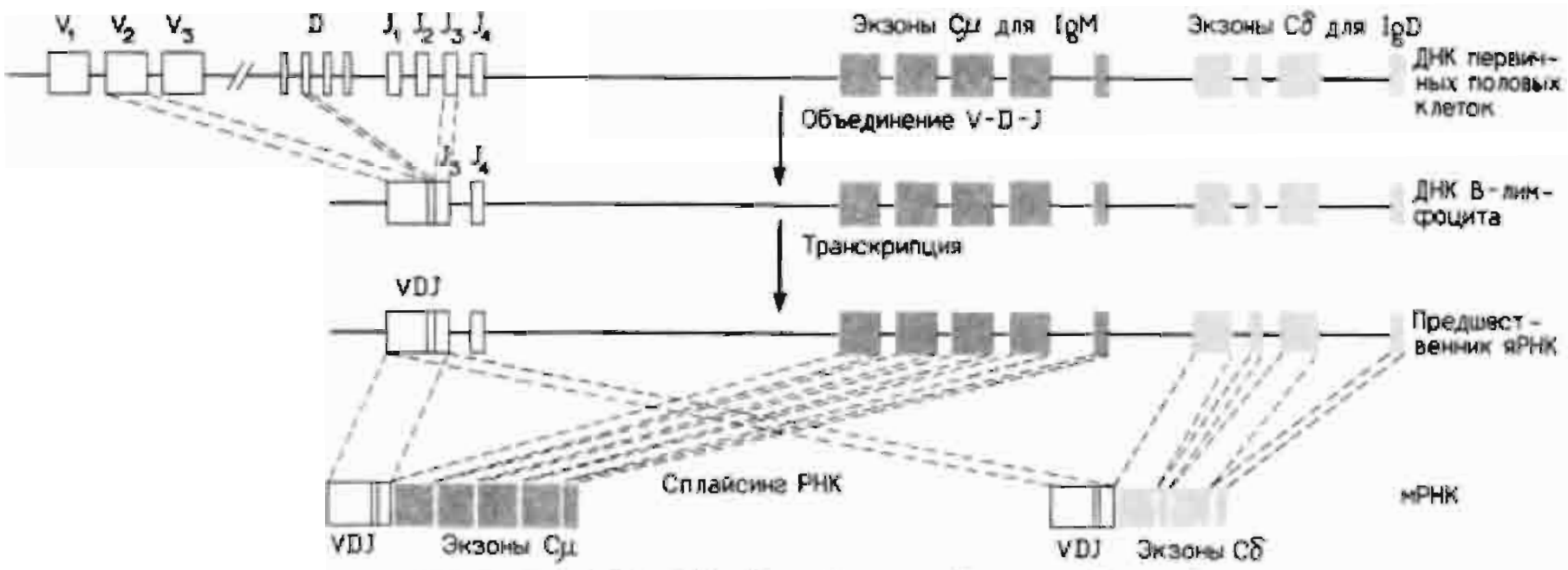


Рис. 13.10. Предлагаемая модель экспрессии IgM и IgD в В-лимфоцитах. Ген тяжелой цепи формируется в ходе развития лимфоцита путем транслокации последовательностей V-, D- и J-областей в положение рядом с последовательностями константной области. Транскрипт этого гена включает в себя обе константные области, μ (IgM) и δ (IgD), вместе с новообразованной вариабельной областью. При альтернативном процессинге могут делетироваться экзоны константной мю-области (Cμ) или экзоны константной дельта-области (Cδ). (По Liu et al., 1980.)

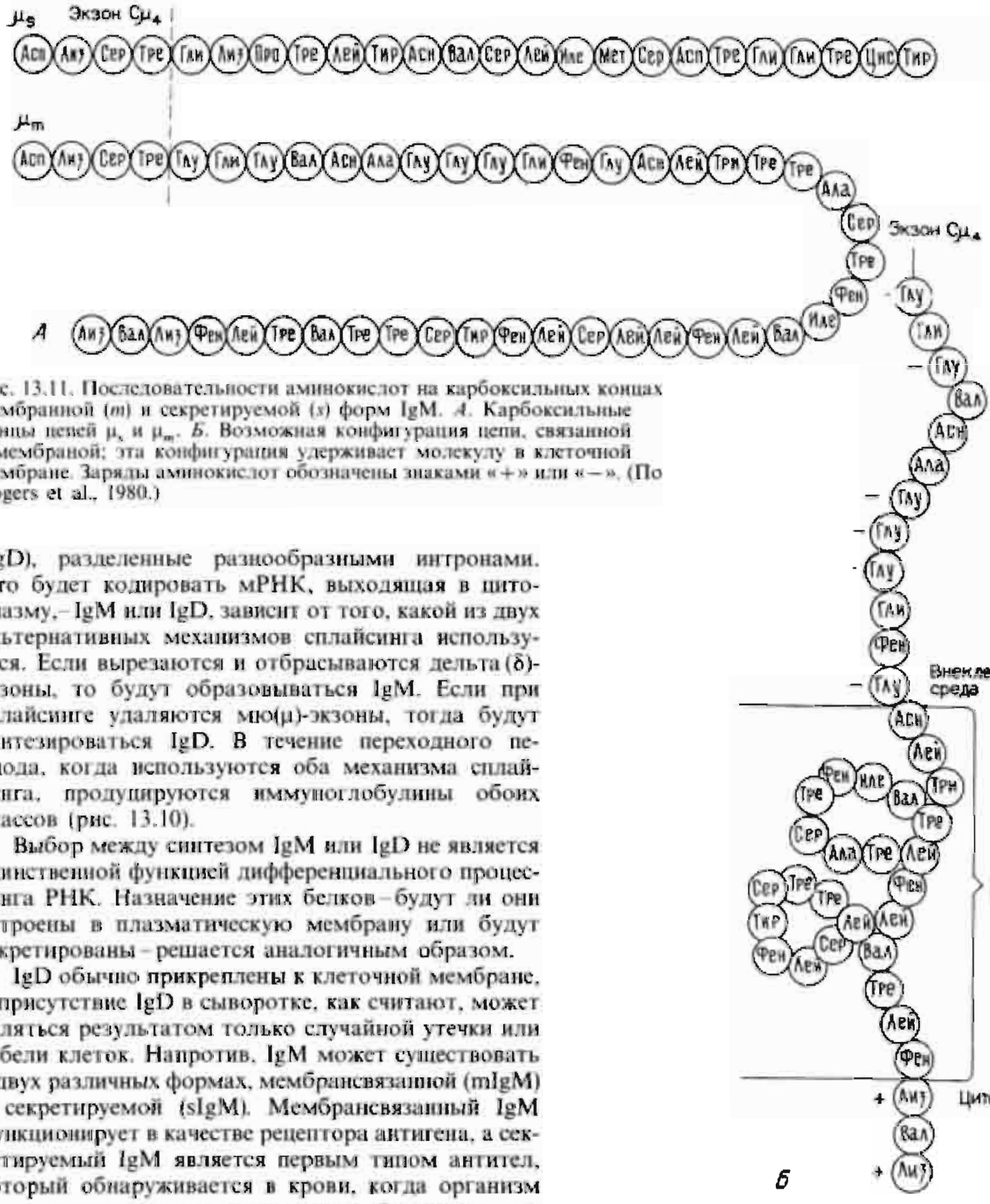


Рис. 13.11. Последовательности аминокислот на карбоксильных концах мембранной (*m*) и секретируемой (*s*) форм IgM. *А*. Карбоксильные концы цепей μ_s и μ_m. *Б*. Возможная конфигурация цепи, связанной с мембраной; эта конфигурация удерживает молекулу в клеточной мембране. Заряды аминокислот обозначены знаками «+» или «—». (По Rogers et al., 1980.)

(IgD), разделенные разнообразными интронами. Что будет кодировать мРНК, выходящая в цитоплазму,– IgM или IgD, зависит от того, какой из двух альтернативных механизмов сплайсинга используется. Если вырезаются и отбрасываются дельта (δ)-экзоны, то будут образовываться IgM. Если при сплайсинге удаляются мю(μ)-экзоны, тогда будут синтезироваться IgD. В течение переходного периода, когда используются оба механизма сплайсинга, продуцируются иммуноглобулины обоих классов (рис. 13.10).

Выбор между синтезом IgM или IgD не является единственной функцией дифференциального процессинга РНК. Назначение этих белков – будут ли они встроены в плазматическую мембрану или будут секретированы – решается аналогичным образом.

IgD обычно прикреплены к клеточной мембране, и присутствие IgD в сыворотке, как считают, может являться результатом только случайной утечки или гибели клеток. Напротив, IgM может существовать в двух различных формах, мембрансвязанной (mIgM) и секретируемой (sIgM). Мембрансвязанный IgM функционирует в качестве рецептора антигена, а секретируемый IgM является первым типом антител, который обнаруживается в крови, когда организм впервые сталкивается с антигеном. Оказалось, что sIgM и mIgM отличаются друг от друга карбоксильными концами (Singer et al., 1980). Эти молекулы идентичны, за исключением того, что мембрансвязанная форма содержит гидрофобный «хвост», который удерживает ее в мембране (рис. 13.11). Молекулы мРНК для мембранной и секретируемой форм IgM различны. Обе они транскрибируются на одном Cμ-гене, однако по-разному проходят процессинг (Rogers et al., 1980; Early et al., 1980; Alt et al., 1980). Секретируемый IgM содержит области, кодируемые генами VDJ и экзонами $C\mu_1$, $C\mu_2$, $C\mu_3$ и $C\mu_4$. Помимо этого он содержит хвостовую часть, которая позволяет ему секретироваться. Мембрансвязанный IgM имеет аналогичное строение, за исключением ответственной за секрецию хвостовой части, вместо которой к нему добавлен фрагмент, кодируемый двумя дополнительными экзонами $C\mu_5$ и $C\mu_6$, которые формируют гидрофобный хвост,

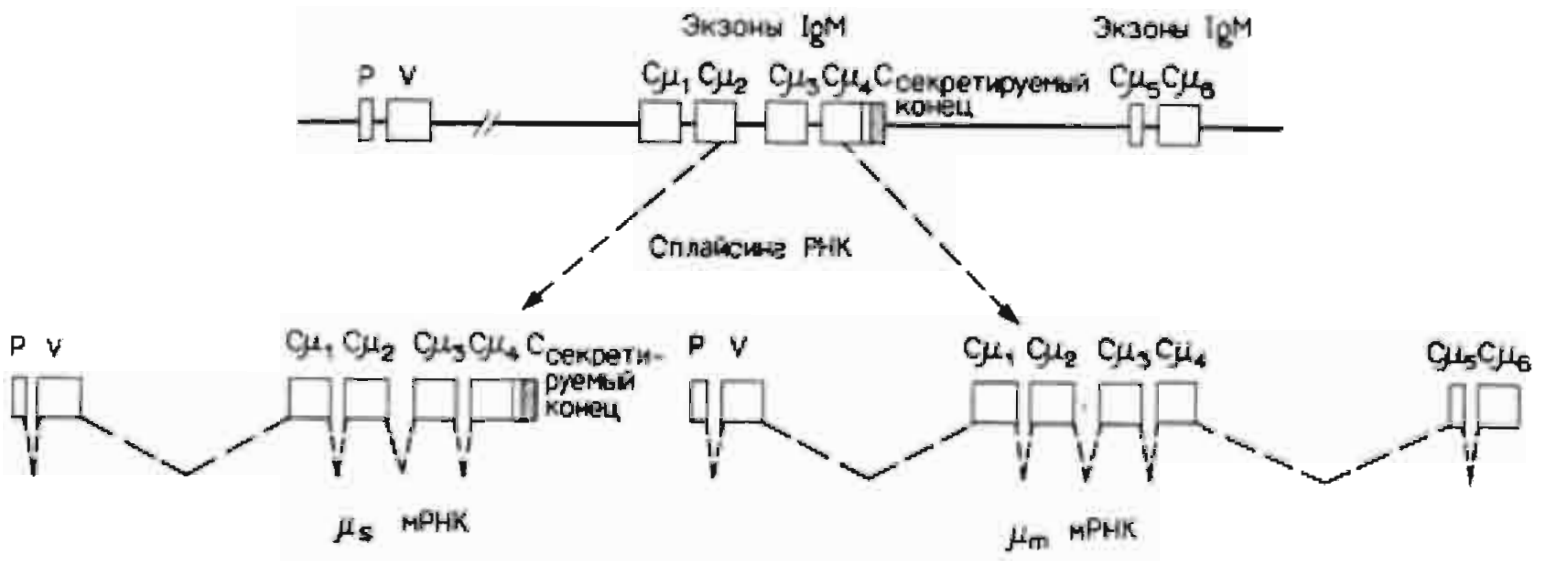


Рис. 13.12. Варианты альтернативного сплайсинга, предложенные для мРНК μ-секретируемой и μ-мембранной форм IgM. P включает в себя лидерную последовательность; V кодирует вариабельную область; с 5'-стороны располагаются возможные экзоны константной β-области (IgM). РНК, удаляемые при сплайсинге (интроны), изображены штриховыми линиями. (По Early et al., 1980.)

способный встраиваться в мембрану лимфоцита. При сплайсинге РНК решается, какая из молекул будет образована, sIgM или mIgM (рис. 13.12).

Помимо этого в процессе формирования антител имеется третий этап, где дифференциальный процессинг РНК играет важную роль. В каждом В-лимфоците синтезируются молекулы лишь одного типа антител, которые кодируются только одной из двух гомологичных хромосом, имеющих такие гены. Это явление называют **аллельным исключением.** Что происходит с другой хромосомой, имеющей гены антител? Группа исследователей обнаружила ядерные РНК, соответствующие неперестроенным или неправильно перестроенным генам антител (Perry et al., 1980). Это наблюдение свидетельствует о том, что происходит транскрипция «неэкспрессирующихся» генов антител, которая не сопровождается процессингом с образованием мРНК.

Дифференциальный процессинг РНК: генерация новых белков в разных клетках в разное время

Дифференциальный процессинг РНК изучали наиболее интенсивно на примере экспрессии иммуноглобулиновых генов, однако было установлено, что он контролирует альтернативные формы экспрессии более чем 50 различных белков (Breitbart et al., 1987). В ряде случаев сплайсинг РНК может создавать в разных клетках различные белки. Процессинг определенного предшественника мРНК в некоторых клетках щитовидной железы поставляет мРНК для гормона кальцитонина. Однако в нервных клетках тот же предшественник мРНК проходит процессинг в мРНК для нейропептида CGRP (рис. 13.13) (Amara et al., 1982; Crenshaw et al., 1987). Это явление интересно само по себе, а также потому, что другой транскрипт после альтернативного сплайсинга генерирует в нейронах образование субстанции P, а в тех клетках щитовидной железы, в которых синтезируется кальцитонин,– субстанции K. Полагают (Crenshaw et al., 1987), что существуют специфичные для нейронов регулирующие сплайсинг факторы, которые функционируют на целом наборе предшественников, способных к альтернативному сплайсингу.

Полагают также, что сходным образом пять различных фибронектинов человека генерируются одним вариантом гена фибронектина. Разнообразные (и в ряде случаев органоспецифические) формы

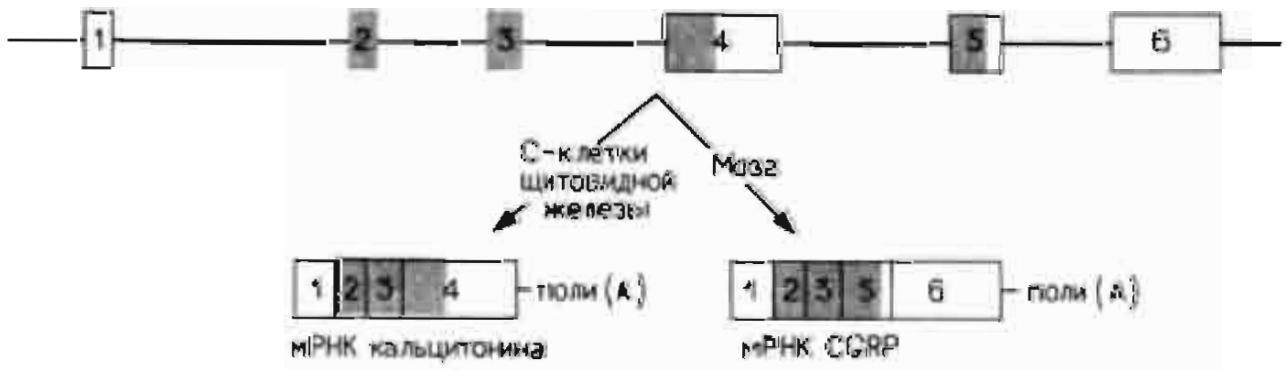


Рис. 13.13. Альтернативный сплайсинг для гена кальцитонина/CGRP. В С-клетках щитовидной железы для формирования мРНК кальцитонина используются экзоны 1, 2, 3 и 4. В клетках мозга для синтеза мРНК нейропептида CGRP используются экзоны 1, 2, 3, 5 и 6. (Из Crenshaw et al., 1987.)

фибронектина транслируются с разных мРНК, возникающих из предшественника фибронектиновой мРНК благодаря соединению вместе различных экзонов (Tamkun et al., 1984; Hynes, 1987). Альтернативный сплайсинг предшественников мРНК генерирует, очевидно, различные формы молекул адгезии нервных клеток N-МКА (Cunningham et al., 1987), а также фетальные и взрослые формы миозинов (Nabeshima et al., 1984; Rozek, Davidson, 1986). Таким образом, альтернативный сплайсинг РНК может создавать семейство белков, кодируемых одним геном.

Если один и тот же предшественник мРНК поразному проходит процессинг в клетках различного типа, то можно ожидать, что образование мРНК зависит от присутствующих в этих клетках факторов процессинга. РНК для тропонина Т – белка, специфичного для мышц и обеспечивающего чувствительность актомиозина к ионам кальция, – образуется в ядре мышечной клетки при сплайсинге, соединяющем вместе определенные экзоны (Breitbart, Nadal-Ginard, 1987). Способность к правильному процессингу предшественника РНК тропонина Т определяется, по-видимому, специфическим для мышц фактором сплайсинга. Немышечные клетки не объединяют нужные экзоны, и этого не делают также одноядерные миобласты. Лишь многоядерные мышечные трубочки содержат фактор, который может обеспечить правильный процессинг яРНК-предшественника этого специфического для мышц белка.

Альтернативный процессинг РНК и детерминация пола

Даже если дифференциальный процессинг РНК действительно генерирует некоторые из белков, характеризующих тип дифференцированных клеток, это не обязательно означает, что альтернативный сплайсинг РНК участвует в более ранних событиях, которые определяют судьбу клеток. Однако недавние исследования убедительно свидетельствуют о том, что дифференциальный процессинг РНК играет основную роль в детерминации полового фенотипа дрозофилы (Baker et al., 1987; Boggs et al., 1987).

Как мы увидим в гл. 21, в развитии полового фенотипа у дрозофилы участвуют группы генов, которые преобразуют отношение Х-хромосома : аутосома в мужской или женский тип. Одним из ключевых генов в этом процессе является ген *transformer*. Этот ген необходим для дифференцировки самок, и его утрата приводит к появлению самцов независимо от соотношения хромосом. На протяжении всего личиночного периода ген *transformer* активно синтезирует транскрипт, который проходит процессинг в неспецифическую мРНК (имеющуюся и у

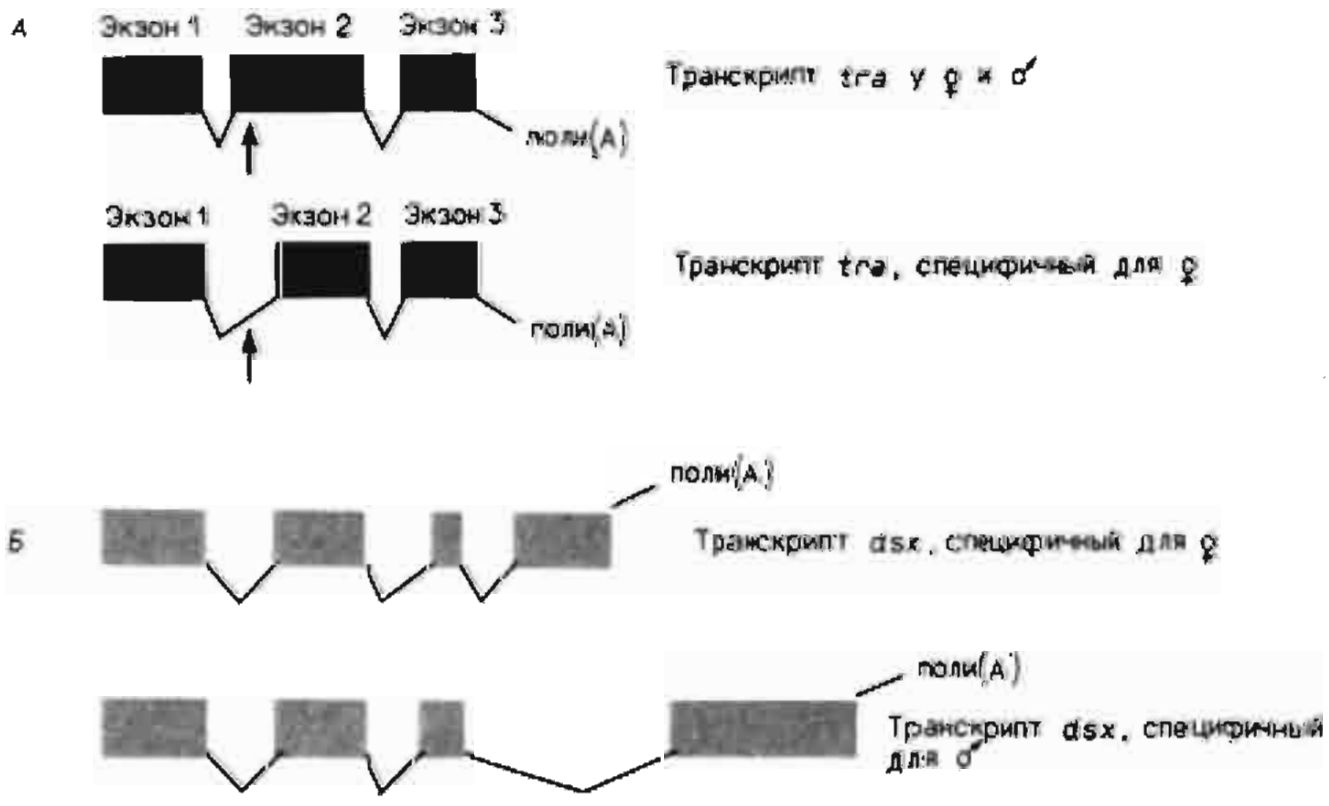


Рис. 13.14. Транскрипты с половой специфичностью в развитии дрозофилы. *А.* Специфичные для самок и общие транскрипционные продукты, генерируемые геном *transformer* с помощью альтернативного сплайсинга РНК. Стрелкой указан стоп-кодон УГА, который присутствует в экзонах общего транскрипта, но не включается в состав мРНК, специфичной для самок, так как расположен в интроне этого гена. Экзоны представлены в виде прямоугольников, интроны изображены тонкими линиями. *Б.* Альтернативный сплайсинг РНК гена *doublesex*. На стадии образования куколки ген *doublesex* будет синтезировать продукты, специфичные для самцов, или продукты, специфичные для самок, в зависимости от того, активны ли гены *tra* и *tra-2*. (*А* – по Boggs et al., 1987; *Б* – по Baker et al., 1987.)

самок, и у самцов) или специфическую для самок мРНК (рис. 13.14, *А*). Только самки содержат мРНК, образованную при альтернативном сплайсинге, и она является единственной функциональной мРНК, синтезируемой этим геном. Неспецифическая мРНК, присутствующая и у самцов, и у самок, содержит стоп-кодон (УГА) в начале второго экзона. В отличие от этого в специфической для самок мРНК кодон УГА находится в интроне и не влияет на трансляцию мРНК. Белок, кодируемый такой мРНК, содержит большое количество аргинина, а его длина составляет около 196 аминокислот (Boggs et al., 1987).

В процессе детерминации пола дрозофилы ген *transformer* контролирует, по-видимому, экспрессию основного гена *doublesex (dsx)*. Ген *doublesex* необходим для формирования фенотипа любого пола, и мутации в этом гене подавляют образование семенников и яичников. На стадии формирования куколки ген *doublesex* синтезирует транскрипт, который может подвергнуться процессингу двумя альтернативными способами. Он может генерировать мРНК, специфичную для самок, или мРНК, специфичную для самцов (рис. 13.14, *Б*) (Baker et al., 1987). У самок и самцов первые три экзона этого гена одинаковы, а четвертые экзоны различаются. В специфичной для самцов РНК делетирован большой фрагмент РНК-предшественника, который включает в себя специфичный для самок экзон.

Авторы этой работы полагают, что гены детерминации пола, функционирующие ранее гена *doublesex* (*transformer* и *transformer-2*), нужны для образования фактора сплайсинга, который обеспечивает процессинг РНК-предшественника в мРНК, специфичную для самок. Если оба гена *transformer* отсутствуют (как при мутациях) или не активны (как у мух, характеризующихся фенотипом XY; см. гл. 21), то транскрипт гена *doublesex* проходит процессинг способом, специфичным для самцов, и образуются самцы. Если эта гипотеза правильна, то дифференциальный процессинг РНК играет исключительно важную роль на протяжении всего индивидуального развития.

Дополнительные сведения и гипотезы

Биохимия процессинга РНК

Как осуществляется сплайсинг предшественников мРНК? Каким образом из одного предшественника могут возникать различные мРНК? Изучение биохимии процессинга РНК началось сравнительно недавно, поэтому в настоящее время мы не можем полностью прояснить эту довольно малоизученную область. Двумя наиболее важными открытиями за последние несколько лет явились обнаружение разветвленных промежуточных продуктов РНК и идентификация каталитических рибонуклеопротеидных частиц внутри ядра.

Сайты сплайсинга

Сравнение последовательностей ДНК большого числа различных генов выявило определенное сходство в местах соединения интронов и экзонов. Последовательность оснований интрона обычно начинается с ГТ, а последовательность оснований экзона обычно оканчивается на АГ (табл. 13.3). Фактически «консенсусная последовательность» для 5′-концов интронов – АГ/ГТ (т.е. большинство экзонов оканчивается на АГ, а интрон начинается с ГТ), а 3′-концевая последовательность большинства интронов – *ТТNЦАГ* (где *N* может быть любым нуклеотидом). Эти сайты оказываются очень важными для процессинга интрона. Болезнь β-талассемия характеризуется генетической недостаточностью продукции β-глобинов. При этом мутации возникают не в экзонах, кодирующих глобиновый белок, а в *интронах*. В случае одной из таких мутаций, приводящих к талассемии, последовательность ТТГГТЦТ в первом интроне изменена на ТТАГТЦТ. Обычный 3′-концевой сайт сплайсинга для этого интрона – ТТАГ/ГЦТ. Поэтому данная мутация создает искусственный сайт сплайсинга, благодаря чему появляется возможность для ошибочного сплайсинга (Spritz et al., 1981). На самом деле β-глобиновый предшественник при талассемии претерпевает сплайсинг в неправильных местах с вероятностью выше 90% (Busslinger et al., 1981).

Сайты разветвления

Помимо сайтов сплайсинга существует еще одна последовательность, необходимая для правильного вырезания интронов. Это **сайт разветвления.** Он расположен внутри интрона обычно на расстоянии около 20–50 нуклеотидов выше 3′-концевого сайта сплайсинга и имеет консенсусную последовательность УАУАДЦ. В большинстве положений У может быть заменен на Ц, а А – на Г. Однако предпоследний (подчеркнутый) остаток А является незаменимым. Этот остаток А имеет ключевое значение,

Таблица 13.3. Последовательности нуклеотидов в местах соединения кодирующих областей и промежуточных последовательностей[1]

Организм	Ген и интрон	Кодирующая последовательность	Промежуточная последовательность	Кодирующая последовательность
Курица	Овальбумин 1	...ТЦАААГ	ГТАГГЦ...ТГЦТЦТАГ	АЦААЦТЦ...
	Овальбумин 2	...АААТААГ	ГТГАГЦ...ААТТАЦАГ	ГТТГТТЦ...
	Овальбумин 3	...АГЦТЦАГ	ГТАЦАГ...ГТАТТЦАГ	ТГТГГЦА...
	Овальбумин 4	...ЦЦТГЦЦА	ГТААГТ...ЦТТТАЦАГ	ГААТАЦТ...
	Овальбумин 5	...АЦАААТГ	ГТААГТ...ТЦТТАААГ	ГААТТАТ...
	Овальбумин 6	...ГАЦТГАГ	ГТАТАТ...ТГЦТЦТАГ	ЦААГААА...
	Овальбумин 7	...ТГАГЦАГ	ГТАТАТ...ЦЦТТГЦАГ	ЦТТГАГА...
Мышь	β^{maj}-глобин 1	...ТГГГЦАГ	ГТГАГЦ...ЦТТТТТАГ	ГЦТГЦТГ...
Кролик	β-глобин 1	...ТГГГЦАГ	ГТГАГЦ...ЦТТТТТАГ	ГЦТГЦТГ...
Мышь	β^{maj}-глобин 2	...ЦТТЦАГГ	ГТГАГТ...ТЦЦЦАЦАГ	ЦТЦЦТГ...
Кролик	β-глобин 2	...ЦТТЦАГГ	ГТГАГТ...ТЦЦТАЦАГ	ЦТЦЦТГ...
Мышь	α-глобин 2	...ЦТТЦААГ	ГТАТГЦ...	
	$V_{\gamma B}$-иммуноглобулин 1	...ТГЦТЦАГ	ГТЦАГЦ...ГТТТГЦАГ	ГАГЦЦА...
	$C_{\gamma 1}$-иммуноглобулин 2	...ТГТАЦАГ	ГТААГТ...АТЦЦТТАГ	ТЦЦАГА...
Крыса	Инсулин I и II-1	...ЦААГЦАГ	ГТАЦТЦ...ТЦТТЦЦАГ	ГТЦАТТГ...
	Инсулин II-2	...ЦЦАЦААГ	ГТААГЦ...ЦЦТТГЦАГ	ТГЦАЦА...
Bombyx mori	Фиброин шелка	...ТЦТГЦАГ	ГТГАГТ...ГТТТТЦАГ	ТАТГТЦГ...
Консенсусная последовательность		АГ / ГТ		ТТ*N*ЦАГ

Источник: Lewin, 1980.

[1] Представлены последовательности ДНК, гомологичные последовательностям РНК, с совмещенными сайтами соединения экзонов и интронов. Точное место сплайсинга указать нельзя, так как последние основания первой кодирующей области обычно повторены на правом конце интрона. В конце таблицы приведены консенсусные последовательности, общие для большинства границ экзон/интрон (АГ/ГТ) и соединений интрон/экзон (ТТ*N*ЦАГ).

поскольку он образует фосфодиэфирное «разветвление» с фосфатом 5′-концевого сайта сплайсинга (рис. 13.15). Он делает это, используя свою свободную 2′-гидроксильную группу для соединения с фосфатом из 5′-сайта сплайсинга. Таким образом, фосфат из ГМФ, вместо того чтобы удерживать первый экзон, высвобождает его и зацепляется за 2′-гидроксильную группу АМФ в сайте разветвления. В результате этого маневра высвобождается первый экзон и образуется «лариатная» (типа лассо) структура в качестве промежуточной.

Свободный 3′-ОН-конец первого экзона присоединяется затем к фосфату в 3′-сайте сплайсинга ниже петли лариата, благодаря чему первый экзон заменяет собой интрон. В результате происходит соединение двух экзонов с помощью группы АГ из первого экзона и Г из второго экзона (Sharp, 1987).

Промежуточный продукт, напоминающий по форме лассо, с 2′—5′ фосфодиэфирной связью был обнаружен в опытах с клонированным фрагментом β-глобинового гена человека, состоящим из первых двух экзонов и интрона между ними (Ruskin et al., 1984). РНК, транскрибированную с этого клона, добавляли в экстракт ядер из клеток человека, способный осуществлять сплайсинг этого «предшественника» по соответствующим сайтам (Krainer et al., 1984). Для завершения этой реакции in vitro требуется около часа, после чего можно изолировать промежуточные продукты с помощью гель-электрофореза (поскольку лариатная структура затрудняет миграцию при электрофорезе). Химический анализ этих промежуточных продуктов подтвердил, что нуклеотид А в сайте разветвления имеет две фосфодиэфирные связи, одну с участием 2′-ОН-группы и одну с участием 3′-ОН-группы. Вскоре после этого были идентифицированы аналогичные промежуточные продукты β-глобиновых транскриптов при процессинге in vivo в зародышах кролика (Zeitlin, Efstratiadis, 1984).

Роль малых ядерных рибонуклеопротеидных частиц

В ядрах многоклеточных организмов реакции сплайсинга не происходят самопроизвольно[1]. На самом деле они катализируются частицами, состоящими из малых ядерных РНК (мяРНК) и белков. Эти малые рибонуклеопротеидные частицы обо-

[1] Вызывает удивление, что такой самопроизвольный сплайсинг на самом деле происходит при удалении интронов из транскриптов митохондриальных генов дрожжей и из рибосомной РНК простейшего *Tetrahymena* (см. Sharp, 1987).

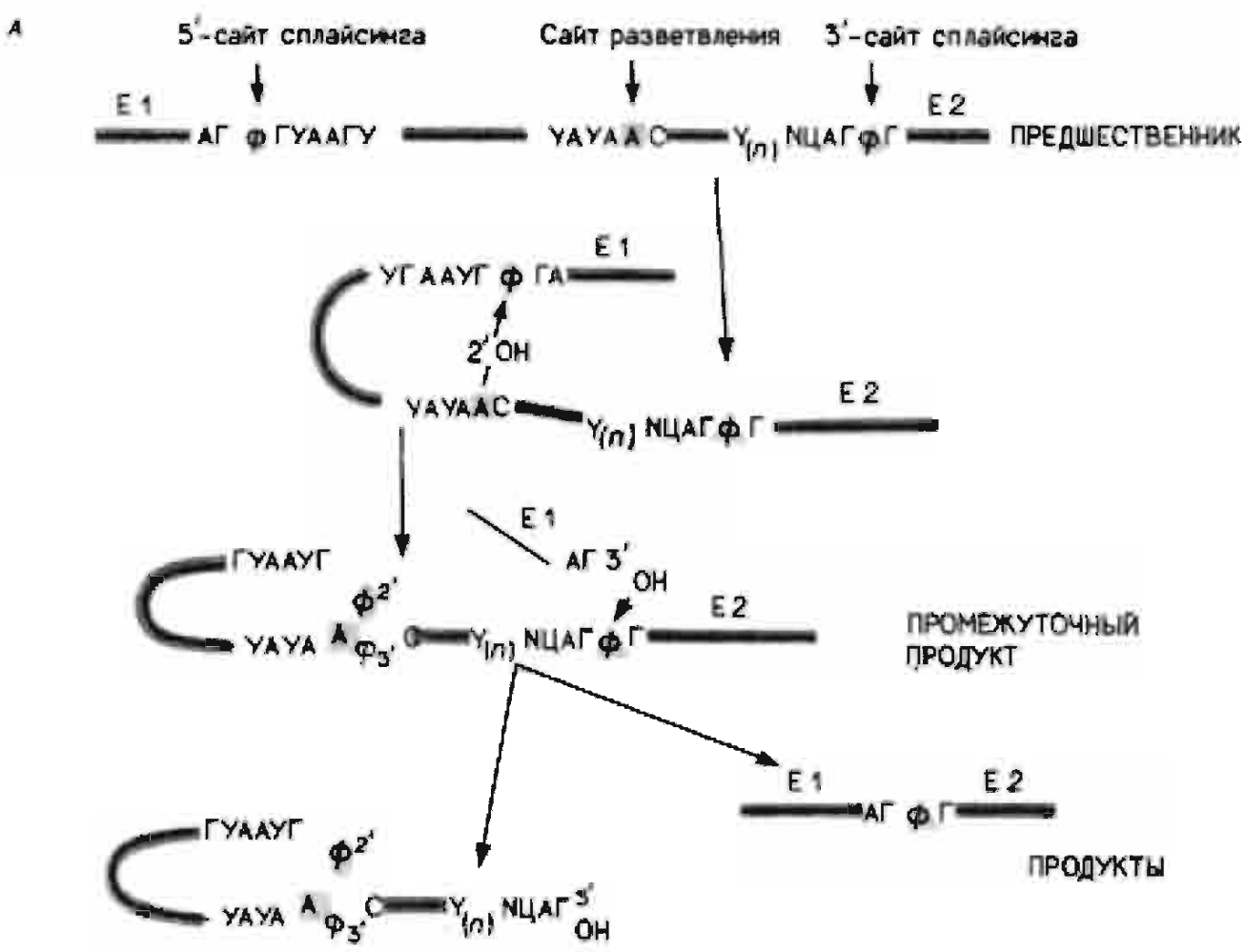


Рис. 13.15. Гипотетический механизм сплайсинга предшественника мРНК. *А*. Схематическое изображение участка предшественника РНК с интроном от 5'-сайта до 3'-сайта сплайсинга. Показаны консенсусные последовательности в местах сплайсинга, а также место разветвления и окружающие его нуклеотиды. Сплайсинг осуществляется в два этапа. Первый этап заключается в формировании структуры типа лассо, когда фосфат с 5'-стороны от места сплайсинга образует фосфодиэфирную связь с 2'-ОН-группой АМФ в сайте разветвления. Образование петли приводит к отсоединению первого экзона (E1). На втором этапе концевая ОН-группа первого экзона замещает интрон на 5'-конце второго экзона (E2). Фосфатные группы, вовлеченные в реакции, обозначены эллипсами или треугольниками. *Б*. Схема замыкания сайта разветвления. (*А* – из Sharp, 1987, с изменениями.)

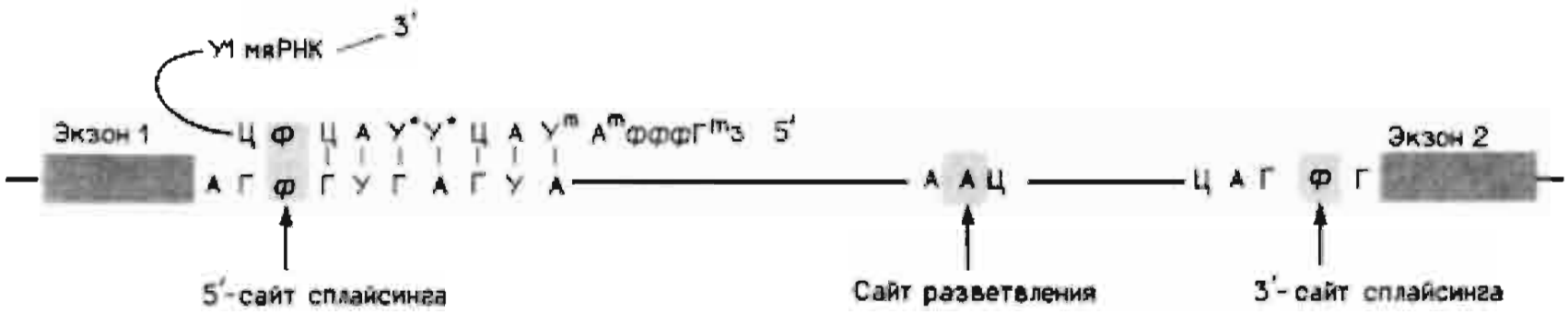


Рис. 13.16. Присоединение U1 мяРНК к 5'-участку сплайсинга интрона. Консенсусная последовательность на 5'-границе экзон – интрон комплементарна к 5'-концу U1 мяРНК. Метильная группа обозначена буквой «m». Посттранскрипционная модификация уридина обозначена звездочкой. (По Padgett et al., 1985.) (На рис. 13.16–13.18 U1 и т. д. мяРНК обозначена как У1 и т. д. мяРНК.)

значают как мяРНП. Существует пять основных мяРНК – U1, U2, U4, U5 и U6, – каждая из которых присутствует в количестве от $2 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^6$ копий на ядро и содержит от 56 до 217 нуклеотидов. Помимо этого в меньших количествах содержатся многочисленные другие мяРНК. Каждая мяРНП-частица содержит одну молекулу мяРНК в комплексе приблизительно с десятью белками (Maniatis, Reed, 1987).

Первые предположения об участии мяРНП в сплайсинге вытекали из наблюдения, что 5'-концевой участок U1 мяРНК комплементарен 5'-сайту сплайсинга интронов (рис. 13.16; Lerner et al., 1980; Rogers, Wall, 1980). Последующие опыты (Mount et al., 1983; Tatei, 1984) показали, что очищенные U1 мяРНП специфически связываются с последовательностями 5'-сайтов сплайсинга в РНК-предшественниках (рис. 13.17), а U2 мяРНП специфически присоединяются к сайтам разветвления. Если U2 мяРНП смешать с предшественниками мРНК и затем добавить РНКазу, то единственной РНК, защищенной от гидролиза, окажется РНК в сайтах разветвления и в участках, окружающих эти сайты (потому что эти участки закрыты присоединенными U2 мяРНП) (Black et al., 1985). Другие мяРНП, вероятно U5, присоединяются к 3'-сайтам сплайсинга, так как эти мяРНП способны защищать 3'-сайт сплайсинга от расщепления РНКазой (Chabot et al., 1985). Полагают, что это взаимодействие опосредовано узнаванием последовательности 3'-сайта белковым, а не рибонуклеиновым компонентом мяРНП (Tazi et al., 1986).

Сплайсинг осуществляется только после того, как различные мяРНК войдут в контакт друг с другом и образуют на предшественнике мРНК **сплайсосому**. Гипотетическая схема сборки сплайсосомы представлена на рисунке 13.16. Когда U1 (и, возможно, U5) мяРНП связываются с предшественником мРНК, они позволяют присоединиться U2. Вероятно, после этого связываются U4, U5 и U6, хотя точный порядок пока не установлен (Grabowski et al., 1985; Black, Steitz, 1986). Сплайсосома, подобно рибосоме, участвует в сближении различных РНК друг с другом и образует новые ковалентные связи. Конкретные субстраты, промежуточные продукты и катализаторы этих реакций пока неизвестны.

Следует помнить также, что сплайсосома не встречается с «голыми» предшественниками мРНК. Сами молекулы пре-мРНК связаны с высококонсервативными основными белками (как показано на рис. 13.18), и эти белки сворачивают РНК в специфические структуры (Skoglund et al., 1983, 1986). Например, комплекс глобиновой яРНК с белком свернут таким образом, что определенные участки предшественника мРНК экспонированы в большей степени, чем другие участки (Patton, Chae, 1985). Поэтому сворачивание РНК этими белками позво-

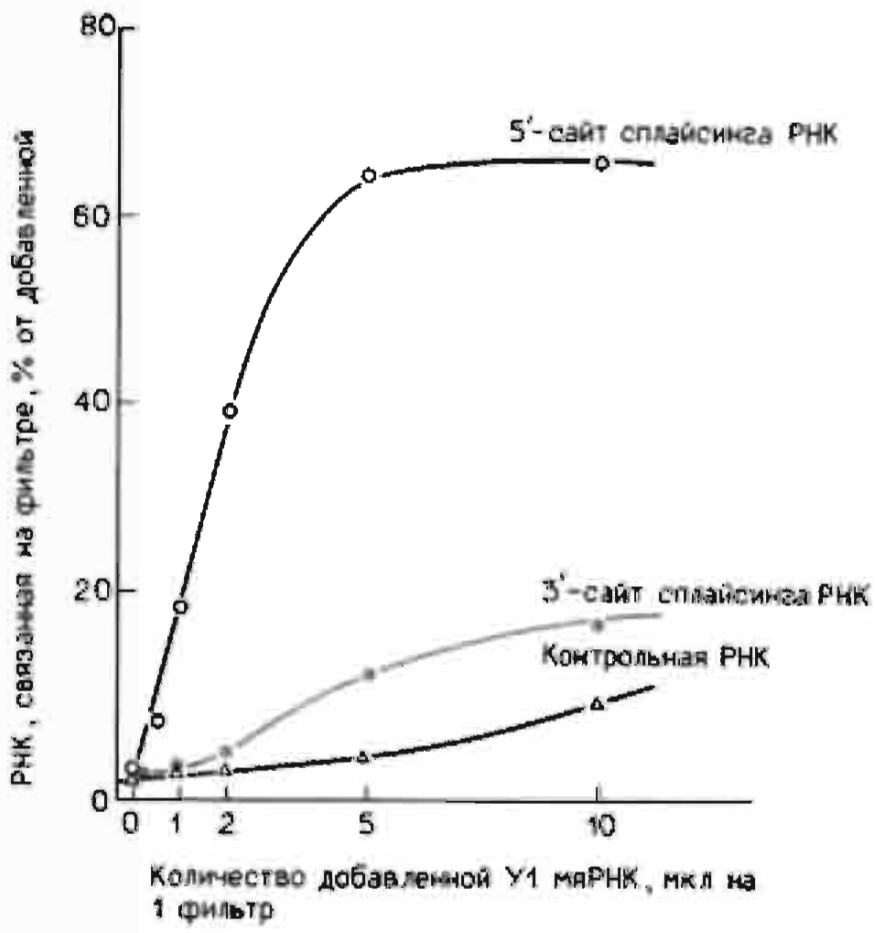


Рис. 13.17. Специфическое связывание U1 мяРНП с очищенными фрагментами РНК. Незначительное связывание наблюдается в случае, когда U1 мяРНП смешивается со всей РНК или с 3'-участками сплайсинга. Значительное связывание наблюдается в случае, когда эти мяРНП смешиваются с фрагментами, содержащими 5'-участки сплайсинга. (Из Tatei et al., 1984.)

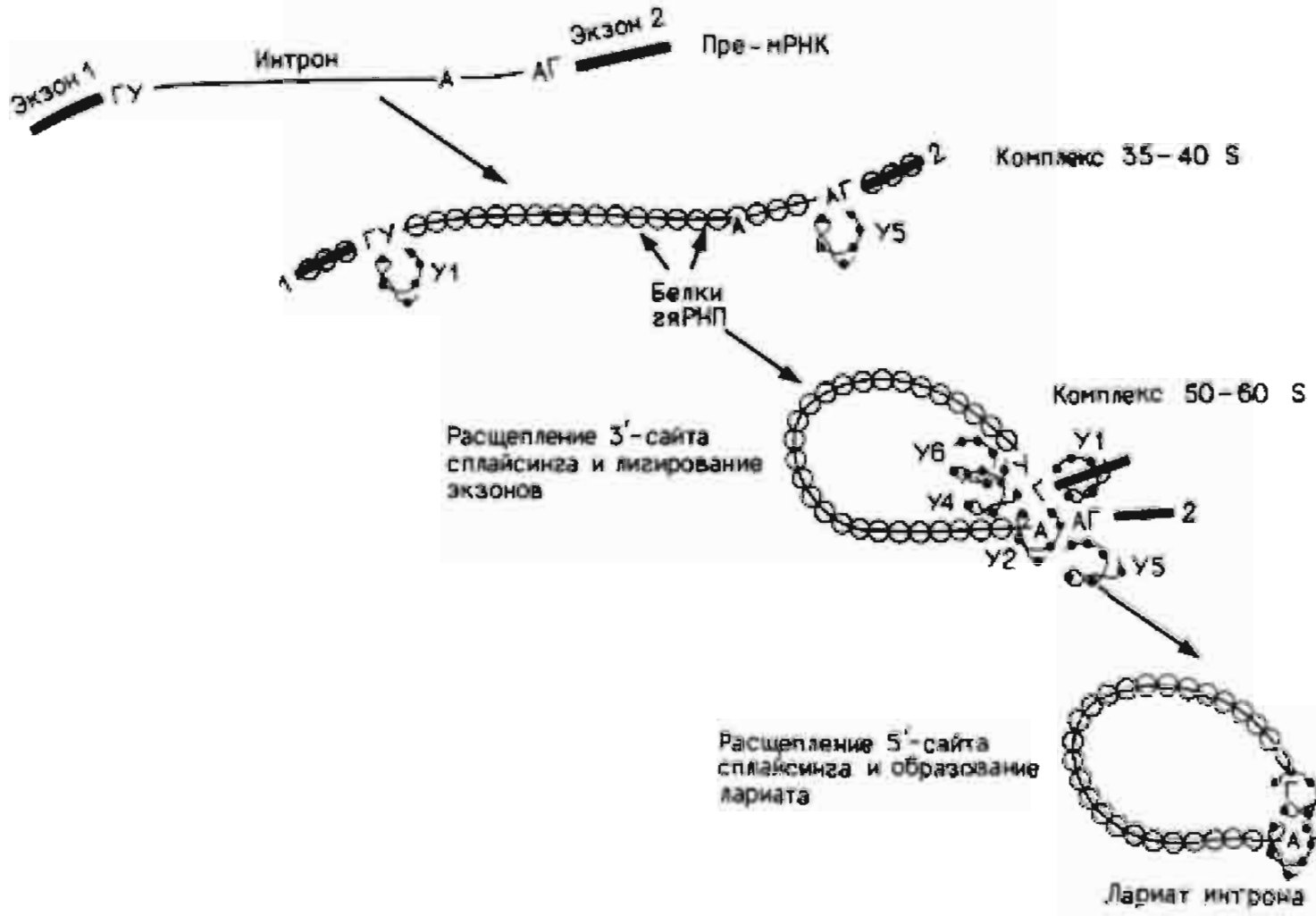


Рис. 13.18. Гипотетическая модель сборки сплайсосомы и сплайсинга пре-мРНК. На первом этапе U1 и U5 мяРНК связываются соответственно с 5'- и 3'-сайтами сплайсинга. К предшественнику мРНК (пре-мРНК) присоединяются также РНК-связывающие белки. Отщепление 5'-экзона происходит, когда 5'-сайт сплайсинга присоединяется к месту разветвления. U2, U4 и U6 мяРНК связываются, по-видимому, рядом с этим местом и образуют сплайсосому, расщепляя 3'-сайт сплайсинга и присоединяя 5'-экзон к 3'-экзону. (По Maniatis, Reed, 1987.)

ляет с большей эффективностью узнавать определенные сайты сплайсинга, чем другие возможные сайты (свойство, которое становится важным, когда интроны простираются на 10 000 или более нуклеотидов). Некоторые из этих белков, связывающих яРНК, могут быть важны также и для сплайсинга. Группа таких белков (С-белки) обнаружена в сплайсосоме, и антитела против этих белков ингибируют разрезание РНК и образование разветвлений (Choi et al., 1986).

Образование 3'-конца РНК

Рибонуклеопротеидные комплексы, как полагают, важны также для определения положения, по которому предшественник мРНК разрезается на 3'-конце и к которому присоединяется полиаденилатный хвост. Первичный РНК-транскрипт содержит 3'-«хвостовую» последовательность, которая простирается далеко за точку, где оканчивается мРНК. Внутри этой области имеется последовательность ААУААА, необходимая для разрезания РНК на расстоянии 10–30 оснований ниже (с 3'-стороны) от этого сайта (Proudfoot, Brownlee, 1976). Мутации в этой последовательности нарушают формирование 3'-конца мРНК (Wickens, Stephenson, 1984; Orkin et al., 1985). Если сайт ААУААА в β-глобиновой РНК человека изменен на ААЦААА, то 3'-конец новой РНК находится на расстоянии 900 нуклеотидов ниже обычного сайта полиаденилирования в пределах 15 нуклеотидов от следующего сайта ААТААА в 3'-фланкирующей области гена. Отрезание 3'-хвоста и полиаденилирование предшествуют сплайсингу, поэтому реакции сплайсинга проходят на полиаденилированном предшественнике мРНК. Кроме того, как мы видели ранее, в некоторых случаях имеются альтернативные сайты присоединения поли(А) (что наблюдается, например, при синтезе иммуноглобулинов). Что контролирует выбор одного из альтернативных поли(А)-сайтов и как присоединяются поли(А)-хвосты, в настоящее время неизвестно.

Возможно, что в узнавании этой последовательности также участвуют мяРНП. Было показано, что антитела к мяРНП осаждают фрагмент РНК, содержащий последовательность ААУААА (Hashimoto, Steitz, 1986), а U7 РНП необходима для разрезания на 3'-хвосте предшественника мРНК гистона Н3 у морского ежа (Strub, Birnstiel, 1987). Механизмы

разрезания РНК-предшественников и присоединения поли(А)-хвостов еще предстоит выяснить.

Имеется ряд примеров, когда транскрипция прекращается преждевременно и получается транскрипт без поли(А)-хвоста. Его отсутствие приводит к быстрому разрушению укороченной РНК. По-видимому, подобным образом регулируются по крайней мере два белка, контролирующие пролиферацию клеток. В покоящихся клетках инициируется транскрипция этих генов, но образуются неполные транскрипты. И лишь в растущих клетках синтезируются полные РНК (Bentley, Groudine, 1987; Bender et al., 1987). По крайней мере в одном из этих примеров мутации вблизи 3'-конца первого экзона (где может происходить преждевременная терминация) вызывают образование полных транскриптов в клетках, в которых в норме транскрипция оканчивается преждевременно (Cesarman et al., 1987). В этих случаях синтезируется белок, стимулирующий рост клеток, и клетки становятся злокачественными.

Транспорт из ядра

До сих пор наиболее загадочным в процессинге РНК остается вопрос о том, как он связан с транспортом мРНК из ядра. Полагают, что мРНК выходит из ядра через ядерные поры. Строение такой поры и РНК, проходящая через нее, показаны на рис. 13.19. Если РНК транскрибируется на ядерном матриксе (как предполагалось в гл. 12), то вполне вероятно, что матрикс содержит также мяРНП, необходимые для ее процессинга. На ядерном матриксе были обнаружены предшественники β-глобиновой мРНК кролика, не прошедшие сплайсинг или прошедшие его частично (Zeitlin et al., 1987), а также прошедшие частично сплайсинг предшественники овальбуминовой мРНК из клеток яйцевода курицы (Ciejek et al., 1982).

Ядерная оболочка со стороны цитоплазмы часто бывает усеяна рибосомами. Не могут ли рибосомы захватывать мРНК, когда она выходит из пор, и вытягивать мРНК из ядер по мере ее трансляции? Мы не можем дать утвердительный ответ на этот вопрос, однако существует по крайней мере один факт, свидетельствующий в пользу такой возможности. При определенной форме β-талассемии человека мутация локализована в 39-м кодоне, который становится кодоном-терминатором. Естественно поэтому, что мутантный ген не синтезирует β-глобин. Но этим не объяснить, почему в цитоплазме

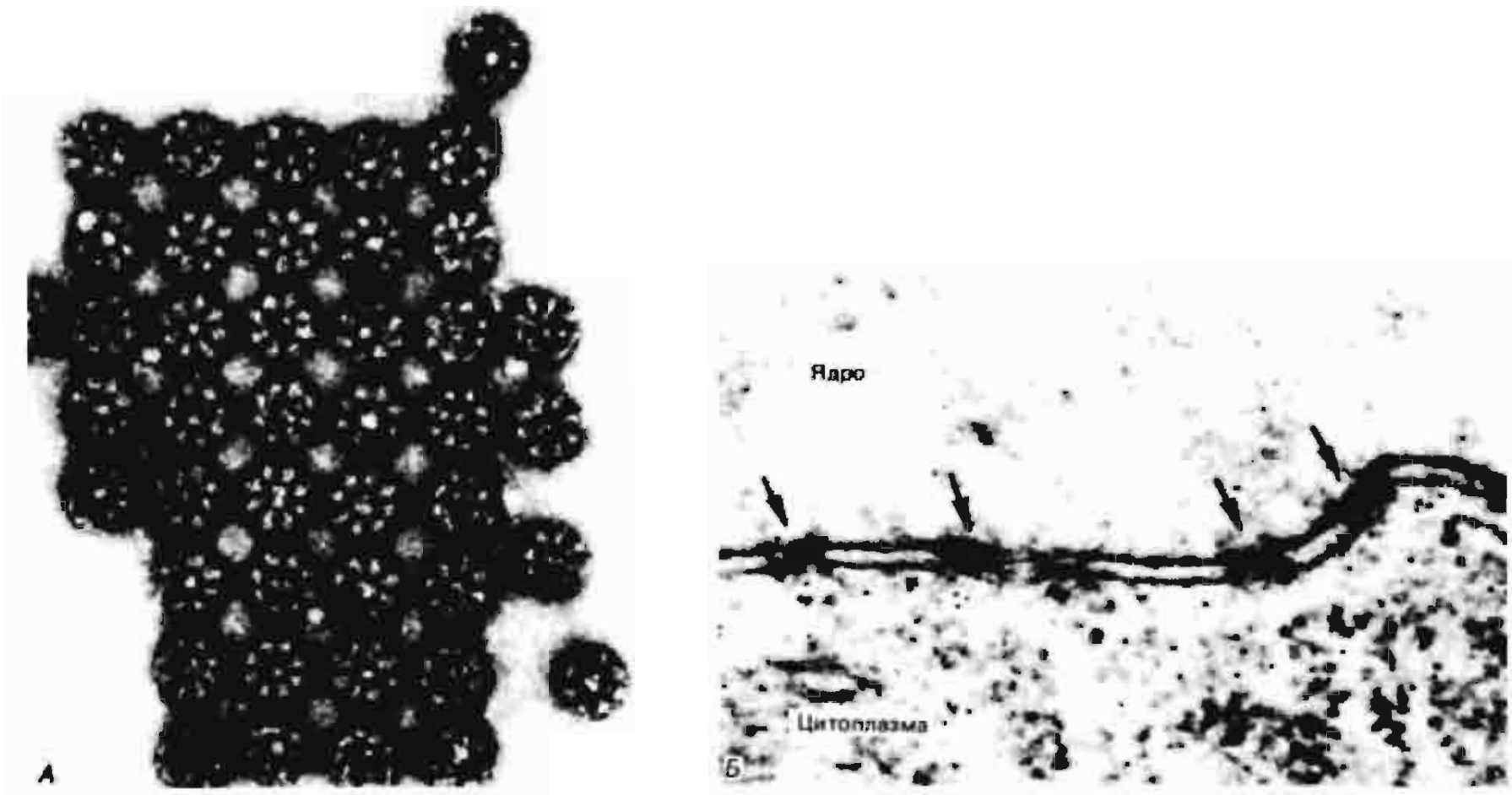


Рис. 13.19. Ядерные поры и транспорт РНК. *А*. Ядерные поры из ооцитов *Xenopus laevis*. Кольцевая структура поры формируется из восьми субъединиц. Внутри этого кольца имеется центральная глобула, которая может представлять собой РНК, покидающую ядро, или регуляторный элемент самой поры. *Б*. Если в ооцит *Xenopus* инъецируют РНК, покрытую частицами золота, то с помощью электронного микроскопа можно наблюдать транспорт этой РНК из ядра. (Комплексы других полимеров с золотом не экспортируются.) На рисунке показаны покрытые золотом молекулы тРНК в процессе транспорта через центральный канал ядерной поры. (*А* – из Unwin, Mulligan, 1982; *Б* – из Dworetzky, Feldherr, в печати; фотографии с любезного разрешения авторов.)

наблюдается дефицит β-глобиновой *мРНК*. Было обнаружено, что мутантная мРНК (синтезированная на клонированном гене in vitro) не уступает в стабильности β-глобиновой мРНК дикого типа (Humphries et al., 1984), и было высказано предположение, что для выхода глобиновой мРНК из ядра, возможно, требуется ее трансляция на цитоплазматической стороне ядерной оболочки (Orkin, Kazazian, 1984). Когда эта трансляция прекращается (из-за образования кодона-терминатора), прекращается также транспорт мРНК из ядра.

Многое предстоит еще выяснить, прежде чем мы сможем указать этапы, на которых происходит регуляция сплайсинга РНК в развитии. Это могло бы происходить при связывании мяРНП, образовании сплайсосомы, формировании 3'-конца или при транспорте РНК в цитоплазму. Была отмечена гетерогенность U1 класса мяРНП и высказано предположение, что у зародышей *Xenopus* существует не менее 7 различных типов U1 мяРНК и они характерны для различных периодов развития (Forbes et al., 1984). Авторы этой работы полагают, что различия в последовательностях мяРНК могли бы обусловливать присоединение различных белков, а это в свою очередь позволило бы осуществлять сплайсинг различных предшественников мРНК. Однако в настоящее время мы не можем указать на конкретный внутриядерный механизм селекции определенных специфических РНК-предшественников для процессинга в тканеспецифические цитоплазматические мРНК.

Резюме

Процессинг РНК должен рассматриваться как основной способ регуляции дифференциальной экспрессии генов. Экспериментальные данные свидетельствуют, что он определяет популяцию специфических для клеток мРНК при развитии морского ежа и, по-видимому, также мыши и крысы. Секвенирование ДНК и РНК показало, что дифференциальный процессинг РНК может приводить к возникновению различных белков в клетках разных типов (кальцитонин или CGRP; IgM или IgD) или в разные периоды в одной клеточной линии (мембранесвязанные и секретируемые IgM; миозины). Полагают также, что регуляция дифференциального процессинга ответственна за детерминацию полового фенотипа дрозофилы. Раскрытие механизма, лежащего в основе дифференциального процессинга РНК, возможно, позволит нам проникнуть в суть клеточной дифференцировки и эбриональной детерминации.

Литература

Alt F.W., Bothwell A.L.M., Knapp M.N., Siden E., Mather E., Koshland M., Baltimore D. (1980). Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin μ heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. Cell **20**, 293–301.

Amara S.G., Jonas V., Rosenfeld M.G., Ong E.S., Evans R.M. (1982). Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. Nature **298**, 240–244.

Axel R., Feigleson P., Schutz G. (1976). Analysis of the complexity and diversity of mRNA from chicken liver and oviduct. Cell **7**, 247–254.

Baker B., Nagoshi R.N., Burtin K.C. (1987). Molecular genetic aspects of sex determination in *Drosophila*. BioEssays **6**, 66–70.

Bastos R.N., Aviv H. (1977). Globin RNA precursos molecules: Biosynthesis and processing erythroid cells. Cell **11**, 641–650.

Bender T.P., Thompson C.B., Kuehl W.M. (1987). Differential expression of c-*myb* mRNA in murine B lymphomas by a block to transcription elongation. Science **237**, 1473–1476.

Bentley D.L., Groudine M. (1987). A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-*myc* in differentiated HL60 cells. Nature **321**, 702–706.

Black D.L., Charbot B., Steitz J. (1985). U2 as well as U1 small nucleus ribonucleoproteins are involved in pre-mRNA splicing. Cell **42**, 737–750.

Black D.L., Steitz J.A. (1986). Pre-mRNA splicing in vitro requires intact U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein. Cell **46**, 697–704.

Boggs R.T., Gregor P., Idriss S., Belote J.M., McKeown M. (1987). Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene. Cell **50**, 739–747.

Breitbart R.E., Andreadis A., Nadal-Ginard B. (1987). Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. Annu. Rev. Biochem. **56**, 467–495.

Breitbart R.E., Nadal-Ginard B. (1987). Developmentally induced, muscle-specific factors control the differential splicing of alternative and constitutive troponin T exons. Cell **49**, 793–803.

Britten R.J., Kohne D.E. (1968). Repeated sequences in DNA. Science **161**, 529–540.

Busslinger M., Moschonas N., Flavell R.A. (1981). β$^+$ thalassemia: Aberrant splicing results from a single point mutation in an intron. Cell **27**, 289–298.

Cesarman E., Dalla-Favera R., Bentley D., Groudine M. (1987). Mutations in the first exon are associated with altered transcription in c-*myc* in Burkitt lymphoma. Science **238**, 1272–1275.

Chabot B., Black D.L., LeMaster D.M., Steitz J.A. (1985). The 3' splice site of pre-messenger RNA is recognized by a small ribonucleoprotein. Science **230**, 1344–1349.

Chikaraishi D.M., Deeb S.S., Sueoka N. (1978). Sequence complexity of nuclear RNAs in adult rat tissues. Cell **13**, 111–120.

Choi Y.-D., Dreyfuss G. (1984). Isolation of the heterogeneous nuclear RNA–ribonucleoprotein complex (hnRNP): A unique supramolecular assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 7471–7475.

Ciejek E.M., Nordstrom J.L., Tsai M.J., O'Malley B.W. (1982). Ribonucleic acid precursors are associated with the chick oviduct nuclear matrix. Biochem. **21**, 4945–4953.

Crenshaw E.B., III, Russo A.F., Swanson L.W., Rosenfeld M.G. (1987). Neuron-specific alternative RNA processing in transgenic mice expressing a metallothionein–calcitonin fusion gene. Cell **49**, 389–398.

Cunningham B.A., Hemperly J.J., Murray B.A., Prediger A.E., Brackenbury R., Edelman G.M. (1987). Neural cell adhesion

molecule: Structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. Science **236**, 799–806.

Davidson E. H., Britten R. J. (1979). Regulation of gene expression: Possible role of repetitive sequences. Science **204**, 1052–1059.

Dworetzky S., Feldherr C. In press. RNA efflux through the nuclear pore.

Early P., Rogers J., Davis M., Calame K., Bond M., Wall R., Hood L. (1980). Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin gene by alternative RNA processing pathways. Cell **20**, 313–319.

Forbes D. J., Kirschner M. W., Caput D., Dahlberg J. E., Lund E. (1984). Differential expression of multiple U1 small nuclear RNAs in oocytes and embryos of *Xenopus laevis*. Cell **38**, 681–689.

Galau G. A., Klein W. H., Davis M. M., Wold B. J., Britten R. J., Davidson E. H. (1976). Structural gene sets active in embryos and adult tissues of the sea urchin. Cell **7**, 487–505.

Gottesfeld J. M., Partington G. A. (1977). Distribution of messenger RNA coding sequences in fractionated chromatin. Cell **12**, 953–962.

Grabowski P. J., Seiler S. R., Sharp P. A. (1985). A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. Cell **42**, 345–353.

Hames B. D., Perry R. P. (1977). Homology relationship between the messenger RNA and heterogeneous nuclear RNA of mouse L cells. A DNA excess hybridization study. J. Mol. Biol. **109**, 437–453.

Hashimoto C., Steitz M. A. (1986). A small ribonucleoprotein associates with the AAUAAA polyadenylation signal in vitro. Cell **45**, 581–591.

Hood L. E., Wilson J. H., Wood W. B. (1975). The Molecular Biology of Eukaryotic Cells. Benjamin, New York.

Humphries R. K., Ley T. J., Anagnou N. P., Baur A. W., Nienhuis A. W. (1984). β -39 thalassemia gene: A premature termination codon causes β-mRNA deficiency without affecting cytoplasmic β-mRNA stability. Blood **64**, 23–32.

Humphries S., Windass J., Williamson J. (1976). Mouse globin gene expression in erythroid and nonerythroid tissue. Cell **7**, 267–277.

Hynes R. O. (1987). Fibronectins: A family of complex and versatile adhesive glycoproteins derived from a single gene. Harvey Lect. **81**, 133–152.

Kleene K. C., Humphreys T. (1977). Similarity of hnRNA sequences in blastula and pluteus stage sea urchin embryos. Cell **12**, 143–155.

Kleene K. C., Humphreys T. (1985). Transcription of similar sets of rare maternal RNAs and rare nuclear RNAs in sea urchin blastulae and adult coelomocytes. J. Embryol. Exp. Morphol. **85**, 131–149.

Krainer A. R., Maniatis T., Ruskin B., Green M. R. (1984). Normal and mutant human β-globin pre-messenger RNAs are faithfully and efficiently spliced in vitro. Cell **36**, 993–1005.

Lerner M. R., Boyle J. A., Mount S. M., Wolin S. L., Steitz J. A. (1980). Are snRNPs involved in splicing? Nature **283**, 220–224.

Lewin B. (1980). Gene Expression 2, 2nd Ed. Wiley-Interscience, New York, pp. 694–760.

Liu C.-P., Tucker P. W., Mushinski F., Blattner F. R. (1980). Mapping of heavy chain genes for mouse immunoglobulins M and G. Science **209**, 1348–1353.

Maki R., Roeder W., Traunecker A., Sidman C., Wabl M., Rasjhke W., Tonegawa S. (1981). The role of DNA rearrangement and alternate mRNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. Cell **24**, 353–365.

Maniatis T., Reed R. (1987). The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. Nature **325**, 673–678.

McCarthy B. J., Hoyer B. H. (1964). Identity of DNA and diversity of RNA in normal mouse tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **52**, 915–922.

Mount S. M., Pettersson I., Hinterberger M., Karmas A., Steitz J. (1983). The U1 small nuclear RNA–protein complex selectively binds a 5′ splice site in vitro. Cell **33**, 509–518.

Nabeshima Y., Fuji-Kuriyama Y., Muramatsu M., Ogata K. (1984). Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin light chains from one gene. Nature **308**, 333–338.

Orkin S. H., Cheng T.-C., Antonarakis S. E., Kazazian H. H., Jr. (1985). Thalassemia due to a mutation in the cleavage–polyadenylation signal of the human β-globin gene. EMBO J. **4**, 453–456.

Orkin S. H., Kazazian H. H. (1984). The mutation and polymorphism of the human β-globin gene and its surrounding DNA. Annu. Rev. Genet. **18**, 131–171.

Padgett R. A., Grabowski P. J., Konarska M. M., Sharp P. A. (1985). Splicing messenger RNA precursors: Branch sites and lariat RNAs. Trends Biochem. Sci. **10**, 154–157.

Patton J. R., Chae C.-B. (1985). Specific regions of the intervening sequences of β-globin RNA are resistant to nuclease in 50 S heterogeneous nuclear RNA–protein complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 8414–8418.

Perlman S. M., Ford P. J., Rosbash M. M. (1977). Presence of tadpole and adult globin RNA sequences in oocytes of *Xenopus laevis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 3835–3839.

Perry R. P., Kelley D. E., Coleclough C., Seidman J. G., Leder P., Tonegawa S., Matthyssens G., Weigart M. (1980). Transcription of mouse κ chain genes: Implications for allelic exclusion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 1937–1941.

Proudfoot N. J., Brownlee G. G. (1976). 3′ Noncoding region sequences in eukaryotic messenger RNA. Nature **263**, 211–214.

Rogers J., Early P., Carter C., Calame K., Bond M., Hood L., Wall R. (1980). Two mRNAs with different 3′ ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin μ chain. Cell **20**, 303–312.

Rogers J., Wall R. (1980). A mechanism for RNA splicing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 1877–1879.

Rozek C. E., Davidson N. (1986). Differential processing of RNA transcribed from single-copy *Drosophila* myosin heavy chain gene produces four mRNAs that encode two polypeptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 2128–2132.

Ruskin B., Krainer A. R., Maniatis T., Green M. R. (1984). Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. Cell **38**, 317–331.

Scheller R. H., Costantini F. D., Kozlowski M. R., Britten R. J., Davidson E. H. (1978). Specific representation of cloned repetitive DNA sequences in sea urchin RNAs. Cell **15**, 189–203.

Segal S., Levine A. J., Khoury G. (1979). Evidence for non-spliced SV40 RNA in undifferentiated murine teratocarcinoma stem cells. Nature **280**, 335–338.

Sharp P. A. (1987). Splicing of messenger RNA precursors. Science **235**, 766–771.

Skoglund U., Andersson K., Bjorkroth B., Lamb M. M., Daneholt B. (1983). Visualization of the formation and transport of a specific hnRNP particle. Cell **34**, 847–855.

Skoglund U., Andersson K., Strandberg B., Dancholt B. (1986). Three-dimensional structure of a specific pre-messenger RNP particle established by electron microscope tomography. Nature **319**, 560–564.

Smith M. J., Hough B. R., Chamberlain M. E., Davidson E. H. (1974). Repetitive and non-repetitive sequence in sea urchin heterogeneous nuclear RNA. J. Mol. Biol. **85**, 103–126.

Spritz R. A. and nine others. (1981). Base substitution in an intervening sequence of a β^+-thalassemic human globin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 2455–2459.

Strub K., Birnstiel M. L. (1986). Genetic complementation in the

Xenopus oocyte: Co-expression of sea urchin histone and U7 RNAs restores 3' processing of H3 pre-mRNA in the oocyte. EMBO J. **5**, 1675–1682.

Tamkun J. W., Schwartzbauer J. E., Hynes R. O. (1984). A single rat fibronectin gene generates three different mRNAs by alternative splicing of a complex exon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 5140–5144.

Tatei K., Takemura K., Mayeda A., Fujiwara Y., Tanaka H., Ishimura A., Oshima Y. (1984). U1 RNA–protein complex preferentially binds to both 5' and 3' splice juction sequences in RNA or singlestranded DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 6281–6285.

Tazi J., Alibert C., Temsamani J., Reveillaud I., Cathala G., Brunel C., Jeanteur P. (1986). A protein that specifically recognizes the 3' splice site of mammalian pre-mRNA introns is associated with a small ribonucleoprotein. Cell **47**, 755–766.

Topp W., Hall J. D., Rifkin D., Levine A. J., Pollack R. (1977). The characterization of SV40-transformed cell lines derived from mouse teratocarcinoma: Growth properties and differentiated characteristics. J. Cell Physiol. **93**, 269–276.

Tsai S. Y., Tsai M.-J., Lin C.-T., O'Malley B. W. (1979). Effect of estrogen on ovalbumin gene expression in differentiated nontarget tissues. Biochemistry **18**, 5726–5731.

Unwin P. N. T., Mulligan R. A. (1982). A large particle is associated with the perimeter of the nuclear pore complex. J. Cell Biol. **93**, 63–75.

Wickens M., Stephenson P. (1984). Role of the conserved AAUAAA sequence: Four AAUAAA point mutants prevent 3' end formation. Science **226**, 1045–1051.

Wold B. J., Klein W. H., Hough-Evans B. R., Britten R. J., Davidson E. H. (1978). Sea urchin embryo mRNA sequences expressed in nuclear RNA of adult tissues. Cell **14**, 941–950.

Zeitlin S., Efstratiadis A. (1984). In vivo splicing of the rabbit β-globin pre-mRNA. Cell **39**, 589–602.

Zeitlin S., Parent A., Silverstein S., Efstratiadis A. (1987). Pre-mRNA splicing and the nuclear matrix. Mol. Cell. Biol. **7**, 111–120.

Глава 14

Трансляционная и посттрансляционная регуляция процессов развития

Мы не должны игнорировать тот факт, что каузальное исследование организмов является одной из наиболее сложных, если не самой сложной проблемой, которую пытался решить человеческий интеллект, и что это исследование, подобно любой другой каузальной науке, никогда не может быть завершено, так как каждая вновь установленная причина только поднимает новые вопросы о причине данной причины.

ВИЛЬГЕЛЬМ РУ (1894)

У посыльного нет отдыха до тех пор, пока послание не вручено.

ДЖОЗЕФ КОНРАД (1920)

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ

После транскрипции, процессинга и выхода мРНК из ядра необходима ее трансляция, чтобы получить белок, закодированный в геноме. Из этой главы мы узнаем, что регуляция на уровне трансляции представляет собой исключительно важный механизм контроля экспрессии генов. В данном случае мРНК уже образована, но она может транслироваться или не транслироваться в зависимости от определенных условий в клетке. Таким образом, контроль экспрессии генов на уровне трансляции может использоваться, когда нужен немедленный всплеск синтеза белка (как мы увидим, это происходит сразу после оплодотворения яйца) или в качестве механизма тонкой регуляции, обеспечивающей синтез строго определенного количества белка на имеющемся запасе мРНК (например, при синтезе гемоглобина). Мы узнаем также, что контроль на уровне трансляции осуществляется несколькими путями и в различных клетках используются разные пути.

Механизм трансляции у эукариот

Трансляция – это процесс, с помощью которого информация, содержащаяся в нуклеотидной последовательности мРНК, управляет синтезом конкретного полипептида. Этот процесс можно разделить на три этапа: инициацию, элонгацию и терминацию (рис. 14.1). На первом этапе – инициации – происходит присоединение первой аминоацил-транспортной РНК и мРНК к рибосоме. Единственной транспортной РНК (тРНК), способной к инициации трансляции, является особая тРНК ($тРНК_i$), которая несет аминокислоту метионин. Как показано на рис. 14.2, первые реакции вызывают образование **инициирующего комплекса**, состоящего из метиониновой инициаторной тРНК, связанной с 40S(«малой»)-субъединицей рибосомы. Эта Мет-$тРНК_i$ узнается **эукариотическим фактором инициации 2** (эФИ2), который присоединяет ее к 40S-субъединице рибосомы. Отметим, что присоединение происходит в отсутствие мРНК. Следующей добавляется мРНК. **Кэп-связывающий белок** присоединяется к 7-метилгуанозину кэп-группы на 5'-конце мРНК, а эукариотические факторы инициации 4А и 4В прикрепляются к кэп-связывающему белку или рядом с ним. В отсутствие кэп-группы связывание мРНК с рибосомной субъединицей неполноценное (Shatkin, 1976, 1985). Рибосомная 40S-субъединица перемещается вдоль мРНК, пока не достигает кодона АУГ в правильном окружении. Было показано, что не каждый АУГ-кодон подходит для этого (Kozak, 1986). Для того чтобы остановить рибосомную 40S-субъединицу и инициировать трансляцию, важны также нуклеотиды вокруг АУГ. С помощью мутирования клонированных генов и анализа трансляции их РНК было обнаружено, что «оптимальной» является последо-

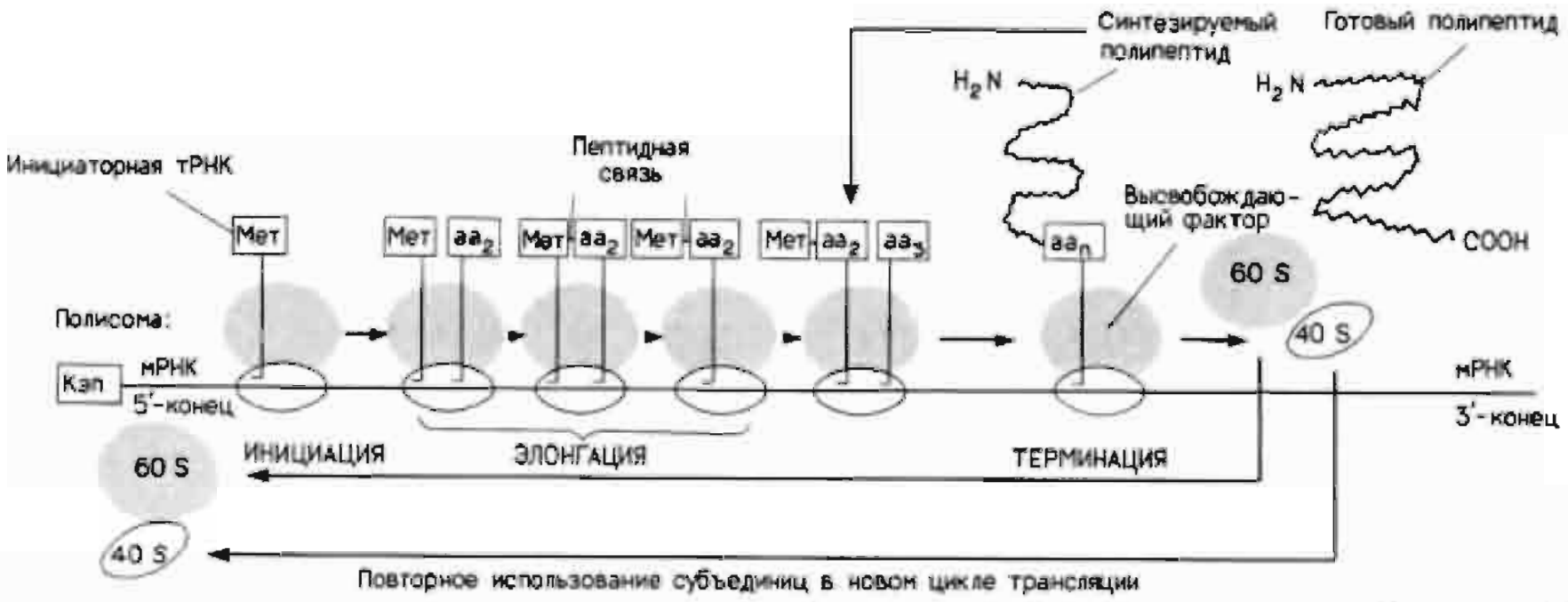


Рис. 14.1. Схема этапов трансляции у эукариот. На стадии инициации собираются вместе рибосомные субъединицы 40S (светлые) и 60S (серые), мРНК и инициаторная тРНК, которая находится в комплексе с аминокислотой метионином (Мет). В ходе элонгации к полисоме доставляются аминокислоты, между которыми образуются пептидные связи. Последовательность аминокислот в растущем белке определяется последовательностью нуклеиновых кодонов в мРНК. После образования в белке последней пептидной связи один из кодонов УАГ, УГА или УАА сообщает о терминации трансляции. Рибосомные субъединицы и мРНК могут использоваться в новом цикле трансляции.

вательность АЦЦ*АУГ*Г. Мутации среди фланкирующих нуклеотидов могут снижать трансляцию в 20 раз. Важность фланкирующей последовательности наблюдалась также in vivo. Имеется сообщение (Morle et al., 1985) о больном α-талассемией (дефицит α-глобиновых субъединиц), вызванной изменением последовательности АЦЦАУГГ на ЦЦЦАУГГ.

При связывании 40S-субъединицы с АУГ в мРНК инициаторная тРНК располагается над АУГ-кодоном. Только после правильного размещения мРНК на малой рибосомной субъединице может присоединиться рибосомная («большая») 60S-субъединица.

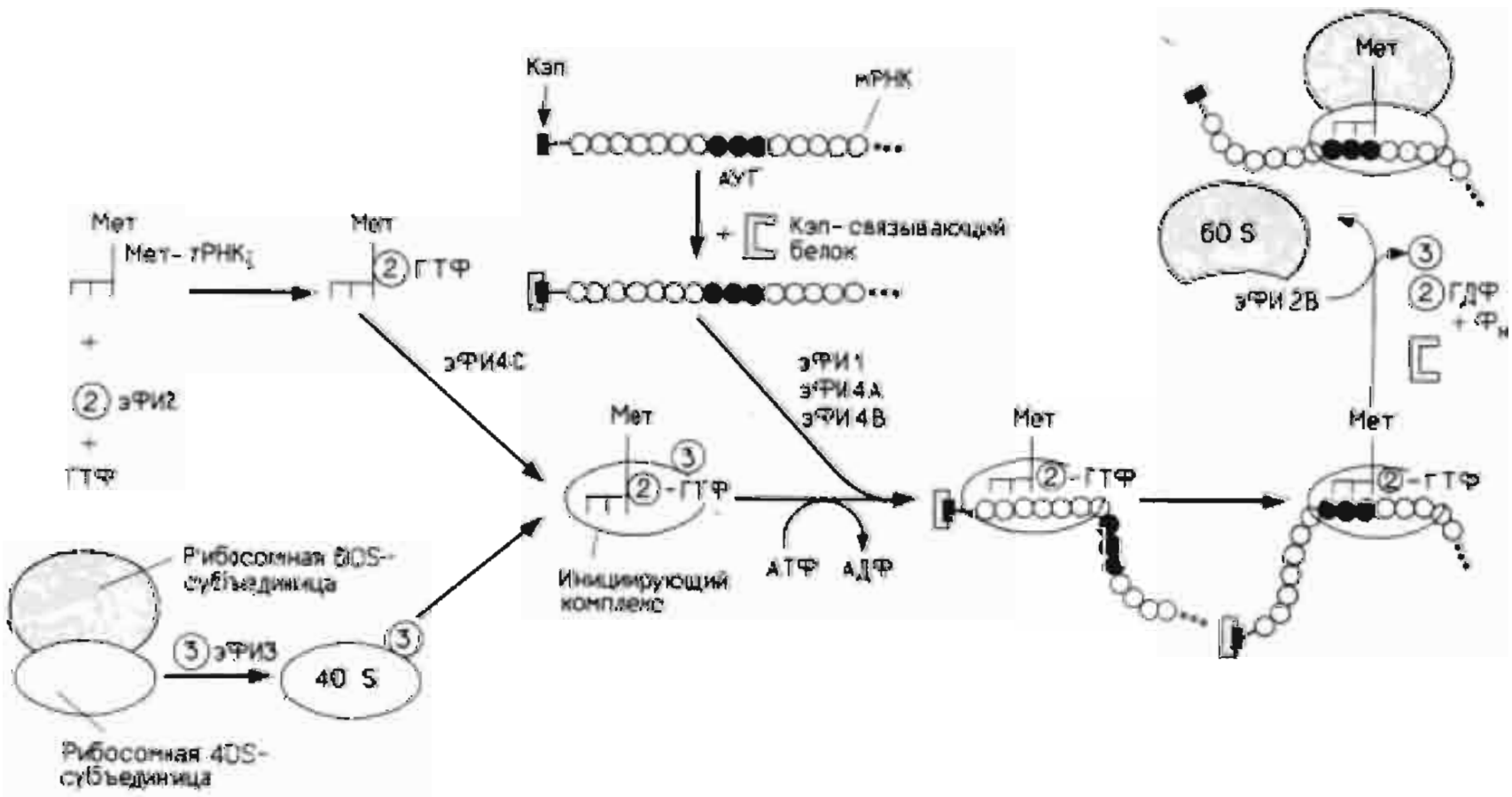


Рис. 14.2. Стадия инициации трансляции у эукариот. Начальный комплекс образуется в результате объединения активированной инициаторной тРНК и рибосомной 40S-субъединицы; этот процесс катализируется ГТФ и эукариотическими факторами инициации (эФИ) 2 и 3. После формирования комплекса на нем с помощью белка, связывающего кэп-группу и АТФ, встает на свое место рибосомная 60S-субъединица. Эти поздние этапы катализируются эФИ1, 4 и 5. (По Hershey, 1980; Shatkin, 1985.)

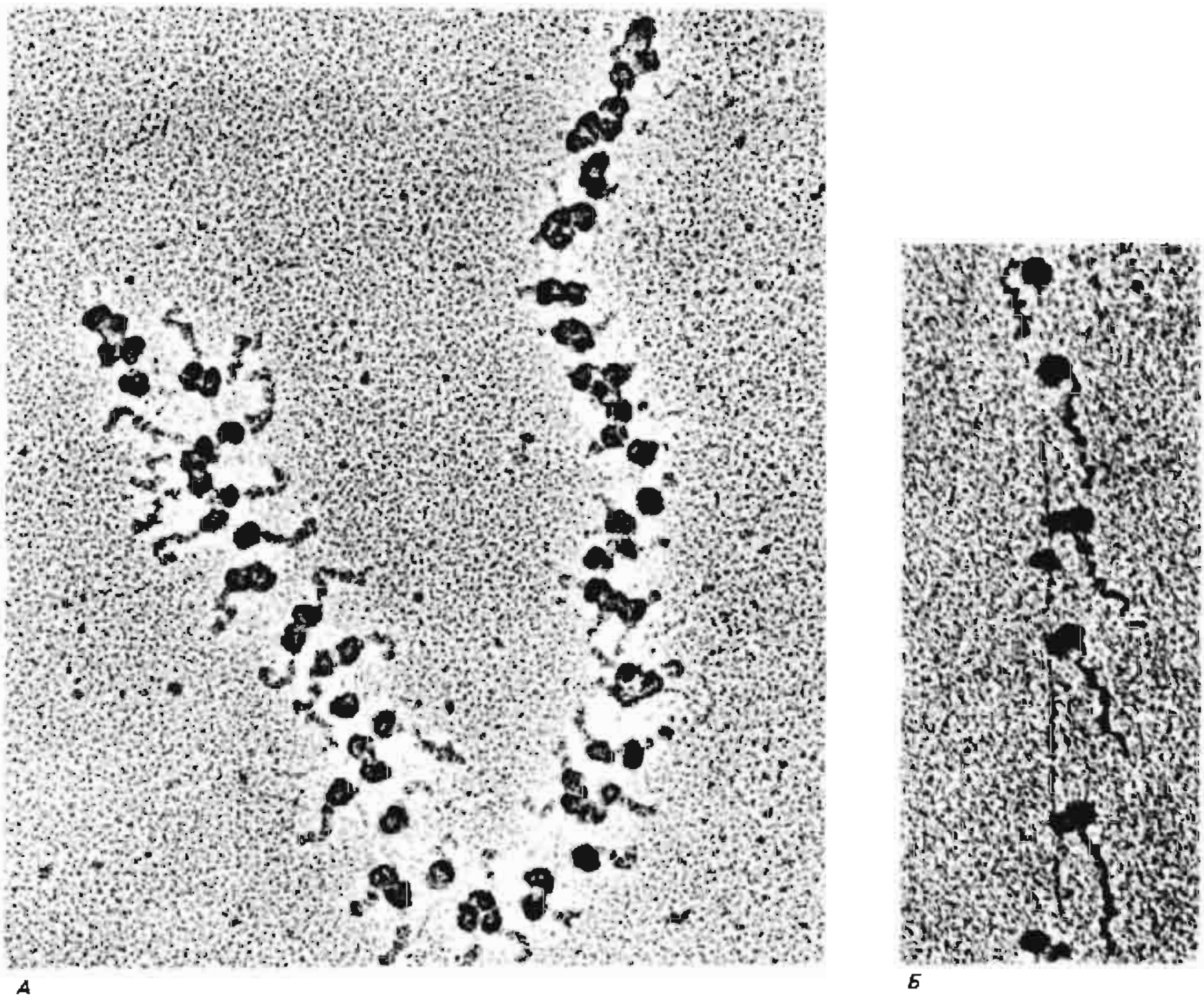


Рис. 14.3. Индивидуальная полисома, транскрибирующая гигантскую мРНК пуфа BR2 из клеток слюнных желез *Chironomus tentans*. *А*. Электронная микрофотография полисомы, состоящей из 74 рибосом. Можно видеть синтезируемые белки, выходящие из рибосом и растущие по мере движения рибосом от 5'- к 3'-концу мРНК. Около 3'-конца располагаются рибосомы, от которых белок уже отделился. *Б*. Фотография полисомы при большем увеличении; полисома была растянута в ходе приготовления препарата. Можно видеть расположение мРНК относительно рибосомных субъединиц и синтезируемого полипептида. (Из Francke et al., 1982; фотография с любезного разрешения J. E. Edstrom.)

Элонгация заключается в последовательном присоединении молекул аминоацил-тРНК к рибосоме и образовании пептидных связей между аминокислотами по мере того, как они последовательно отдают свои тРНК-переносчики (рис. 14.1). После соединения аминокислот друг с другом рибосома перемещается по мРНК, экспонируя новые кодоны для связывания тРНК. Это позволяет другой рибосоме инициировать трансляцию на 5'-конце мРНК и начать свое перемещение. Таким образом, с любой мРНК связано обычно несколько рибосом. Эту структуру называют поэтому полирибосомой или, что более принято, **полисомой** (рис. 14.3). Терминация синтеза белка происходит, когда на рибосоме экспонируется один из кодонов мРНК – УАГ, УАА или УГА. Эти триплеты нуклеотидов (называемые кодонами терминации) не узнаются молекулами тРНК и, следовательно, не кодируют ни одной аминокислоты. Однако их узнают сбрасывающие факторы, которые гидролизуют связь пептида с последней тРНК, освобождая его от рибосомы. Рибосома разделяется на две субъединицы, и цикл трансляции начинается снова.

Хотя 3'-поли(А)-хвосты молекул мРНК не транс-

лируются, они, по-видимому, увеличивают эффективность трансляции тех мРНК, у которых они имеются. Как правило, пока мРНК находится в цитоплазме, ее поли(А)-хвост постепенно укорачивается, и если размеры его станут ниже критического, то способность мРНК к трансляции существенно снижается (Littauer, Soreq, 1982). В некоторых случаях экспрессия различных мРНК в цитоплазме может регулироваться с помощью дифференциального укорачивания поли(А)-хвостов. Этот механизм наблюдали в слюнных железах личинки *Drosophila* (Restifo, Guild, 1986) и в ооцитах *Xenopus* (Dworkin, Dworkin-Rastl, 1985). У миксомицета *Dictyostelium* (развитие которого рассмотрено в гл. 1) и двустворчатого моллюска *Spisula* дифференциальное укорачивание поли(А)-хвостов играет решающую роль в их жизненном цикле. При переходе миксомицета от вегетативного роста (амеба) к развитию (плодовое тело) транскрибируется новый набор мРНК. Одновременно резко укорачиваются поли(А)-хвосты запасенных мРНК, специфичных для вегетативной стадии. В результате новосинтезированные мРНК транслируются, а запасенные мРНК – нет. Высказано предположение, что поли(А)-хвост каким-то образом поддерживает трансляцию (Palatnik et al., 1984). Эта идея согласуется с наблюдениями, что добавленная экзогенная поли(А) ингибирует трансляцию мРНК с такими хвостами (Jacobson, Favreau, 1983). Сходным образом после оплодотворения ооцита *Spisula* поли(А)-хвосты в молекулах мРНК, транслируемых в ооците, сильно укорачиваются, тогда как в тех мРНК, которые будут транслироваться у ранних зародышей (и которые не транслировались в ооците), удлиняются (Rosenthal, Ruderman, 1987).

Контроль на уровне трансляции при координированном синтезе белка: продукция гемоглобина

Одной из основных проблем генетической регуляции является координированный синтез нескольких продуктов с разных участков генома. Когда развивающийся эритроцит синтезирует гемоглобин, необходимо, чтобы α-глобиновые цепи, β-глобиновые цепи и молекулы гема производились соответственно в соотношении 2:2:4 (рис. 14.4). Любое существенное отклонение от этого соотношения приводит к тяжелым заболеваниям.

Результаты недавних исследований показали, что пропорциональный синтез компонентов гемоглобина регулирует молекула гема. Достигается это двояким образом. Во-первых, избыток гема (т.е. гема, который не связан с белком, подобным глобину) будет выключать свой собственный синтез (Karibian, London, 1965). Осуществляется выключение синтеза посредством инактивации δ-аминолевулинатсинтазы (DALA-синтазы), первого фермента на пути продукции гема (рис. 14.5). Таким образом, когда количество гема превосходит количество молекул, способных присоединить его, дальнейшая продукция гема прекращается. Во-вторых, избыток гема стимулирует синтез глобинов (Gribble, Schwartz, 1965; Zucker, Schulman, 1968). Если гем (в виде своей окисленной формы – гемина) добавляют к бесклеточной системе трансляции, в состав которой входят факторы, необходимые для трансляции мРНК (табл. 14.1), то синтез глобина значительно увеличивается (рис. 14.6). Следовательно, если для связывания гема не хватает глобинов, то избыток гема выключает свой собственный синтез и стимулирует усиленную продукцию глобинов.

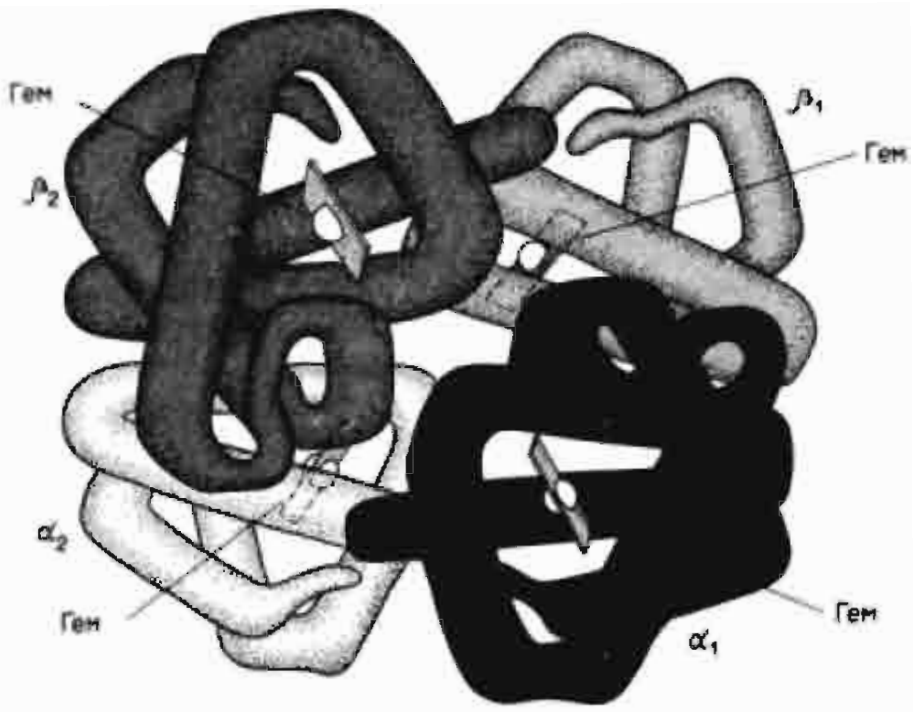


Рис. 14.4. Структура гемоглобина человека (взрослая форма), состоящего из четырех полипептидных цепей (двух α и двух β) и четырех молекул гема. (По Dickerson, Geis, 1983.)

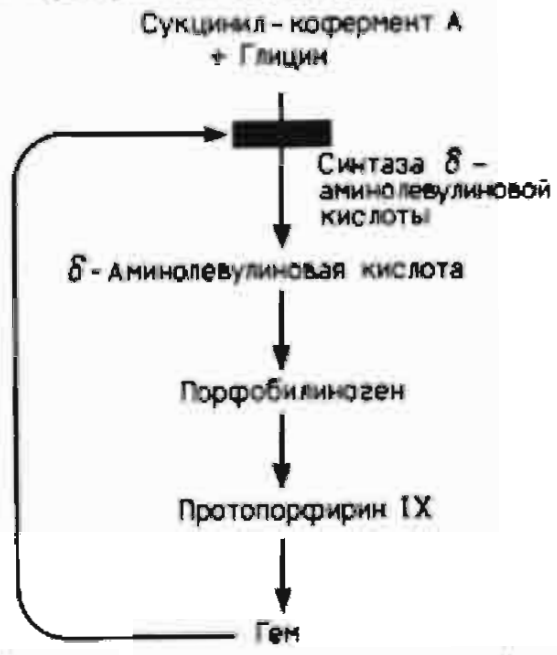


Рис. 14.5. Регуляция синтеза гема по типу обратной связи. (По Harris, 1975.)

Таблица 14.1. Компоненты бесклеточной системы трансляции в лизате ретикулоцитов кролика

Компонент	Концентрация (в 100 мкл)
Лизат ретикулоцитов (1 : 1)	50 мкл
Буфер *трис*-HCl (pH 7.6)	10 мМ
АТФ	1 мМ
ГТФ	0,2 мМ
Креатинфосфат	5 мМ
Креатинфосфокиназа	10 мкг
Ацетат магния	2 мМ
KCl	76 мМ
Пропорциональная смесь аминокислот	6–170 мкМ
[^{14}C]-лейцин	0,8 мкКи
«Холодный» лейцин	26 мкМ
Гемин	10–30 мкМ
H_2O до общего объема реакционной смеси 100 мкл	

Источник: London et al., 1976.

В нескольких лабораториях пытались выяснить, каким образом такая маленькая молекула, какой является гем, может регулировать синтез белка. В 1972 г. Адамсон и др. (Adamson et al., 1972) обнаружили, что стимулирующий эффект гема на синтез глобинов может быть имитирован путем добавления к системе трансляции слабосвязанных рибосомных белков. Поскольку такие смеси богаты факторами инициации трансляции, каждый фактор испытали в отдельности. Оказалось, что эукариотический фактор инициации 2 (эФИ2) восстанавливает синтез белка в трансляционной системе из лизатов, дефицитных по гему (рис. 14.7). Этот фактор инициации отвечает за связывание инициаторной тРНК и присоединение ее к рибосомной 40S-субъединице.

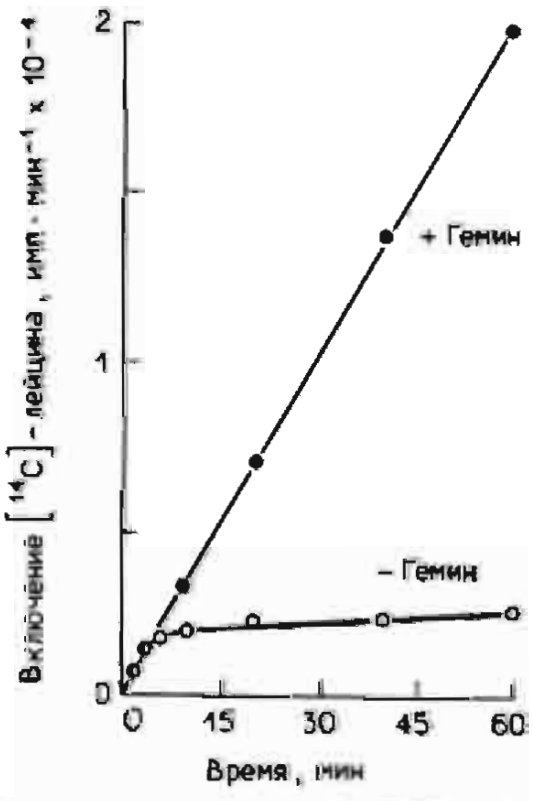


Рис. 14.6. Трансляция глобиновой мРНК в бесклеточной системе синтеза белка из ретикулоцитов кролика. Добавление гемина вызывает резкое увеличение синтеза белка. (Из London et al., 1976.)

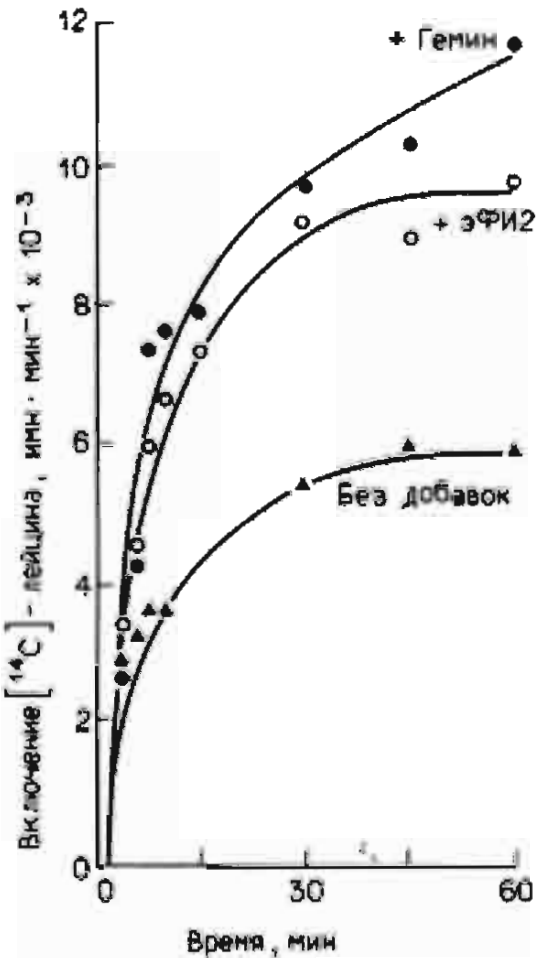


Рис. 14.7. Влияние добавки экзогенного эукариотического фактора инициации 2 к бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика. Добавленный эФИ2 увеличивал синтез белка до уровня, близкого к наблюдаемому в системе, стимулированной гемином. (По Clemens et al., 1974.)

Какова взаимосвязь между гемом и эФИ2? Чтобы ответить на этот вопрос, лизаты, дефицитные по гему, добавляли к трансляционным системам, содержащим гем (Levin et al., 1976; Ranu et al., 1976). Было обнаружено, что добавка порции лизата, дефицитного по гему, действительно подавляет синтез глобинов в системе трансляции. Это наблюдение указывало на присутствие ингибитора. Более того, оказалось, что эта ингибирующая фракция имеет ферментативную активность. Она содержит киназу, способную фосфорилировать эФИ2.

Фосфорилирование эФИ2 в конечном итоге останавливает трансляцию. В норме, после того как рибосомные субъединицы объединяются, эФИ2 высвобождается в виде комплекса с ГДФ (Raychaudhuri et al., 1985). Это высвобождение осуществляется с помощью эФИ-2В (называемого иногда фактором циклов или фактором обмена гуанинового нуклеотида), который присоединяется к эФИ2 и удаляет его с рибосомы. Однако, когда этот фактор циклов присоединяется к фосфорилирован-



Рис. 14.8. Схема трансляционного контроля синтеза глобинов. Эукариотический фактор инициации 2 истощается в результате фосфорилирования (протеинкиназой) до тех пор, пока гем не инактивирует протеинкиназу.

ной форме эФИ2, он остается связанным с эФИ2 и комплекс с эФИ2 не уходит с рибосомы (Thomas et al., 1985; Gross et al., 1986). В результате весь фактор циклов (концентрация которого в 10–20 раз ниже, чем эФИ2) оказывается захваченным в таких неактивных комплексах. Циркуляция эФИ2 прекращается, и синтез белка останавливается. Добавление фактора циклов к лизатам, дефицитным по гему, приводит к восстановлению синтеза белка до уровня трансляционных систем, содержащих гем (Grace et al., 1984).

В итоге регуляцию синтеза глобинов гемом можно представить следующим образом (рис. 14.8).

1. В отсутствие гема специфическая протеинкиназа фосфорилирует фактор инициации 2.
2. Фосфорилированный фактор инициации 2 связывается со своим фактором циклов и не высвобождает его. В конечном счете весь фактор циклов иммобилизуется в этих комплексах. Комплекс эФИ2–эФИ-2В остается связанным с рибосомой, и трансляция останавливается.
3. Избыточный гем способен присоединиться к протеинкиназе, инактивируя ее (Fagard, London, 1981). Инактивированная киназа не будет фосфорилировать эФИ2, поэтому трансляция не останавливается. Таким образом, синтез глобинов продолжается до тех пор, пока присутствует гем.

Трансляционный контроль синтеза глобинов не ограничивается этим. Как отмечалось в гл. 12, в диплоидной клетке имеются четыре активных α-глобиновых гена и лишь два активных β-глобиновых гена. Если бы каждый ген транскрибировался и транслировался с одинаковой скоростью, то следовало ожидать, что количество α-глобиновых молекул вдвое превысит количество β-глобиновых молекул. Этого, естественно, не происходит. Обнаруживается отношение 1,4 : 1 для α-мРНК:β-мРНК, но 1 : 1 для белков (Lodish, 1971). Таким образом, уравнивание количеств белков обусловлено регуляцией на уровне трансляции.

Полагают, что это уравнивание происходит на стадии инициации трансляции (Kabat, Chappell, 1977). Оказалось, что α-глобиновая мРНК конкурирует с β-глобиновой мРНК за факторы инициации, но β-глобиновая мРНК является лучшим конкурентом. β-Глобиновая мРНК узнавалась более эффективно факторами инициации и поэтому транслировалась с большей частотой. Если эти две мРНК присутствовали в равных количествах и при лимитирующем количестве факторов инициации, то лишь 3% производимого белка составлял α-глобин. Однако если нефракционированную мРНК (α- и β-глобиновую мРНК из лизированных клеток) добавляли к избытку таких факторов, то все молекулы мРНК транслировались с одинаковой эффективностью и итоговое отношение α- и β-глобинов составляло 1,4 : 1. Результаты недавних экспериментов (Ray et al., 1983; Sarkar et al., 1984) косвенно свидетельствуют о том, что в качестве фактора инициации, ответственного за дискриминацию между двумя типами глобиновых мРНК, выступает кэп-связывающий белок. Хотя до сих пор неясно, как эта дискриминация осуществляется, известно, что на эффективность трансляции влияет вторичная структура 5′-лидерной последовательности (Pelletier, Sonnenberg, 1985). Как видно из рис. 14.9, 5′-концы α- и β-глобиновых мРНК существенно различаются. Таким образом, правильное соотношение α-глобина, β-глобина и гема устанавливается на стадии инициации трансляции. Итак, синтез гемоглобина подвержен регуляции на уровнях транскрипции и процессинга РНК, однако итоговая молекула формируется при тонкой координации на уровне трансляции.

Селективная деградация мРНК

Другой механизм трансляционной регуляции касается типов мРНК с различной продолжительностью жизни. Для стабильной мРНК, такой, как β-глобиновая, время полужизни составляет около 17 ч, для молекул же мРНК разнообразных факторов роста время полужизни составляет меньше 30 мин. Следовательно, количество белка, произведенного с одной молекулы глобиновой мРНК, должно быть существенно больше того, что произ-

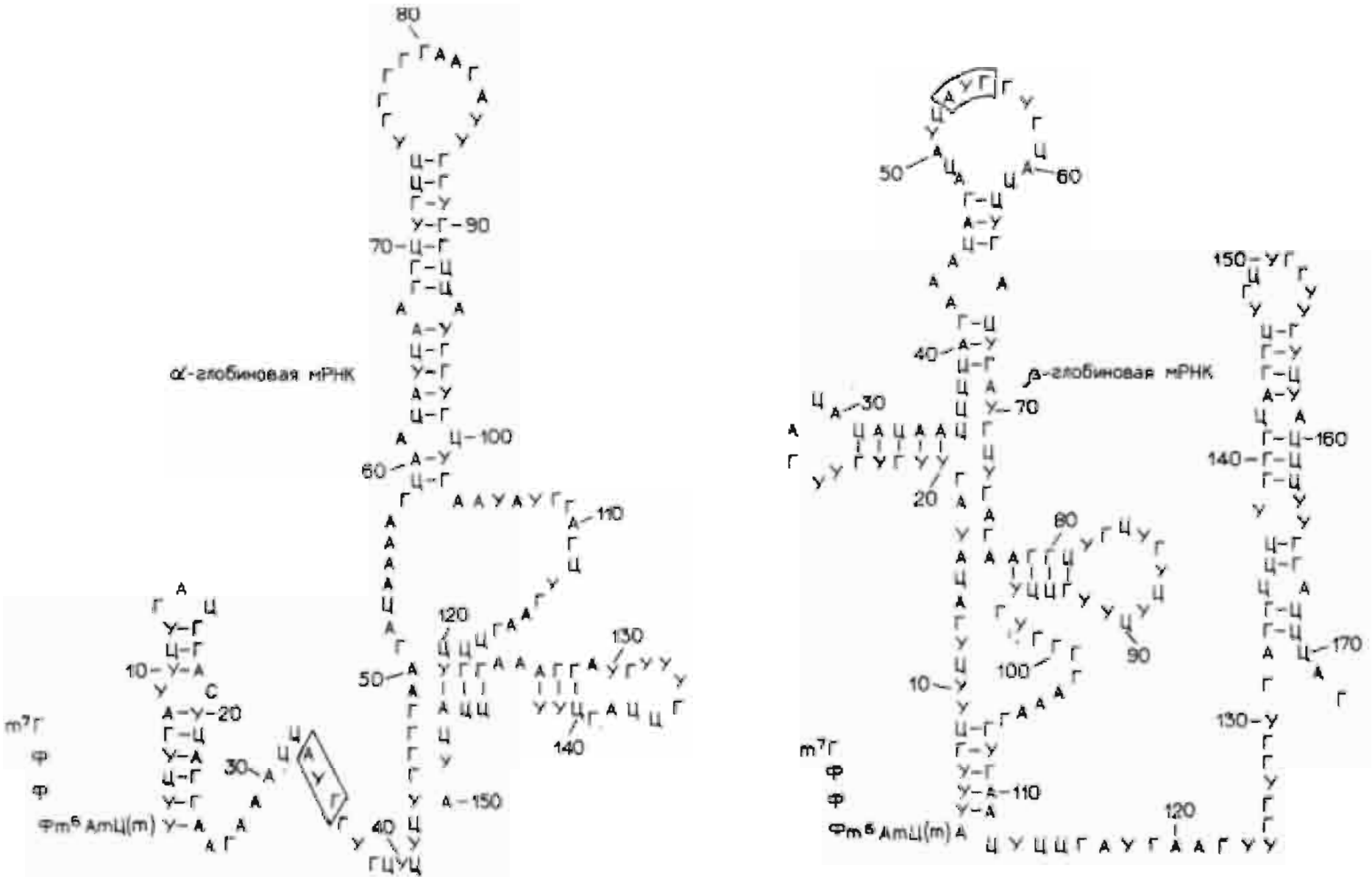


Рис. 14.9. Возможные вторичные структуры 5'-концов α-глобиновой и β-глобиновой цепей мыши. (По Pavlakis et al., 1980.)

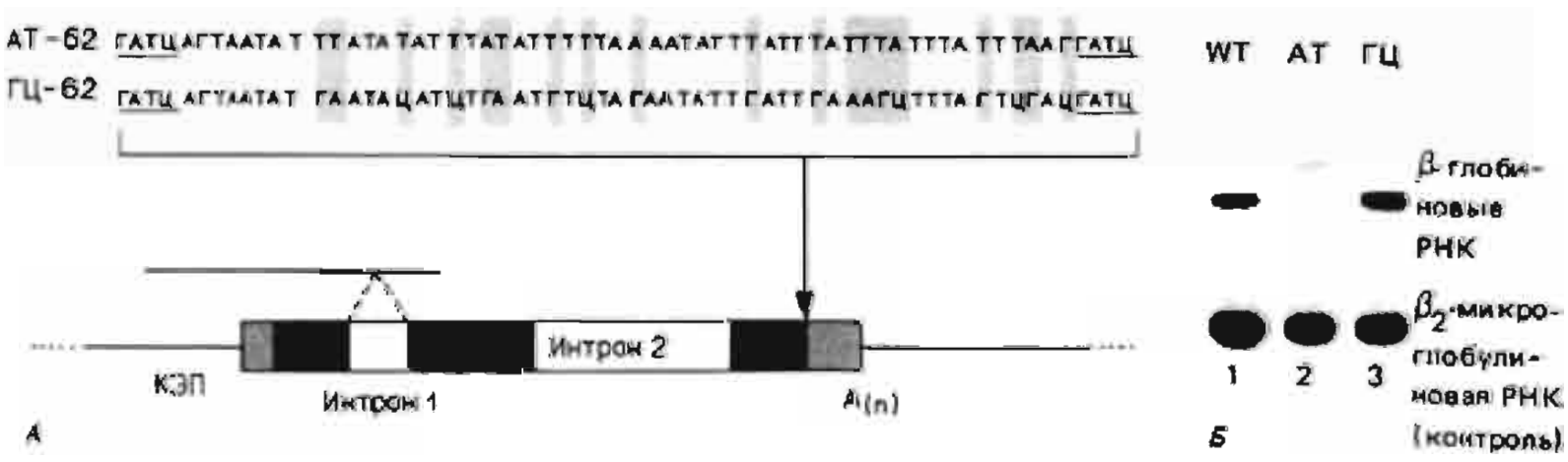


Рис. 14.10. Регуляция продолжительности жизни мРНК с помощью последовательности в 3'-нетранслируемой области. *А*. 3'-конец β-глобинового гена кролика был модифицирован вставкой фрагмента длиной 62 п. о., полученного из 3'-конца гена КСФ-г.м человека или аналогичной последовательности, в которой несколько АТ-пар были заменены ГЦ-парами (указаны на сером фоне). *Б*. Клоны инъецировали в культивируемые клетки мыши и через 30 ч определяли наличие мРНК с помощью инкубации клеточных экстрактов с ^{32}Р-меченной ДНК, комплементарной к 5'-концу мРНК. Если β-глобиновая мРНК кролика присутствует, то радиоактивная кДНК будет связываться с ней и поэтому будет устойчива к нуклеазе S1 (которая гидролизует только одноцепочечные нуклеиновые кислоты). Если мРНК отсутствует, то добавленная нуклеаза S1 будет расщеплять зонд до мононуклеотидов и радиоактивность связываться не будет. Полученные препараты фракционировали в геле и делали радиоавтографы. Дорожка 1: экстракт из клеток, включивших клонированный β-глобиновый ген кролика дикого типа (WT). Дорожка 2: экстракт из клеток, включивших β-глобиновый ген кролика с АТ-богатым 3'-концом (свидетельствует об отсутствии мРНК через 30 ч). Дорожка 3: экстракт из клеток, включивших β-глобиновый ген кролика с ГЦ-замещенным 3'-концом (свидетельствует о присутствии стабильной мРНК через 30 ч). Ген и зонд для микроглобулина β_2 (синтезирующего долгоживущую мРНК) использовали в качестве контроля. (Из Shaw, Kamen, 1986; фотография с любезного разрешения авторов.)

водится с одной молекулы мРНК фактора роста. Основной элемент, контролирующий время жизни мРНК, находится, по-видимому, в 3'-нетранслируемой области мРНК. При этом молекулы эпидермальной РНК содержат одну или несколько АУ-богатых последовательностей в этой области. В одном из опытов АТ-богатый участок длиной в 51 пару оснований из 3'-нетранслируемой области гена для фактора роста КСФ-г,м был встроен в 3'-нетранслируемую область β-глобинового гена кролика (рис. 14.10; Shaw, Kamen, 1986). Время полужизни полученной глобиновой мРНК составляло менее 30 мин. Аналогичная последовательность, но содержащая 14 остатков Г и Ц, была встроена в качестве контроля в другой β-глобиновый ген. Соответствующая глобиновая мРНК имела обычное время полужизни. Создается впечатление, что продолжительность существования конкретной мРНК закодирована в 3'-нетранслируемой области этой мРНК.

Способность к дифференциальной деградации различных мРНК имеет критическое значение для клеточных функций. Например, ген *c-fos* кодирует ядерный белок, необходимый для деления нормальных фибробластов (Holt et al., 1986). Подобно мРНК фактора роста КСФ-г,м, мРНК для *c-fos* имеет протяженную 3'-нетранслируемую область, богатую АУ-последовательностями. Если эта область делетирована (экспериментально или при спонтанных мутациях), то время полужизни соответствующей мРНК увеличивается. Следовательно, производится больше белка c-*fos* и клетка непрерывно стимулируется к делению. В результате возникает опухоль из клеток, в которых мРНК гена c-*foc* лишена АУ-богатой 3'-области (Meijlink et al., 1985).

Трансляционный контроль ооцитных мРНК

Данные, свидетельствующие о материнской регуляции раннего развития

У большинства видов животных экспрессия генов диплоидного ядра происходит не сразу. Данные о том, что раннее развитие контролируется факторами, запасенными или синтезированными в ооците, получены в ряде экспериментов на рубеже нашего века (см. обзор Davidson, 1976). Результаты этих экспериментов отчетливо показали доминантность материнских признаков на начальных стадиях эмбриогенеза и переключение на отцовские или гибридные характеристики только в более позднем развитии. О таких долговременных материнских влияниях мы упоминали при обсуждении ориентации дроблений у зародышей улитки, у которых

Таблица 14.2. Данные Дриша по материнскому контролю числа клеток первичной мезенхимы в гибридных зародышах морского ежа

Яйцеклетки		Спермии	Среднее число клеток первичной мезенхимы (в скобках указан разброс значений)
Echinus	×	*Echinus*	55 (±4)
Spherechinus	×	*Spherechinus*	33 (±4)
Spherechinus	×	*Echinus*	35 (±5)
Strongylocentrotus	×	*Strongylocentrotus*	49 (±3)
Spherechinus	×	*Strongylocentrotus*	33 (±3)

Источник: Davidson, 1976.

цитоплазма ооцита содержит фактор, управляющий поворотами плоскостей дробления в правом или левом направлении.

В 1898 г. Ханс Дриш скрестил два вида морских ежей и обнаружил, что среднее число первичных клеток мезенхимы в гибриде зависит исключительно от вида, давшего яйцо (табл. 14.2). В сходном эксперименте яйцеклетки морского ежа *Cidaris* оплодотворяли спермой морского ежа *Lytechinus* (Tennant, 1914). При этом было обнаружено, что в образующихся бластомерах сохраняются все хромосомы, а формирование архентерона и время образования мезенхимы соответствуют материнскому типу развития (табл. 14.3). Отцовские гены проявлялись впервые при закладке скелетных клеток.

Таблица 14.3. Данные Теннанта по контролю этапов ранней гаструляции в гибридных зародышах морского ежа

Виды морского ежа	Инвагинация архентерона	Образование мезенхимы, ч	Источник клеток первичной мезенхимы
Cidaris (самка)	20–33	23–26 (после инвагинации)	Верхушка архентерона
Lytechinus (самец)	9	8 (до инвагинации)	Основание и боковые части архентерона
Гибрид			
Cidaris (самка) × × *Lytechinus* (самец)	20	24 (после инвагинации)	Основание и боковые части архентерона

Источник: Davidson, 1976.

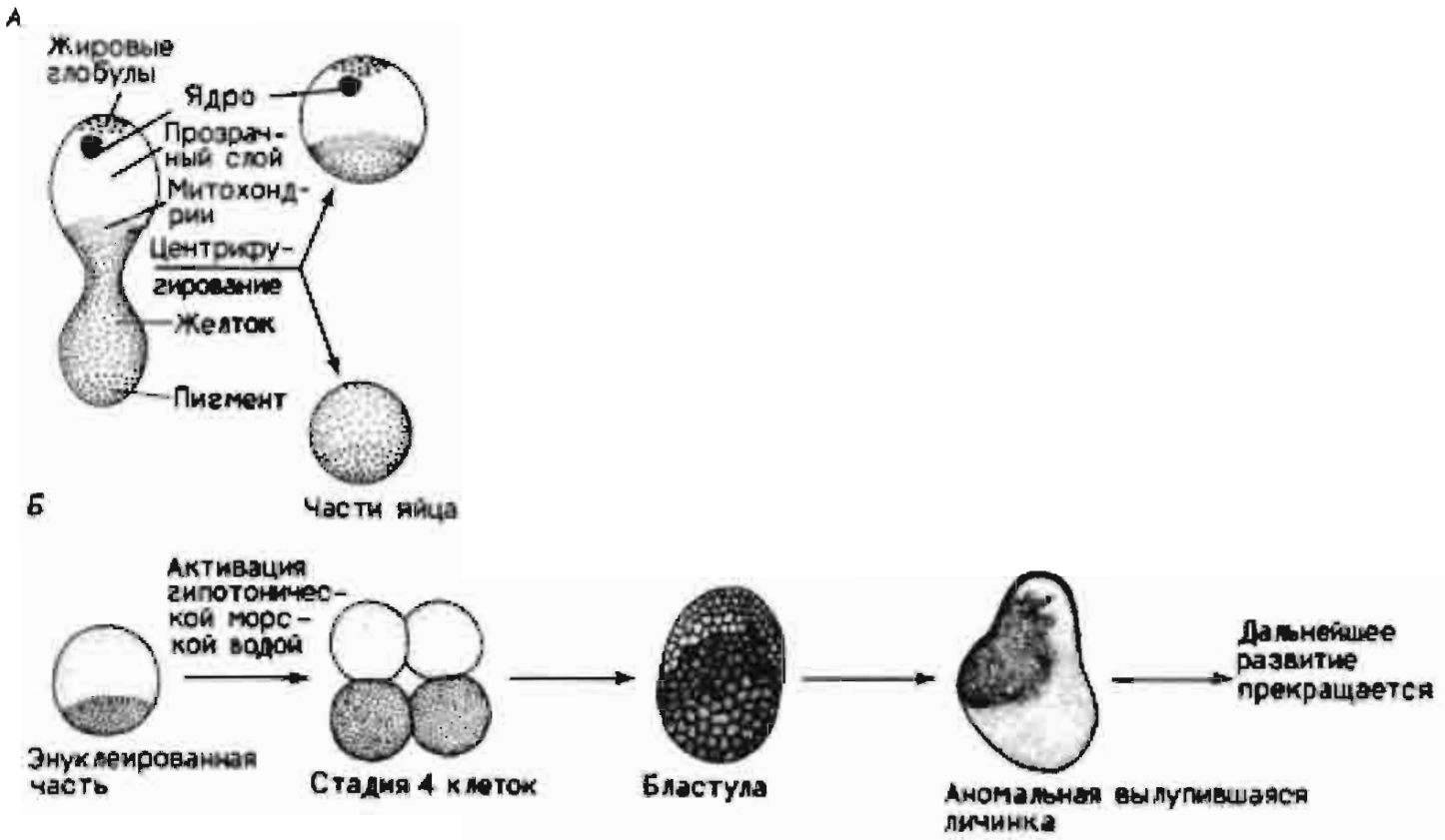


Рис. 14.11. Дробление в отсутствие ядра. *А*. Физическое энуклеирование ооцита *Arbacia* с помощью центрифугирования в растворе сахарозы. *Б*. Развитие энуклеированной части ооцита в партеногенетические мерогоны, лишенные ядер. Обычно энуклеированные ооциты претерпевают аномальное дробление, однако некоторые энуклеированные ооциты развиваются до стадии бластулы; иногда даже в отсутствие продуктов ядерного синтеза выпячивается аномальная личинка. (По Harvey, 1940.)

Вторая группа данных, свидетельствующих о материнской регуляции раннего развития, получена в работах по энуклеации. Если после оплодотворения яйца из него удалить ядро, то можно выяснить, как далеко проходит развитие в отсутствие синтеза новых мРНК. Энуклеация проводилась с помощью физических, химических и генетических методов. Физическую энуклеацию ооцита осуществила Харвей (Harvey, 1940). Она помещала неоплодотворенные яйцеклетки морского ежа в раствор сахарозы, имеющий ту же плотность, что и сами яйцеклетки. При центрифугировании суспензия расслаивалась, и в конечном счете яйцеклетки разрывались на две глобулы (рис. 14.11, *А*). Легкая часть содержала ядро, а тяжелая часть оказывалась энуклеированной. Затем Харвей партеногенетически активировала энуклеированные части, поместив их в гипотоническую морскую воду. Эти части («партеногенетические мерогоны») дробились, образовывали аномальную бластулу (лишенную бластоцеля) и благополучно выклевывались (рис. 14.11, *Б*). Дальше развитие прекращалось. Результаты аналогичных экспериментов с использованием ооцитов лягушки также показали, что дробление может происходить даже при полном отсутствии хромосом (в том случае, если в икру были инъецированы центриоли для компенсации тех, которые в норме поставляются спермием). В этом случае также возникает аномальная бластула. Опыты по физической энуклеации показывают, что определенные яйцеклетки даже в отсутствие ядра способны проходить в своем развитии стадию средней бластулы.

Запасенные мРНК

Данные о том, что ооцит контролирует раннее развитие благодаря запасенной им мРНК, были впервые получены двумя группами исследователей (Brachet et al., 1963; Denny, Tyler, 1964). Результаты этих исследований показали, что энуклеированные и активированные части яйцеклеток морского ежа содержат РНК и могут синтезировать белки со скоростью, сравнимой со скоростью синтеза в нормально оплодотворенных яйцах. В энуклеированных ооцитах транскрипции происходить не может, следовательно, для синтеза белков в них должна использоваться запасенная мРНК. Было показано, что прирост в белковом синтезе не может быть обусловлен транскрипцией митохондриальной ДНК ооцита (Craig, Piatigorsky, 1971). Представляется, что ооцит создал запас мРНК, которые не транслируются до оплодотворения.

Мягкие способы энуклеации стали возможны, когда было открыто, что антибиотик актиномицин D ингибирует синтез РНК, и транскрипция может быть выключена путем помещения свежеоплодотворенной яйцеклетки в раствор этого антибиотика. Когда ооциты морского ежа обрабатывали актиномицином D в концентрации, достаточной для по-

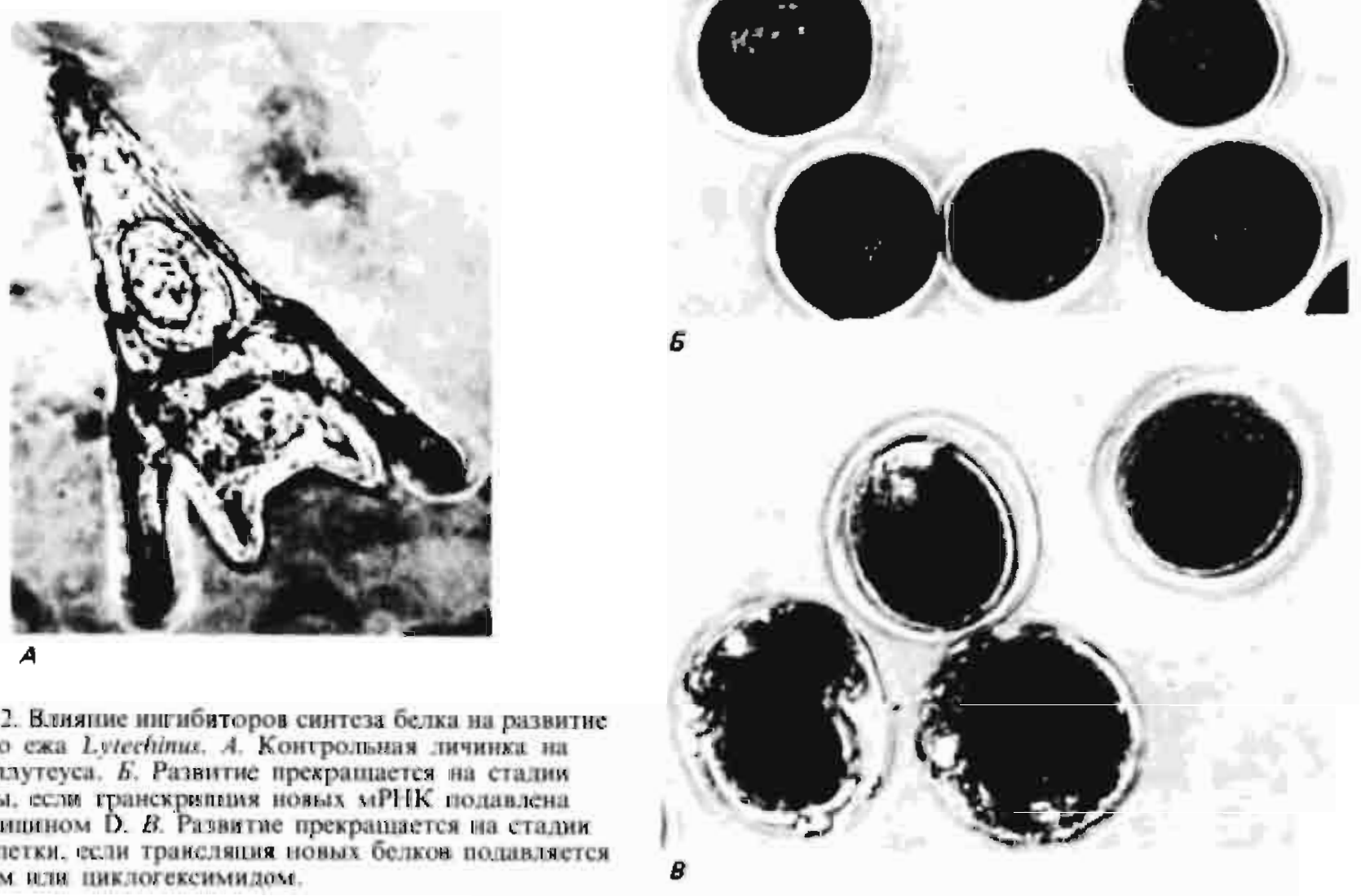


Рис. 14.12. Влияние ингибиторов синтеза белка на развитие морского ежа *Lytechinus*. *А*. Контрольная личинка на стадии плутеуса. *Б*. Развитие прекращается на стадии бластулы, если транскрипция новых мРНК подавлена актиномицином D. *В*. Развитие прекращается на стадии одной клетки, если трансляция новых белков подавляется эметином или циклогексимидом.

давления синтеза РНК в ней на 94%, зародыши в своем развитии все еще достигали стадии бластулы (рис. 14.12, *Б*) (Gross, Cousineau, 1964). То, что это развитие зависит от запасенных мРНК, а не от предварительно синтезированных белков, было показано с помощью обработки оплодотворенных ооцитов эметином или циклогексимидом. Эти антибиотики ингибируют трансляцию, и зародыши, оплодотворенные в присутствии этих ингибиторов, не могут развиваться вовсе (рис. 14.12, *В*).

В ряде исследований был продемонстрирован всплеск белкового синтеза вскоре после оплодотворения. Результаты экспериментов Гросса и его коллег с использованием актиномицина D показали, что в химически энуклеированных зародышах синтез белка после оплодотворения увеличивается точно так же, как в контрольных (рис. 14.13). Однако спустя 6–10 ч в обработанных зародышах наблюдается спад белкового синтеза и второй всплеск белкового синтеза на стадии бластулы у них не происходит. Молекулы мРНК для этого второго подъема синтеза белка транскрибируются в ядре. Таким образом, зародыши, обработанные актиномицином D, могут развиваться вплоть до выклева на стадии бластулы, а далее развитие останавливается. Следовательно, запасенных мРНК ооцита

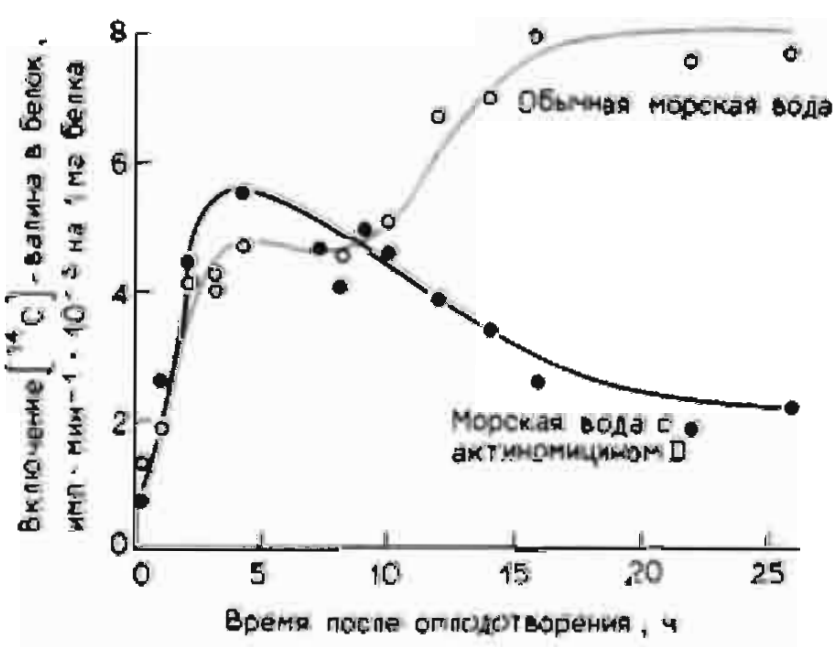


Рис. 14.13. Синтез белка у зародышей морского ежа *Arbacia punctulata*, оплодотворенных в присутствии или в отсутствие актиномицина D. В течение первых нескольких часов сколько-нибудь существенного различия в скоростях синтеза новых белков не наблюдается. Всплеск синтеза новых белков, который начинается на стадии средней бластулы, связан с трансляцией новосинтезированных мРНК и не наблюдается у зародышей, развивающихся в присутствии актиномицина D. (По Gross, Cousineau, 1964.)



Рис. 14.14. Материнский эффект «*0*»-мутации у аксолотля. После спаривания гетерозигот особи с генотипом «*0/0*» могут развиваться благодаря тому, что их матери имели аллель дикого типа. Самцы «*0/0*» стерильны. Однако у самок «*0/0*» могут образовываться мутантные ооциты, которые после оплодотворения останавливаются в развитии на стадии гаструлы, даже если при оплодотворении сперматозоидом был внесен аллель дикого типа. (По Brothers, 1979.)

достаточно для обеспечения развития только до стадии выпупляющейся бластулы.

Опыты на амфибиях дали похожие результаты, правда, в этом случае стимулом для увеличения скорости синтеза белка оказалась овуляция яйца, а не его оплодотворение. В активированных энуклеированных ооцитах лягушки белки, синтезируемые вскоре после оплодотворения, продуцируются не только в соответствующих количествах, но и именно тех типов, что и в контрольных нормальных зародышах (Smith, Ecker, 1965; Ecker, Smith, 1971). В этом случае цитоплазма ооцита также оказывается «запрограммированной» для обеспечения процессов раннего развития даже в отсутствие ядра. В конечном счете в ядрах зародыша инициируется транскрипция, но даже эта транскрипция в эмбриональных ядрах должна быть активирована материнскими факторами ооцита. Эта концепция получила поддержку в исследованиях *0*-мутанта мексиканского аксолотля. *0*-Мутация, обусловленная материнским эффектом, заключается в том, что гомозиготные самки откладывают яйца, которые благополучно оплодотворяются и совершенно нормально развиваются до стадии позднего дробления и ранней бластулы (Briggs, Cassens, 1966). На стадии средней бластулы яйца, откладываемые самкой *0/0*, обнаруживают замедленный митоз. В таких зародышах образуется спинная губа бластопора, но дальнейшее развитие всегда останавливается во время гаструляции (рис. 14.14). На стадии бластулы в ооцитах самок дикого типа начинается синтез новых белков (Malacinski, 1971). Однако в ооцитах самок *0/0* на стадии бластулы не происходит этот всплеск белкового синтеза и набор белков оказывается идентичен тому, что продуцируют энуклеированные зиготы. В то время как в контроле (норме) на стадии поздней бластулы наблюдается интенсивный синтез РНК, в мутантных зародышах синтез РНК не обнаруживается вовсе или отмечается низкий уровень продукции РНК (рис. 14.15). Было показано, что у зародышей, полученных от самок *0/0*, отсутствует фактор, который активирует геном на стадии бластулы (Briggs, Cassens, 1966). Этот фактор можно было изолировать из цитоплазмы нормальных бластомеров или из ядерного сока премейотических ооцитов. Когда этот фактор инъецировали в ооциты от самок *0/0*, он предотвращал остановку развития на стадии гаструлы, позволяя зародышу развиваться нормально.

Таким образом, для активации ядер амфибий нужен специфический фактор. В отсутствие такого фактора развитие продолжается только до той стадии, которая обеспечивается запасенными мРНК ооцита. У амфибий запасенного ооцитного материала достаточно, чтобы зародыш мог начать гаструляцию. Однако дальше развитие без синтеза новых РНК идти не может.

Результаты опытов по физической, химической и генетической энуклеации ооцита с очевидностью свидетельствуют о том, что в его цитоплазме действительно существуют запасенные мРНК и что продукты этих мРНК обеспечивают раннее развитие зародыша.



Рис. 14.15. Включение [^{3}H]-уридина в РНК зародышей дикого типа и мутантных зародышей. Зародышей на стадии бластулы инкубировали в присутствии радиоактивного предшественника РНК в течение 3 ч, отмывали от метки, фиксировали, окрашивали и визуализировали с помощью радиоавтографии. *А*. Клетки нормальных зародышей имеют высокую радиоактивность, что свидетельствует о синтезе РНК. *Б*. Зародыши, полученные от самок, имеющих генотип «*0/0*». Зародыши окрашиваются, но существенного мечения не наблюдается, что указывает на низкий уровень или полное отсутствие транскрипции. (Из Carroll, 1974.)

Характеристика материнских мРНК

Эрик Дэвидсон и его коллеги оценили сложность ооцитной мРНК методом, аналогичным использованному ими для анализа сложности яРНК (гл. 13). РНК в большом избытке гибридизовали с денатурированной ДНК; было обнаружено, что значение C_0t для 50%-ной гибридизации пропорционально количеству имеющихся различных РНК-последовательностей. С помощью этого анализа они подсчитали, что каждый ооцит (у представителей самых разнообразных типов животных) имеет различные последовательности в количестве, достаточном для приблизительно 1600 копий каждой из 20 000–50 000 типов РНК (Galau et al., 1976; Hough-Evans et al., 1977). Из клеток всех известных типов мРНК ооцита характеризуется наибольшей сложностью, и эта сложность отражает огромный потенциал ооцита к развитию. Однако лишь немногие из этих мРНК охарактеризованы. Использование бесклеточных систем трансляции и кДНК-зондов позволило идентифицировать в цитоплазме ооцита мРНК гистонов (Skoultchi, Gross, 1973) и мРНК тубулина (Raff et al., 1972). Очевидно, что продукты этих мРНК важны для образования хроматина и митотического веретена при дроблении.

Биохимические методы позволили идентифицировать мРНК для рибонуклеотидредуктазы (фермент, необходимый для образования дезоксирибонуклеотидов из запасенных рибонуклеотидов) и для фермента вылупления (фермент, который позволяет зародышам разрушать оболочки оплодотворения) (Raff, 1980). В ооцитах двустворчатых моллюсков рибонуклеотидредуктаза запасается необычным образом. Большая субъединица накапливается в виде белка в цитоплазме ооцита, а малая субъединица запасается в виде нетранслируемой материнской мРНК. Только после оплодотворения новосинтезированная малая субъединица может объединяться с предобразованной большой субъединицей, чтобы сформировать функциональный фермент (Standart et al., 1986). С помощью методов рекомбинантных ДНК удалось выделить запасенную мРНК для актина и других белков.

Небезынтересно, что некоторые запасенные мРНК распределены по ооциту неравномерно. Такое неравномерное распределение РНК-последовательностей мы наблюдаем в цитоплазме ооцитов улитки и оболочника, но такая же локализация наблюдается в ооцитах морского ежа и лягушки (Rodgers, Gross, 1978). И если, по данным некоторых авторов (Rebagliati et al., 1985), в цитоплазме неоплодотворенных ооцитов *Xenopus* бóльшая часть материнских мРНК распределена равномерно, то некоторые мРНК локализованы либо в анимальной, либо в вегетативной области ооцита. Из этих ооцитов была экстрагирована РНК, содержащая (поли)А, и затем для перевода молекул РНК в популяцию двухцепочечных ДНК была использована обратная транскриптаза. Эти двухцепочечные ДНК были встроены в векторы для клонирования и выращены по отдельности в клетках *E. coli*. Таким путем получили около двух миллионов клонов.

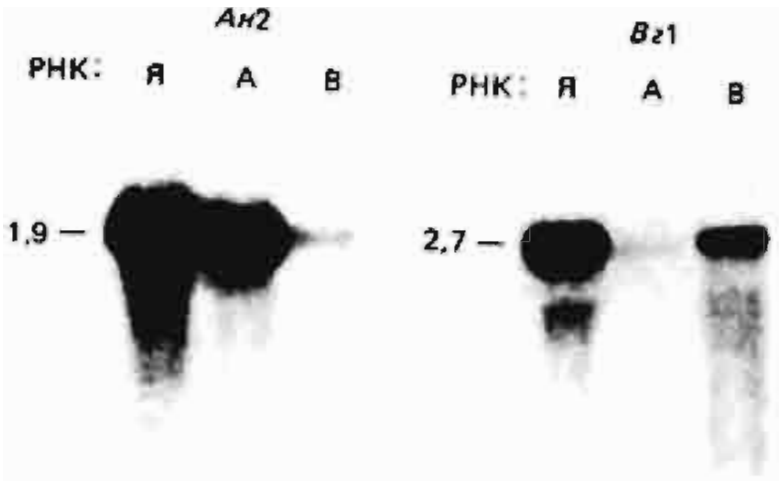


Рис. 14.16. Демонстрация мРНК, локализованной в анимальном и вегетативном полюсах ооцита *Xenopus*. РНК получали из целого яйца (Я), областей анимального (А) и вегетативного (В) полюсов и фракционировали методом электрофореза в геле. РНК переносили с помощью Нозерн-блоттинга на бумажный фильтр, который инкубировали с радиоактивной ДНК клонов, полученных из кДНК, комплементарной мРНК ооцита. Радиоактивная ДНК клона *An2* гибридизуется с мРНК, содержащейся в клетках анимального полюса и не содержащейся в клетках вегетативного полюса. Обратное распределение наблюдается для мРНК, которая гибридизуется с ДНК клона *Bz1*. (*Bz1*-РНК является той самой мРНК, которая упоминалась в гл. 8 как мРНК, кодирующая продукт, подобный фактору роста, играющему, по-видимому, важную роль в детерминации мезодермы.) (Из Rebliagliati et al., 1986; фотография с любезного разрешения D. Melton.)

ДНК из этих клонов (ооцитной библиотеки *Xenopus*) была перенесена на два листа фильтровальной бумаги и денатурирована в условиях, обеспечивающих ее разделение на отдельные нити. Кроме того, исследователи отрезали от ооцита анимальные и вегетативные области и экстрагировали из этих частей содержащую (поли)А РНК. На этих РНК были синтезированы радиоактивные кДНК. Затем одну группу ДНК-содержащих фильтров инкубировали с кДНК для анимальных мРНК, а другую группу – с кДНК для вегетативных мРНК. При измерении связывания радиоактивных кДНК оказалось, что большинство клонов связывали одинаковые количества кДНК из анимальной и вегетативной областей, свидетельствуя о равномерном распределении соответствующих мРНК. Однако около 1,2% клонов связывали только кДНК, полученную на мРНК анимальной области, а около 0,2% клонов связывали только кДНК, полученную на мРНК вегетативной области.

ДНК клонов, специфичных для анимальных или вегетативных мРНК, могли быть затем использованы для идентификации мРНК, локализованных в ооците неравномерно. Для этого РНК экстрагировали из целых яйцеклеток или из их анимальных или вегетативных областей и разгоняли в геле. Электрофоретически разделенные РНК переносили с помощью блоттинга (Нозерн-блоттинг) на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизовали с радиоактивными ДНК-зондами для каждого из клонов, специфичных для определенной области ооцита. Два из полученных результатов показаны на рис. 14.16. Таким образом, неравномерная локализация в цитоплазме предобразованных ооцитных мРНК может наблюдаться и в мозаичных, и в регуляционных яйцах.

Механизм трансляционного контроля ооцитных мРНК

В настоящее время предложено по крайней мере пять гипотез относительно регуляции трансляции ооцитных мРНК. Три из них касаются доступности молекул мРНК, тогда как две другие – эффективности трансляции мРНК. Эти гипотезы могут рассматриваться как конкурирующие друг с другом, однако вполне вероятно, что у большинства видов регуляция трансляции ооцитных мРНК осуществляется с помощью нескольких механизмов.

МАСКИРОВАННЫЕ мРНК. Согласно этой гипотезе, ооцитные мРНК физически замаскированы белками, поэтому мРНК не могут присоединиться к рибосоме. мРНК никогда не обнаруживается свободной от белков. Однако с мРНК могут быть ассоциированы белки различного типа. В 1966 г. Спирин предположил, что мРНК ооцита запасена в **информосомах**, рибонуклеопротеидных комплексах, где мРНК закрыта белками (Spirin, 1966). Эти замаскированные мРНК не способны связываться с рибосомами и поэтому не транслируются. При оплодотворении белки, экранирующие мРНК, отделяются (возможно, из-за изменений ионных условий, происходящих в ходе оплодотворения) и мРНК высвобождается, чтобы инициировать трансляцию.

Вскоре эта гипотеза была подтверждена. В 1968 г. в ооцитах морского ежа были обнаружены рибонуклеопротеидные (РНП) частицы, которые седиментировали медленнее, чем рибосомы (Infante, Nemer, 1968), а несколько позже было обнаружено, что эти частицы содержат разнообразные мРНК (Gross et al., 1973).

Серия экспериментов в лаборатории Рэффа показала, что ооцитная мРНК действительно запасается в такой форме, которая не способна к трансляции и чувствительна к ионным изменениям, происходящим при оплодотворении. Нерибосомные РНП-частицы выделили из зрелых ооцитов морского ежа и выяснили, что они содержат РНК с поли(А)-хвостами (Jenkins et al., 1978). Таким образом, эти РНП-частицы, по-видимому, содержат мРНК. РНП-частицы выделяли в растворах с двумя различными ионными силами (рис. 14.17). Одни частицы были выделены в «ооцитном» буфере, содержащем 0,35 мМ K^+ и 5 мМ Mg^{2+}, т. е. при ионных условиях, соответствующих неоплодотво-

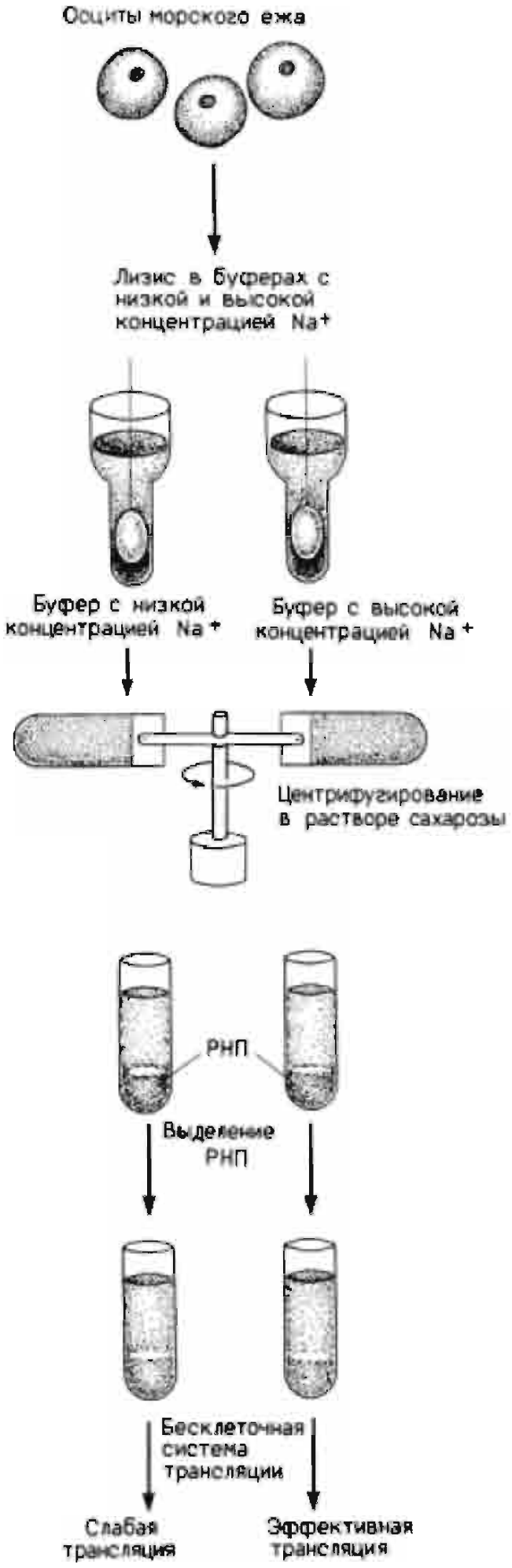


Рис. 14.17. Опыт, демонстрирующий наличие мРНК в РНП-частицах. Связанная с белком РНК не может транслироваться в буфере с низкой ионной силой, но может транслироваться в буфере, содержащем ионы натрия в высокой концентрации; в этих условиях происходит высвобождение мРНК из РНП.

ренному ооциту. Другие частицы выделяли в присутствии 0,35 мМ Na^+, т.е. при той концентрации ионов, когда должны удаляться белки, связанные с мРНК нековалентными связями. мРНК-содержащие частицы, полученные в «ооцитном» буфере, транслировались в бесклеточной системе очень плохо. А РНП, экстрагированные в Na-содержащем буфере, была способна поддерживать белковый синтез почти так же хорошо, как мРНК, выделенная из ооцитов. Поэтому полагают, что приток натрия при оплодотворении может дестабилизировать РНП-частицу, благодаря чему ее мРНК сможет транслироваться (Raff, 1980).

Недавно маскирование запасенных мРНК удалось связать с определенными белками, специфичными для ооцитов. Ооциты содержат мРНК-связывающие белки, которые отличаются от аналогичных белков соматических клеток, и некоторые из этих специфических для ооцита мРНК-связывающих белков узнают определенные последовательности (Audet et al., 1987). Эти различия могут иметь важное функциональное значение. Если глобиновую мРНК инъецировать в ооциты *Xenopus*, то она будет эффективно транслироваться. Однако если эту мРНК предварительно смешать с белками, выделенными из РНП-частиц ооцитов шпорцевой лягушки, то наблюдается крайне незначительный уровень трансляции. РНК-связывающие белки, выделенные из других тканей, не влияли на трансляционную способность инъецированных глобиновых мРНК. Следовательно, специфические для ооцита белки РНП-частиц участвуют в трансляционной регуляции запасенных материнских мРНК (Richter, Smith, 1984).

Известно, что в неоплодотворенном ооците морского ежа в составе полисом содержится менее 1% рибосом, тогда как в бластомерах на стадии дробления в полисомы связано уже около 20% рибосом (рис. 14.18). Поскольку в это время новые мРНК не синтезируются, в полисомы, очевидно, вовлекаются предсуществующие мРНК. В трех проведенных сравнительно недавно экспериментах показано, что в полисомы у зародышей включается мРНК из РНП ооцитов. У морского ежа радиоактивно меченная РНК, которая исходно была в составе РНП ооцита, позже становится связанной с полисомами бластомеров (Young, Raff, 1979). Аналогичная закономерность наблюдалась в ходе раннего развития двустворчатых моллюсков. В этом случае при анализе свободной от белков мРНК ооцитов и зародышей в бесклеточных системах трансляции было обнаружено, что обе эти фракции кодируют одинаковые белки (Rosenthal et al., 1980). Другими словами, ооциты и зародыши содержат одинаковые наборы мРНК. Однако в полисомах ооцитов и зародышей все же имеются различаю-

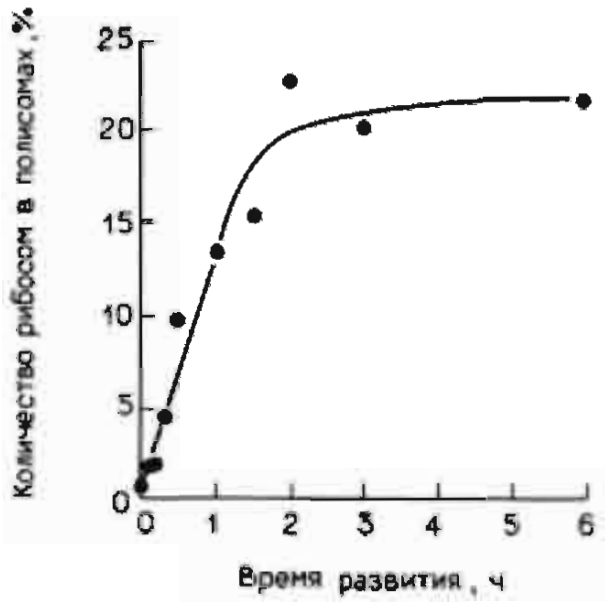


Рис. 14.18. Увеличение относительного количества рибосом, включенных в состав полисом, в ходе раннего развития морского ежа. (По Humphreys, 1971.)

щиеся фракции мРНК. Молекулы мРНК для трех известных белков, специфичных для зародышей (A, B и C), в цитоплазме ооцита обнаруживаются в составе нетранслируемых РНК, тогда как в бластомерах зародыша они обнаруживаются в полисомной мРНК. Напротив, молекулы мРНК для трех белков, характерных для ооцитов (X, Y и Z), выявляются в полисомах ооцитов, но не зародышей. Таким образом, можно проследить рекрутирование мРНК из нетранслируемых РНП в транскрипционно активные полисомы.

Рекрутирование мРНК наблюдается также у зародышей *Drosophila*. Из РНП и полисом ооцита, а также полисом зародышей дрозофилы выделили поли(A)-содержащую мРНК, которую затем транслировали в бесклеточной системе, содержащей радиоактивные аминокислоты (Mermod et al., 1980). Было обнаружено, что на мРНК из РНП ооцитов можно синтезировать определенные белки, которые нельзя синтезировать на мРНК из полисом *ооцитов* (рис. 14.19, *А*, *Б*). Однако эти белки можно синтезировать на мРНК, выделенной из полисом зародыша (рис. 14.19, *В*). Следовательно, мРНК, первоначально запасенная в РНП-частицах ооцита, вовлекается в полисомы зародыша. Таким способом инициация трансляции контролирует экспрессию генов.

мРНК БЕЗ КЭП-ГРУППЫ. Для эффективной трансляции необходимы 5′- и 3′-концы мРНК. Мы уже видели, как различия в длине 3′-поли(A)-хвостов

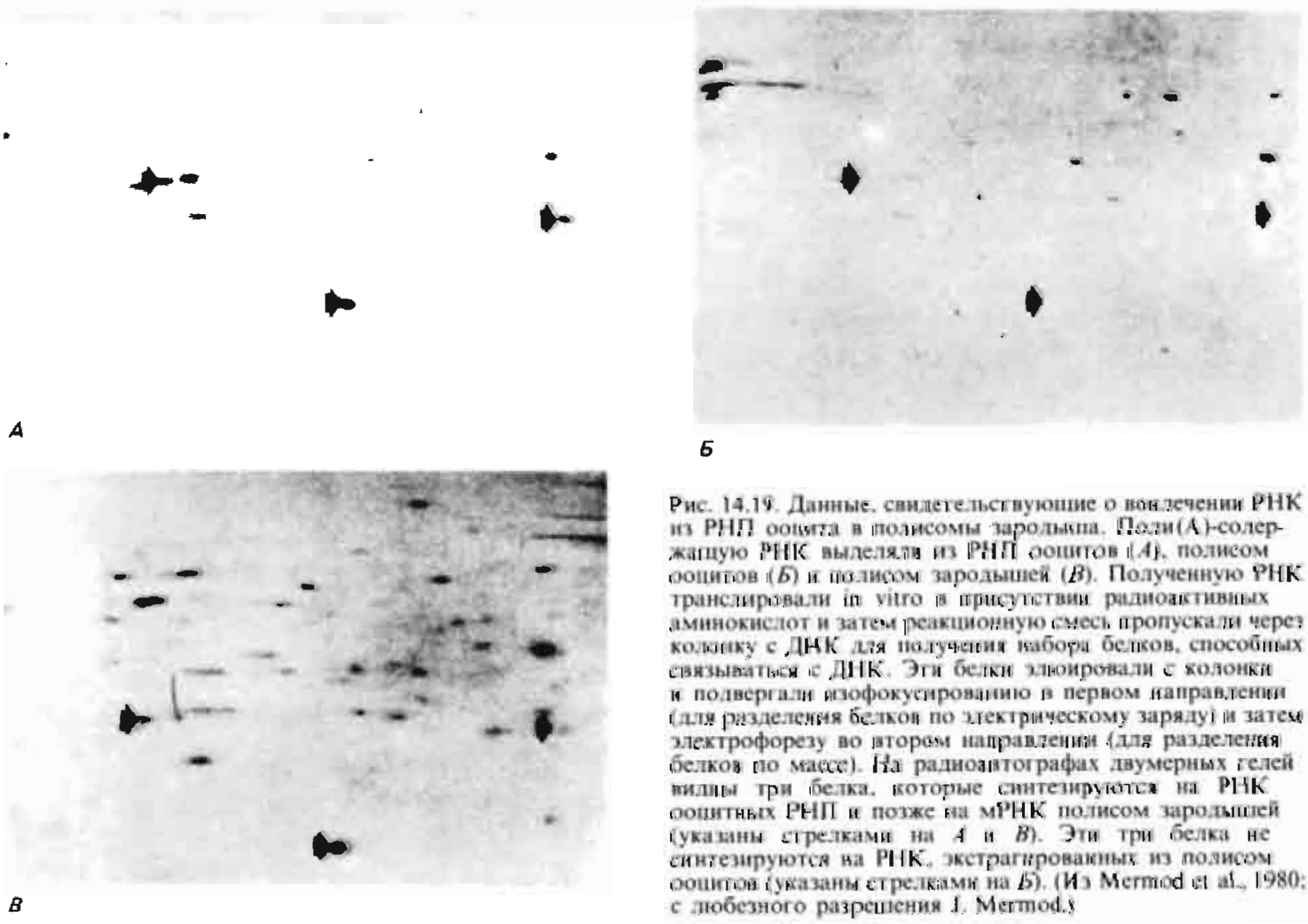


Рис. 14.19. Данные, свидетельствующие о вовлечении РНК из РНП ооцита в полисомы зародыша. Поли(A)-содержащую РНК выделяли из РНП ооцитов (*А*), полисом ооцитов (*Б*) и полисом зародышей (*В*). Полученную РНК транслировали in vitro в присутствии радиоактивных аминокислот и затем реакционную смесь пропускали через колонку с ДНК для получения набора белков, способных связываться с ДНК. Эти белки элюировали с колонки и подвергали изофокусированию в первом направлении (для разделения белков по электрическому заряду) и затем электрофорезу во втором направлении (для разделения белков по массе). На радиоавтографах двумерных гелей видны три белка, которые синтезируются на РНК ооцитных РНП и позже на мРНК полисом зародышей (указаны стрелками на *А* и *В*). Эти три белка не синтезируются на РНК, экстрагированных из полисом ооцитов (указаны стрелками на *Б*). (Из Mermod et al., 1980; с любезного разрешения J. Mermod.)

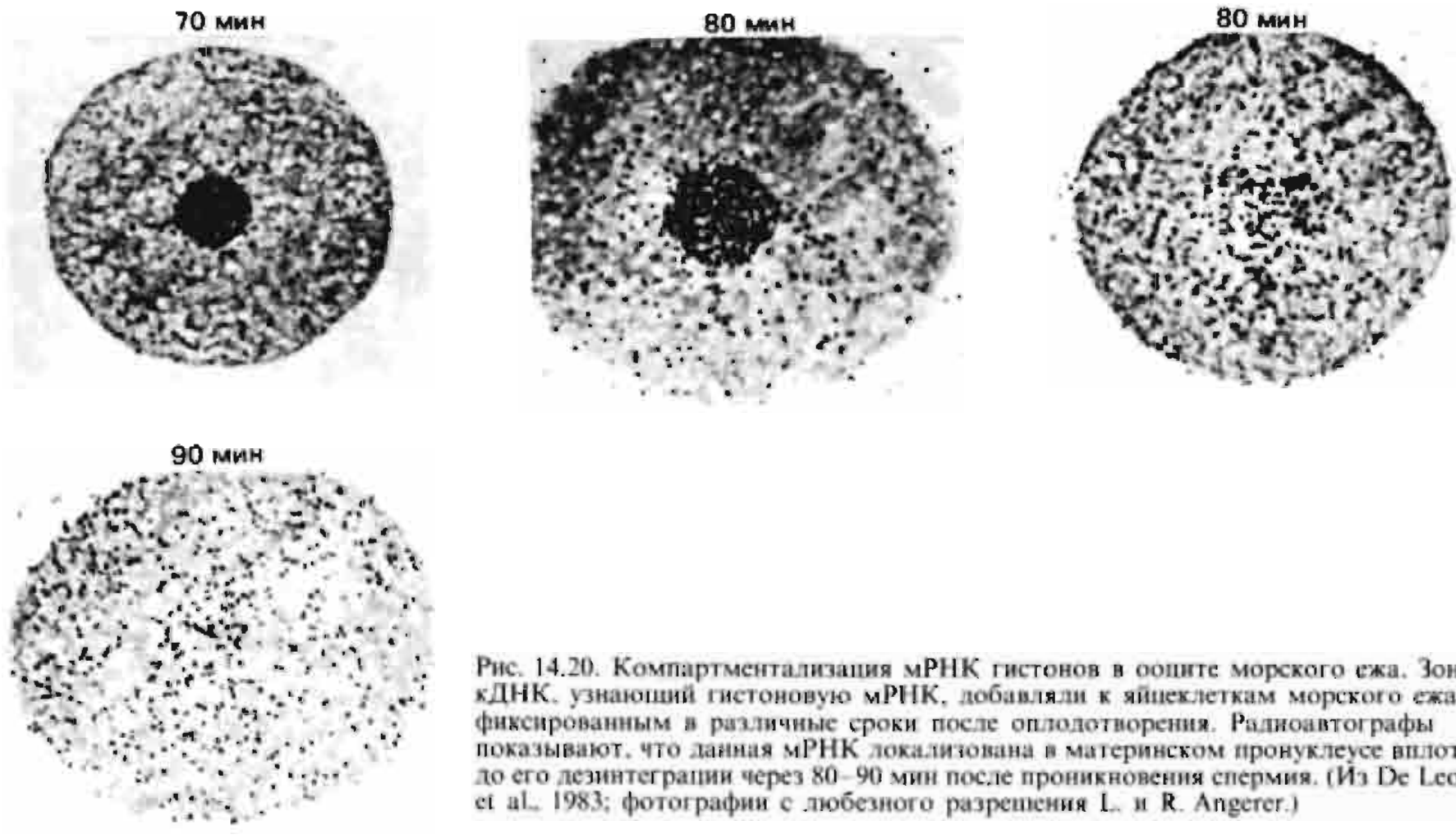


Рис. 14.20. Компартментализация мРНК гистонов в ооците морского ежа. Зонд кДНК, узнающий гистоновую мРНК, добавляли к яйцеклеткам морского ежа, фиксированным в различные сроки после оплодотворения. Радиоавтографы показывают, что данная мРНК локализована в материнском пронуклеусе вплоть до его дезинтеграции через 80–90 мин после проникновения спермия. (Из De Leon et al., 1983; фотографии с любезного разрешения L. и R. Angerer.)

могут влиять на дифференциальную трансляцию РНК в ооцитах *Spisula*. Некоторые бабочки используют для трансляционного контроля механизм, связанный с изменениями 5′-кэп-группы (Kastern et al., 1982). Чтобы эффективно транслироваться, почти все эукариотические мРНК нуждаются в присутствии на своих 5′-концах кэп-группы, содержащей 7-метилгуанозин (Shatkin, 1976). В ооците табачного бражника запасенные мРНК имеют неметилированную кэп-группу, при этом гуанозин содержится, но к нему не добавлена метильная группа. Такие мРНК не транслируются в белки в бесклеточной системе. Однако при оплодотворении в ооцитах бражника проходит волна метилирования и завершается формирование кэп-групп. Молекулы мРНК, обладающие сформированными кэп-группами, способны затем связаться с рибосомами и инициировать трансляцию. В любом случае, замаскирована ли молекула мРНК белками или не завершена модификация ее 5′-конца, инициация трансляции будет подавлена. Эта молекула может не транслироваться до тех пор, пока не поступит соответствующий сигнал.

КОМПАРТМЕНТАЛИЗОВАННЫЕ мРНК. В некоторых работах подвергается сомнению вывод о том, что ооцитные РНП не способны к трансляции. Вместо этого полагают, что белоксинтезирующий аппарат в ооците компартментализован, благодаря чему закрыт доступ мРНК (в составе РНП) к рибосомам (Moon et al., 1982). Синтез гистоновых мРНК в ооцитах морского ежа регулируется, по-видимому, с помощью разграничения такого типа. Гистоновые мРНК локализованы не в цитоплазме ооцита, а в его большом пронуклеусе. И только по завершении оплодотворения, когда пронуклеус разрушается, гистоновая мРНК выходит в цитоплазму (рис. 14.20) (DeLeon et al., 1983). Этого может не быть в случае других мРНК. В пронуклеусе находится менее 0,1% всей мРНК ооцита (Angerer, Angerer, 1981), а те РНП, которые содержат мРНК для актина и тубулина, локализованы преимущественно в цитоплазме (Showman et al., 1982). Известно, что некоторые материнские мРНК, как и отдельные рибосомы, присоединены к цитоскелету (Moon et al., 1983), следовательно, цитоскелет также может отделить молекулы мРНК от рибосом.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ. В предложенных ранее моделях трансляционной регуляции предполагается, что транскрипционный аппарат способен эффективно транслировать любую мРНК, но что мРНК и рибосомы физически или химически отделены друг от друга. На самом деле этого не требуется. Исходно низкое значение pH в ооците само по себе может препятствовать синтезу белка. Как обсуждалось в гл. 2, у морского ежа в ходе оплодотворения происходит значительное высвобождение ионов водорода, приводящее к увеличению значения pH в цитоплазме с 6,9 до 7,4. Из неоплодотворенных ооцитов морского ежа группой исследователей была получена бесклеточная систе-

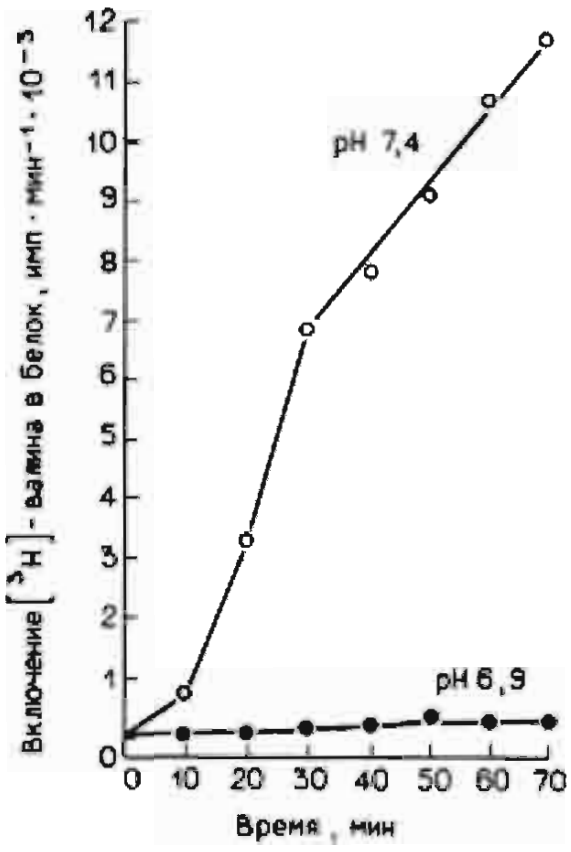


Рис. 14.21. Данные, свидетельствующие о неактивности синтеза белка при значении pH, которое наблюдается в яйцеклетке до оплодотворения. Систему трансляции in vitro, полученную из неоплодотворенных яйцеклеток, оставляли при pH 6,9 или диализовали до pH 7,4. Эндогенные мРНК транслируются значительно эффективнее при значении pH, которое устанавливается после оплодотворения. (По Winkler, Steinhardt, 1981.)

ма трансляции in vitro (Winkler, Steinhardt, 1981). Значение pH в полученной суспензии либо сохраняли неизменным, либо изменяли с помощью диализа и затем измеряли включение радиоактивного валина в белки. Экзогенную мРНК не добавляли. На рис. 14.21 показаны результаты одного из таких экспериментов. Увеличение значения pH с уровня ооцита (pH 6,9) до уровня зиготы (pH 7,4) вызывало подъем белкового синтеза, напоминающий тот, что происходит при оплодотворении.

Было высказано предположение, что изменение pH активирует трансляционный аппарат яйца (Hille et al., 1985; Danilchik et al., 1986). Рибосомы и факторы инициации, выделенные из ооцитов, были менее активны при трансляции, чем рибосомы, полученные из оплодотворенных яиц. Кроме того, инъекция экзогенной глобиновой мРНК в неоплодотворенные яйцеклетки не увеличивала количества синтезируемого белка. Глобиновая мРНК транслировалась за счет других мРНК, что свидетельствует о наличии какого-то компонента трансляционного аппарата в лимитирующем количестве. Лимитирующим фактором является, вероятно, фактор инициации трансляции. Добавление эФИ-2В (ГТФ-связывающий фактор циклов) или эФИ-4F (кэп-связывающий белок) к лизату, приготовленному из неоплодотворенных яйцеклеток, приводило к увеличению трансляционной эффективности этого лизата (Colin et al., 1987; Lopo et al., 1988). Вполне вероятно, что подщелачивание цитоплазмы яйца служит как для демаскирования мРНК, так и для активации факторов инициации. Это положение получило подтверждение в опытах, показавших трехкратное увеличение связывания мРНК с рибосомами после повышения значения pH (Winkler et al., 1985). При этом не наблюдалось присоединения ооцитных мРНП к рибосомам. Следовательно, яйцеклетка морского ежа регулирует трансляцию как путем изменения доступности мРНК, так и путем активации факторов инициации трансляции. Существует много способов регуляции трансляции запасенных в яйцеклетке мРНК, и различные организмы могут использовать несколько таких способов одновременно.

Материнские мРНК и дробление

Дробление у морского ежа требует непрерывного синтеза белка на запасенных материнских мРНК. Если яйца морского ежа оплодотворяются в присутствии ингибитора трансляции, то дробления не происходит, хотя оба пронуклеуса сливаются. Кроме того, не образуется митотического веретена, хромосомы не конденсируются и ядерная мембрана не разрушается (Wagenaar, Mazia, 1978).

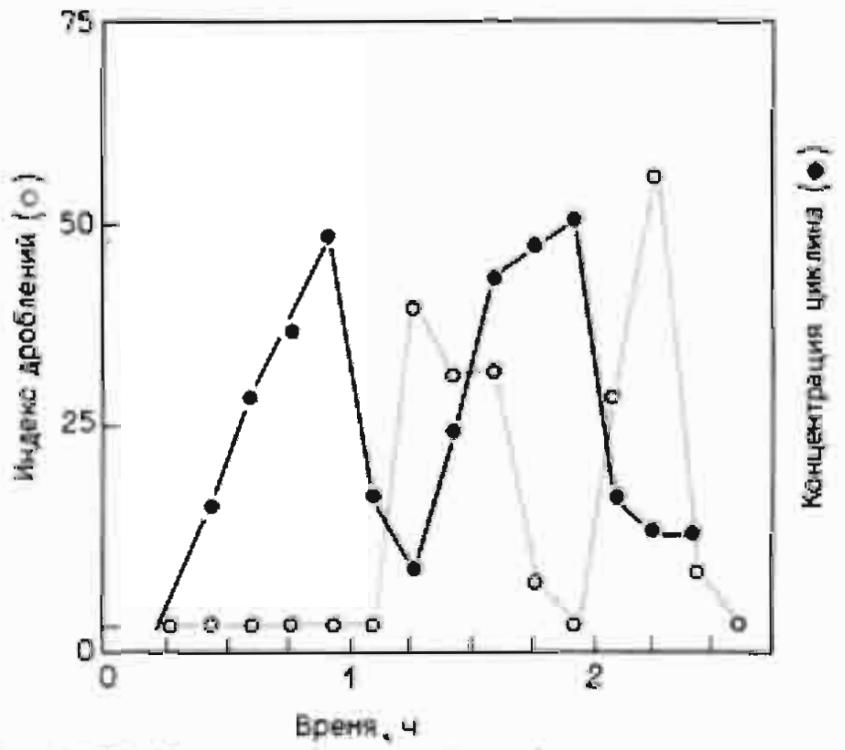


Рис. 14.22. Корреляция делений дробления с концентрацией циклина в зародышах морского ежа. Яйцеклетки оплодотворяли в присутствии радиоактивных аминокислот и через каждые 10 мин определяли относительное количество делящихся клеток и концентрацию специфического белка, который обнаруживает цикличность. Наибольшие концентрации этого белка наблюдали в середине каждого клеточного цикла, затем белок деградировал и синтезировался вновь. Концентрация других белков в данный период увеличивалась линейно (не показано). (По Evans et al., 1983.)

Таким образом, некоторые белки, кодируемые материнскими мРНК, играют, по-видимому, важную роль в делении клеток при дроблении.

Эта гипотеза была подтверждена открытием группы белков, названных **циклинами** (Evans et al., 1983). Циклины кодируются материнскими мРНК и не обнаруживаются в неоплодотворенной яйцеклетке. После оплодотворения их синтез резко возрастает. Особенно замечательно в циклинах то, что они разрушаются при клеточном делении и после завершения каждого деления дробления ресинтезируются заново на запасенных мРНК (рис. 14.22). Синтез циклинов снижается, когда зародыш завершает стадию бластулы. Впервые циклины были обнаружены у морского ежа, позднее – у других видов. Белки А и В у двустворчатого моллюска *Spisula* (о чем упоминалось ранее) представляют собой циклин, и их активность коррелирует с клеточным циклом. После оплодотворения эти белки непрерывно синтезируются на запасенных материнских мРНК и накапливаются в течение S-фазы и ранней М-фазы клеточного цикла. В ходе митоза эти белки разрушаются. Полагают, что циклины могут определять время клеточных делений, так как инъекция циклина А в ооциты *Xenopus* стимулирует их к вхождению в мейоз (Swenson et al., 1986).

Дополнительные сведения и гипотезы

Активация генома зародыша

Скорости развития животных различных видов чрезвычайно сильно варьируют. К 24 часам после оплодотворения личинка дрозофилы уже вылупилась из яйца и интенсивно питается, зародыши амфибий находятся на стадии поздней гаструлы или ранней нейрулы, а зародыши морского ежа – на стадии поздней бластулы или ранней гаструлы, содержащей сотни клеток. Зародыши млекопитающих не торопятся. К 24 часам после оплодотворения зигота мыши разделилась всего лишь один раз, а яйцеклетку человека отделяют от первого деления дробления примерно 6 ч. Исходя из такого разнообразия, можно ожидать, что геномы зародышей различных видов активируются в разное время (табл. 14.4). У зародышей *Xenopus* резкая активация наблюдается после двенадцатого деления дробления (Newport, Kirschner, 1982). До этого времени ядерная транскрипция у нормальных зародышей не обнаруживается, но после перехода к средней бластуле транскрипция начинается с высокой скоростью (рис. 14.23). У морского ежа, по-видимому, ядра зародыша функционируют постоянно. Даже в пронуклеусах перед их слиянием наблюдается транскрипция (в том числе синтез новых гистоновых мРНК), хотя уровень ее очень невысок (Poccia et al., 1985). Эти новосинтезированные мРНК присоединяются к большому фонду материнских мРНК. В ходе первых четырех дроблений хроматин образуется преимущественно из гистонов, запасенных в цитоплазме ооцита, и из гистонов, синтезированных на материнских мРНК. Однако, начиная со стадии 16 клеток бóльшая часть гистонов синтези-

Таблица 14.4. Активация геномов зародышей и продолжительность функционирования материнской мРНК

Организм	Время регистрации первых транскриптов в ядрах	Время основной волны синтеза новых транскриптов в ядрах	Продолжительность функционирования материнских мРНК
Млекопитающие (*Mus musculus*)	Поздняя фаза одноклеточной стадии (11–17 ч)	Ранняя морула (от 8 до 16 клеток) (3 сут)	Четырехклеточная стадия (2–4 сут)
Амфибии (*Xenopus laevis*)	12-е деление дробления (4000 клеток) средней бластулы (7 ч)[1]	12-е деление дробления (4000 клеток) средней бластулы (7 ч)	Стадия нейрулы (15–30 ч)
Иглокожие (*S. purpuratus* и другие морские ежи)	Зигота (стадия пронуклеусов) (⩽0,5 ч)	Средняя бластула (~128 клеток) (11 ч)	Поздняя бластула (15 ч)
Насекомые (*Drosophila melanogaster*)	Синцитиальная бластодерма после 10-го деления ядер (2,5 ч)	Клеточная бластодерма после 14-го деления ядер (3,5 ч)	Средняя фаза органогенеза (~15 ч)

Источники: Wilt, 1964; Poccia et al., 1985; Weir, Kornberg, 1985; Clegg, Piko, 1983; Gilbert, Solter, 1985; Woodland, Ballentine, 1980; Davidson, 1986; Edgar, Schubiger, 1986.

[1] Время указывает продолжительность инкубации при соответствующей температуре. Крайне низкий уровень синтеза РНК наблюдается у *Xenopus* уже на стадии 6-го деления дробления (64 клетки, 3,5 ч), если бластомеры инкубируются в специальных условиях (Nakakura et al., 1987).



Рис. 14.23. Активация транскрипции и клеточной подвижности после двенадцатого клеточного деления у *Xenopus*. Транскрипцию измеряли с помощью радиоавтографии по числу восстановленных зерен серебра над областью ядер зародышей, инкубированных в присутствии радиоактивного уридина, а также по активации клонированного гена тРНК, радиоактивный продукт которого можно было определить по плотности соответствующей зоны на радиоавтографе геля. Подвижность определяли, подсчитывая фракцию клеток, имеющих ламеллоподии или обнаруживающих лакуны при видеозаписи. (По Davidson, 1986.)

руется на молекулах мРНК, которые были транскрибированы в ядрах клеток зародышей (Goustin, 1981). Эта картина существенно отличается от той, что наблюдается у зародышей *Xenopus*, у которых значительный фонд запасенных в ооците гистонов и большой запас ооцитных гистоновых мРНК используются тысячами клеток.

У дрозофилы транскрипция в ядре наблюдается впервые после его десятого деления. Это первый клеточный цикл с G2-фазой, и длительность G2-фазы увеличивается с 10 мин после 10-го цикла до 60 мин после 14-го цикла. В G2-фазе 14-го цикла уровень транскрипции генома наибольший в течение всего эмбриогенеза (Anderson, Lengyel, 1979; Weir, Kornberg, 1985). Ядра дрозофилы приобретают компетентность к транскрипции на 10-й цикл, но большинству генов для активации требуется более продолжительная G2-фаза (Edgar, Schubiger, 1986). Высокая транскрипционная активность, свойственная зародышам 14-го цикла, может быть индуцирована ранее с помощью искусственного удлинения G2-периода циклогексимидом. Эту активацию можно осуществить в зародышах 10-го цикла, но не в более ранних. Следовательно, большинство генов приобретают способность к активации в течение 10-го цикла, но не инициируют свою транскрипцию вплоть до 14-го цикла.

В отличие от организмов, обсуждавшихся выше, для мышей характерен определенный период, когда используются материнские мРНК, за которым следует период, когда эти мРНК заменяются на ядерные транскрипты. Материнские мРНК существуют около двух суток – примерно такое же время они существуют у представителей других эволюционных групп, – и затем, в течение вторых суток, материнские мРНК быстро разрушаются (Clegg, Piko, 1983). Когда продукты, кодируемые материнскими мРНК, распадаются, они заменяются новыми белками, синтезированными на мРНК, новообразованной в ядре. В большинстве случаев хромосомы, полученные от спермия, активируются, вероятно, одновременно с хромосомами, полученными от яйца (Gilbert, Solter, 1985).

У всех исследованных видов животных существует период, когда события раннего развития контролируются посредством мРНК и белков, запасенных в цитоплазме ооцита. У большинства видов (млекопитающие составляют исключение) ядерный геном активируется задолго до того, как разрушаются материнские мРНК, поэтому оба набора мРНК транслируются одновременно. В конечном счете, когда на первые или вторые сутки материнские мРНК разрушаются, транскрипты с генома зародыша начинают играть главную роль.

Гормональная стабилизация специфических мРНК

Продукты дифференцированных генов синтезируются нередко в ответ на гормональную индукцию. В некоторых таких случаях гормоны не увеличивают транскрипцию определенных мРНК, а действуют на уровне трансляции. Одним из таких примеров является синтез казеина у млекопитающих. Казеин – главный фосфопротеид молока, и поэтому он представляет собой дифференцированный продукт молочной железы. Как будет обсуждаться более подробно в гл. 19, молочная железа формируется благодаря последовательному действию ряда гормонов. При этом пролактин является гормоном, ответственным за лактацию, т. е. за реальную продукцию молока. Пролактин увеличивает транскрипцию казеиновых мРНК всего лишь примерно в 2 раза, а главный его эффект – очевидно, стабилизация казеиновых мРНК (Guyette et al., 1979). Пролактин каким-то образом увеличивает продолжительность жизни казеиновой мРНК настолько, что она существует в 25 раз дольше, чем другие мРНК в клетке (рис. 14.24). В результате каждая молекула казеино-

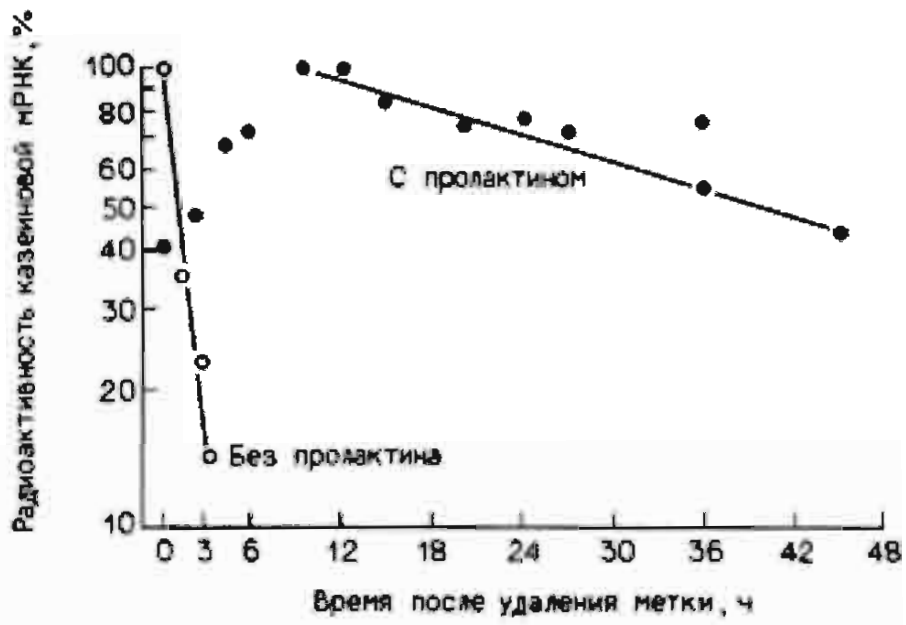


Рис. 14.24. Разрушение мРНК казеина в присутствии пролактина и в его отсутствие. В культуру клеток млекопитающих добавляли радиоактивные предшественники РНК ("pulse"); через определенное время клетки отмывали и инкубировали с нерадиоактивными предшественниками ("chase"). Затем выделяли казеиновую РНК, синтезированную в период мечения, и определяли ее радиоактивность. В отсутствие пролактина новосинтезированная казеиновая мРНК быстро разрушается с временем полужизни, равным 1,1 ч. Когда тот же опыт провели в среде, содержащей пролактин, время полужизни мРНК увеличилось до 28,5 ч. (По Guyette et al., 1979.)

вой мРНК может быть использована для большего числа циклов трансляции. При этом с каждой молекулы мРНК может быть синтезировано больше, чем обычно, молекул белка. В табл. 14.5 представлены данные, которые показывают, что другие гормоны также увеличивают стабильность специфических мРНК.

Широкая распространенность контроля на уровне трансляции

Контроль на уровне трансляции является, вероятно, основным механизмом регуляции развития. Мы убедились в его важной роли при запуске синтеза белка после оплодотворения, при сбалансировании синтезов компонентов гемоглобина и индуцированном гормоном синтезе казеина. Имеется много других случаев трансляционной регуляции, детальный механизм которых еще не известен. Например, глюкоза способна вызывать 10-кратное увеличение синтеза проинсулина в β-клетках поджелудочной железы. Когда для определения содержания инсулиновой мРНК в β-клетках использовали кДНК-зонд, было обнаружено, что стимулированные глюкозой клетки содержат проинсулиновой мРНК не больше, чем нестимулированные клетки (Itoh, Okamoto, 1980). Следовательно, регуляция синтеза инсулина глюкозой осуществляется на уровне трансляции, а не транскрипции. В эритробластах и культивируемых клетках млекопитающих и птиц обнаруживаются мРНП (называемые **просомами**), которые, подобно информосомам ооцита, ингибируют непосредственную трансляцию связанных с ними мРНК (de Sa et al., 1986; Akhayat et al., 1987). Реактивация высушенных зародышей морской креветки регулируется, по-видимому, также на уровне трансляции. Эти зародыши (продающиеся часто как «морские обезьяны») начинают развитие и затем в течение длительного времени могут пребывать в покое. В покоящихся зародышах белок не синтезируется. Было обнаружено, что в них содержится ингибитор белкового синтеза и что при реактивации уровень функционального эФИ2 увеличивается в 20 раз (Filipowicz et al., 1975). Кроме того, было показано, что этот ингибитор может представлять собой

Таблица 14.5. Стабилизация гормонами специфических мРНК

мРНК	Клетки или ткани	Регуляторный эффектор	Время полужизни, ч	
			+ эффектор	− эффектор
Вителлогенин	Печень *Xenopus*	Эстроген	500	16
Альбумин	Печень *Xenopus*	Эстроген	3	10
Вителлогенин	Печень птиц	Эстроген	22	~2,5
Apo VLDL II	Печень птиц	Эстроген	26	3
Казеин	Молочная железа крысы	Пролактин	92	5
Гормон роста	Клетки гипофиза крысы в культуре	Дексаметазон и тироксин	20	2
Инсулин	Клетки панкреатического островка крысы	Глюкоза	77	29
Овальбумин	Яйцевод курицы	Эстроген, прогестерон	~24	2–5

Источник: Shapiro et al. (1987)

протеинкиназу (Sierra et al., 1977). Таким образом, у зародышей морской креветки может функционировать такой же механизм регуляции, который участвует в регуляции синтеза гемоглобина.

По-видимому, даже спермии контролируют экспрессию определенных генов на уровне трансляции. Как и в яйцеклетках, в спермиях могут запасаться мРНК для последующего использования. Это можно наблюдать в спермиях птиц и млекопитающих для лактатдегидрогеназы-Х (ЛДГ-Х). Этот *белок* синтезируется только на поздних стадиях развития спермиев, однако *ген* ЛДГ-Х транскрипционно активен на всех стадиях сперматогенеза (Blanco, 1980). Синтез белка ЛДГ-Х регулируется, вероятно, на стадии инициации трансляции запасенных мРНК.

Один из наиболее неожиданных механизмов трансляционного контроля был обнаружен недавно в случае регуляции синтеза аполипопротеина-В. Белки apo-B являются компонентами сывороточных белков – переносчиков липидов, и, как полагают, они играют главную роль в развитии атеросклероза. Apo-B48 (48 000 дальтон) синтезируется в кишечнике и становится частью хиломикронных комплексов, необходимых для адсорбции и транспорта холестерола и триглицеридов пищи. Apo-B100 (100 000 дальтон) синтезируется в печени и является основным компонентом белков-переносчиков липидов очень низкой, низкой и промежуточной плотности. Белки apo-B100 и apo-B48 транскрибируются с одного и того же гена, причем дифференциального процессинга РНК, который мог бы генерировать различные мРНК для этих двух белков, не наблюдается. Анализ кДНК для apo-B свидетельствует о том, что в *печени* apo-B мРНК кодирует полный полипептид apo-B100. А соответствующая мРНК из *кишечника* отличается от мРНК из печени только одним основанием. Произошла замена Ц на У, что привело к замене обычного кодона для глутамина (ЦАА) на кодон-терминатор (УАА) в кодоне 2153. Это различие проявляется в образовании в кишечнике более короткого белка apo-B48 (Powell et al., 1987; Chen et al., 1987). Этот случай, по-видимому, может служить примером, когда в самой мРНК происходит специфическая замена основания. До этого времени аксиомой молекулярной биологии являлось представление, что нуклеотиды в уже синтезированной мРНК не могут быть изменены. Нам неизвестен какой-либо другой пример образования новых белков в результате изменения информации в самой мРНК.

Таким образом, трансляционный контроль является весьма важным и широко используемым механизмом регуляции экспрессии генов в развитии.

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Коль скоро белок синтезирован, он встраивается в структуры более высокого уровня организации. Он может стать частью цитоскелета или включиться в один из множества ферментативных путей синтеза и распада клеточных метаболитов. В любом случае индивидуальный белок является теперь частью сложной «экосистемы», которая интегрирует его во взаимоотношения с многочисленными другими белками. Поэтому нам не уйти от проблемы регуляции экспрессии генов и после того, как белок синтезирован, ввиду некоторых изменений, которые могут еще произойти. Во-первых, некоторые новосинтезированные белки не активны без последующих модификаций. Эти модификации могут заключаться в отщеплении определенных ингибиторных доменов белка или в присоединении небольших компонентов для увеличения активности белка. Во-вторых, некоторые белки могут избирательно инактивироваться. Иногда инактивация может осуществляться с помощью присоединения ингибиторного лиганда. В-третьих, некоторые белки должны быть «адресованы» в свои специфические внутриклеточные компартменты. Клетка не просто мешок с ферментами; обычно белки локализуются в определенных областях, таких, как мембраны, лизосомы или митохондрии. В-четвертых, некоторым белкам необходимо объединиться с другими белками, чтобы образовать функциональное целое. Гемоглобин, микротрубочки и рибосомы – все это примеры объединения многочисленных белков, чтобы сформировать функциональный комплекс. Следовательно, на экспрессию генетической информации можно влиять также и на посттрансляционном уровне.

Посттрансляционная активация белков

Многие новосинтезированные полипептиды не активны до тех пор, пока от них не будут удалены определенные аминокислотные остатки. Эта ситуация особенно показательна в случае пептидных гормонов. Например, предшественником инсулина является длинный полипептид с тремя дисульфидными мостиками. Гормон становится активным только после удаления середины и начала пептида. Две оставшиеся части, удерживаемые дисульфидными связями, составляют активную молекулу (рис. 14.25). В случае АКТГ-эндорфина несколько небольших пептидных гормонов синтезируются в виде одного предшественника (рис. 14.26). Этот полипептид может быть расщеплен с образованием адренокортикотропного гормона (АКТГ), γ-липотропина (γ-ЛТГ) и β-эндорфина. Последующий про-

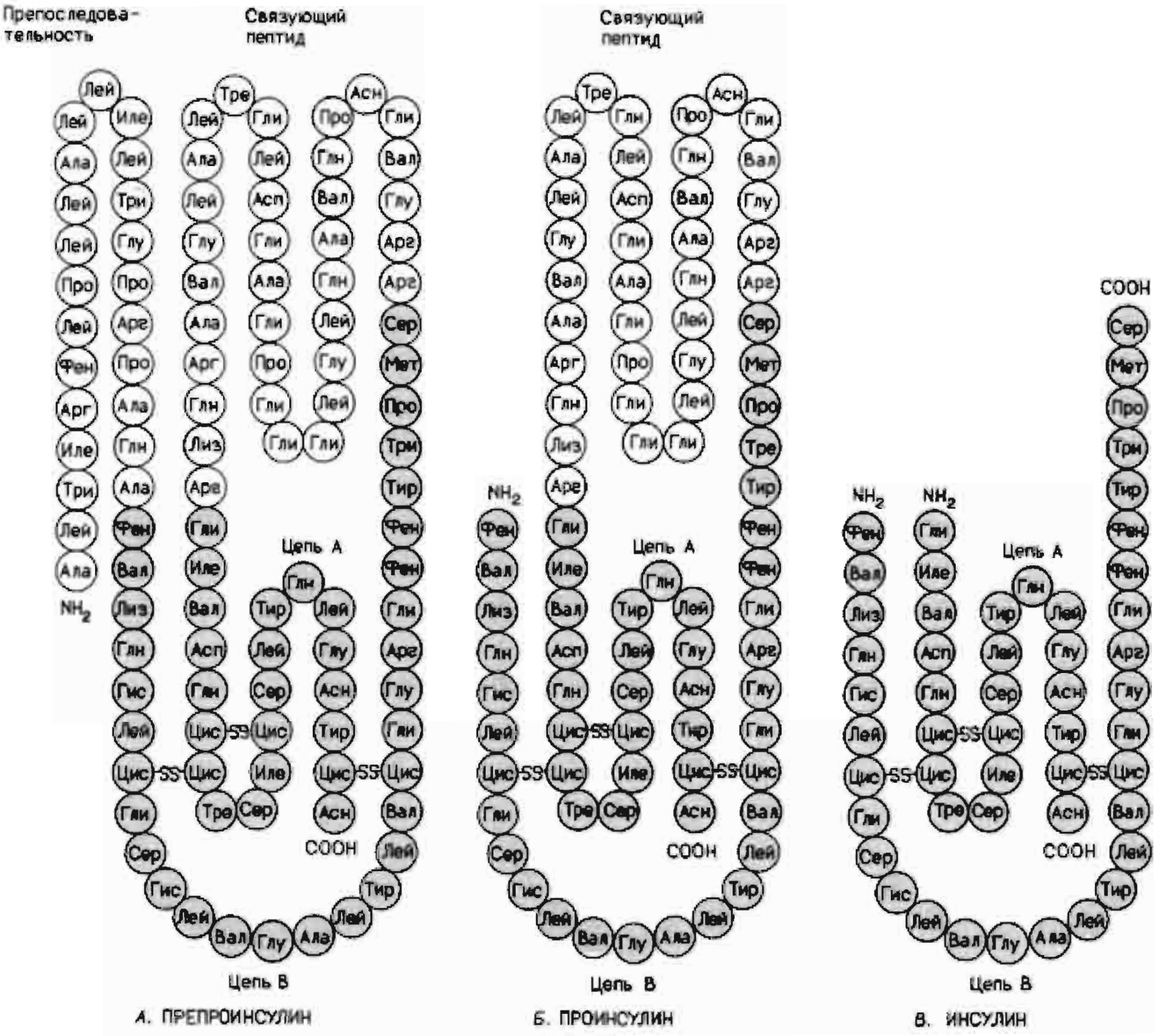


Рис. 14.25. Аминокислотные последовательности инсулина II (темные кружки) и его предшественников у крысы. Молекула инсулина не активна до тех пор, пока не удаляются препоследовательность препроинсулина и промежуточная связующая последовательность проинсулина. Аминокислотная последовательность для первых 24 остатков препроинсулина определена с помощью секвенирования гена для препроинсулина II крысы (Chan et al., 1979) и перевода ее в последовательность белка.

цессинг этих гормонов зависит от типа клеток, в которых они находятся. В клетках передней доли гипофиза АКТГ является конечным продуктом, который может секретироваться, чтобы стимулировать продукцию стероидов в коре надпочечников. Однако в клетках промежуточной доли гипофиза АКТГ расщепляется с образованием α-меланоцит-стимулирующего гормона (α-МСГ) (см. обзор Herbert et al., 1981).

Некоторые белки могут функционировать только после того, как они модифицируются ковалентным присоединением меньших по размеру молекул. Например, фосфорилаза-киназа не активна, если она сама не фосфорилирована. Однако будучи фосфорилированной, она каталитически активна. Коллаген, один из основных структурных белков тела, не может функционировать, если его пролины и определенные лизины не гидроксилированы, и неспособность к этой модификации приводит иногда к серьезным заболеваниям.

Посттрансляционные модификации гистонов могут играть важную роль в регуляции самой транскрипции. У миксомицета *Physarum polycephalum* отсутствуют клеточные стенки, и активность всех ядер регулируется синхронно внутри общей цитоплазмы, что делает этот объект прекрасной мо-

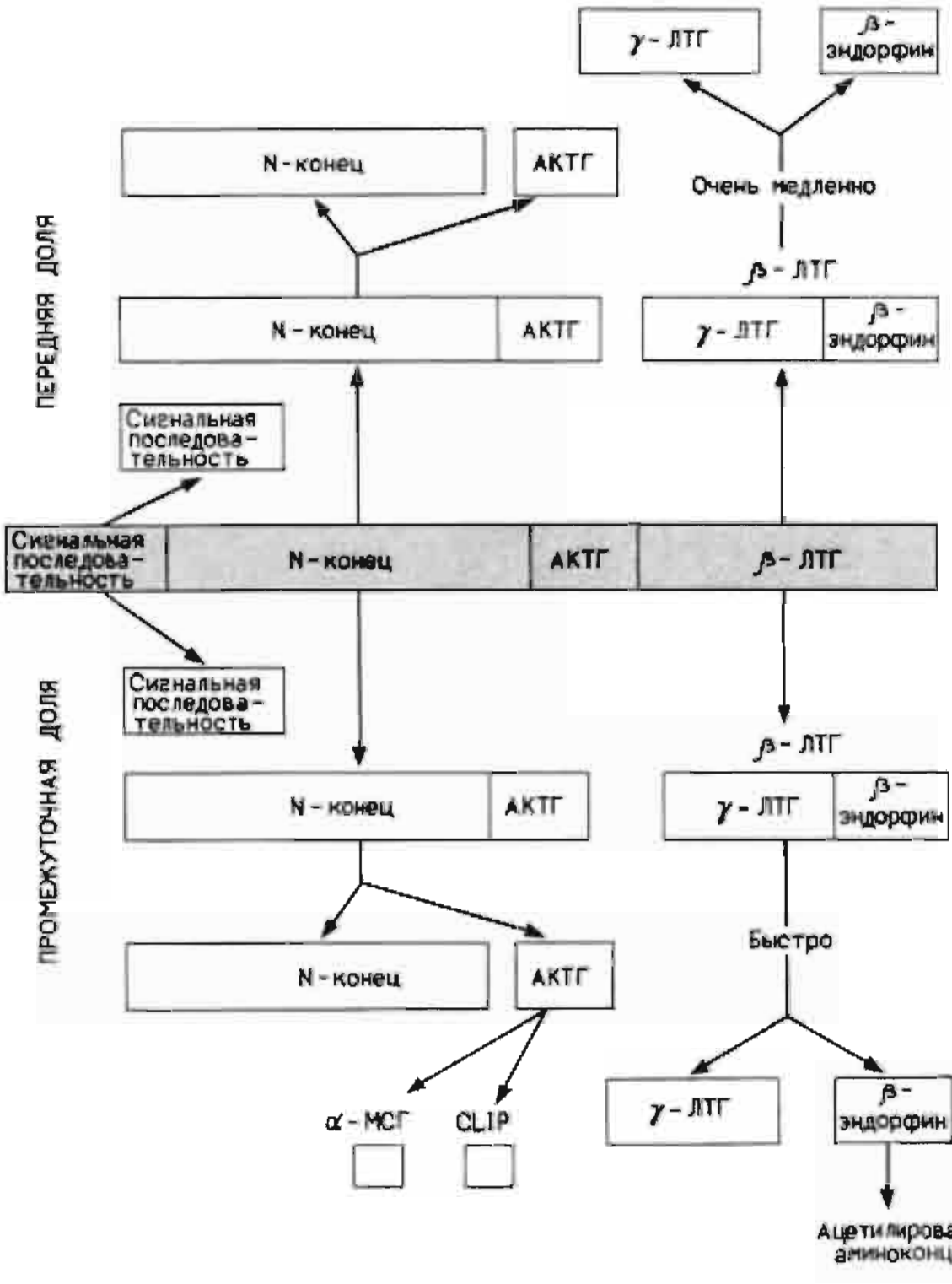


Рис. 14.26. Процессинг про-АКТГ-эндорфина (темная полоса) в промежуточной и передней долях гипофиза крысы. АКТГ – адренокортикотропный гормон; γ-ЛТГ – γ-липотропный гормон; α-МСГ – α-меланоцитстимулирующий гормон. (По Herbert et al., 1981.)

делью для изучения биохимии клеточного цикла. У физарума гистон H4 может существовать в нескольких формах в зависимости от характера его ацетилирования. Сильноацетилированный (2–4 ацетильных группы) H4 связан с транскрипционной активностью (Chahal et al., 1980). Напротив, фосфорилирование гистона H1 проявляется в активации его способности конденсировать хроматин, благодаря чему транскрипция уменьшается. Ацетилирование H4 и фосфорилирование H1 у этого миксомицета находятся в обратной зависимости друг от друга. Таким образом, валовая транскрипционная активность хроматина может регулироваться фосфорилированием или ацетилированием гистонов.

Инактивация белков при посттрансляционных модификациях

Изменения предсуществующих белков могут приводить также к их *инактивации*. Ранее в этой главе мы указали, как фосфорилирование инактивирует фактор инициации 2, регулируя тем самым синтез гемоглобина. Сходным образом инактивируются при фосфорилировании гликоген-синтетаза и пируваткиназа. Глутамин-синтетаза инактивируется, когда на нее переносится остаток АМФ. Поскольку все эти реакции обратимы, каталитическая активность белков может регулироваться исключительно точно с помощью изменения активности ферментов, добавляющих или отщепляющих модифицирующие группы.

В ряде случаев некоторые белки опасно оставлять внутри клетки. Например, необходимо, чтобы быстро разрушались белки, вызывающие переход клеток к делению, если с ростом клеток скоординирован синтез ДНК. Эти быстро разрушающиеся белки (время полужизни которых составляет менее 2 ч) содержат одну или несколько областей, богатых пролином, глутаминовой кислотой, серином и треонином (Rogers et al., 1986). Долгоживущие белки редко имеют такие кластеры, а если и имеют, то они упрятаны глубоко внутри структуры белка. Однако наиболее важным единичным детерминантом времени жизни белка является, по-видимому, его аминоконцевая аминокислота. Бахмайр и др. (Bachmair et al., 1986) с помощью мутирования клонированного гена для β-галактозидазы изменяли первый кодон (АУГ) на кодоны для пятнадцати других аминокислот. Когда клетки дрожжей были трансформированы этими шестнадцатью плазмидами, несущими ген дикого типа или один из его мутантных аллелей, разница в продолжительности жизни соответствующего белка оказалась огромной (табл. 14.6). И если время полужизни внутри клетки для нормальной β-галактозидазы (с метионином на своем аминоконце) составляет более 20 ч, то в случае других аминоконцевых аминокислот это время порой сокращается до менее 3 мин.

Таблица 14.6. Зависимость стабильности белка от концевого аминокислотного остатка

Остаток X в X-β-галактозидазе	Время полужизни X-β-галактозидазы
Мет, Сер, Ала, Тре, Вал, Гли	>20 ч
Иле, Глу	~30 мин
Тир, Глн	~10 мин
Фен, Лей, Асп, Лиз	~3 мин
Арг	~2 мин
Про	~7 мин

Источник: Bachmair et al., 1986.

Корреляция между продолжительностью жизни белка и его аминоконцевой аминокислотой распространяется, очевидно, также и на природные белки. Кроме того, эта корреляция соответствует наблюдениям, что аминоконцы белков претерпевают посттрансляционную модификацию при гибели клеток in vivo (Soffer, 1980; Shyne-Athwal et al., 1986). При этом на аминоконцы белков переносятся с аминоацилированных тРНК дестабилизирующие аминокислоты (Арг, Лиз, Лей, Фен и Тир). Предполагается, что определенный фактор присоединяется к другим клеточным белкам, превращая их в мишень для деградации, и что вероятность связывания этого фактора с любым данным белком зависит от его аминоконца (Bachmair et al., 1986). Связавшись, этот фактор обеспечивает присоединение к данному белку **убиквитина**. Пришивание убиквитина (небольшой пептид, который образует ковалентные связи с остатками лизина белка-мишени) маркирует белок для деградации. На рис. 14.27 показано, что каждая молекула β-галактозидазы, намеченная для деградации, комплексируется с молекулами убиквитина в количестве до 15.

Клетки различаются по белкам, которые они способны разрушать. Один из таких примеров – лактатдегидрогеназа (ЛДГ), которая катализирует обратимое взаимопревращение пирувата и лактата. ЛДГ кодируется двумя различными генами: один ген кодирует субъединицы ЛДГ-А, а другой – ЛДГ-В. Эти гены находятся на разных хромосомах. Функциональный фермент ЛДГ является тетрамером, т.е. он состоит из четырех субъединиц. Эти субъединицы могут быть А- или В-разновидностей. Если экспрессируются оба гена, то ожидается присутствие пяти различных форм ЛДГ: А4, А3В1, А2В2, А1В3 и В4. Альтернативные формы фермента называют **изоферментами**. Эти изоферменты ЛДГ обладают различной каталитической активностью при различных клеточных условиях. Если оба гена ЛДГ экспрессируются одинаково и рекомбинация субъединиц происходит случайно, то можно ожидать появления изоферментов разных типов в следующем отношении 1(А4):4(А3В1):6(А2В2):4(А1В3):1(В4). Эти изоферменты имеют различные электрические заряды, так как субъединица В несет больший отрицательный заряд, чем субъединица А. Следовательно, эти пять изоферментов можно разделить при электрофорезе и затем окрасить их на каталитическую активность (рис. 14.28). Когда равные количества субъединиц объединяются искусственно, действительно обнаруживается отношение 1:4:6:4:1. Однако если обратиться к индивидуальным органам, то наблюдаются значительные отклонения от этого соотношения. Мышечная ЛДГ состоит преимущественно из А-субъединиц, тогда как изоферменты в семенниках, сердце и поч-

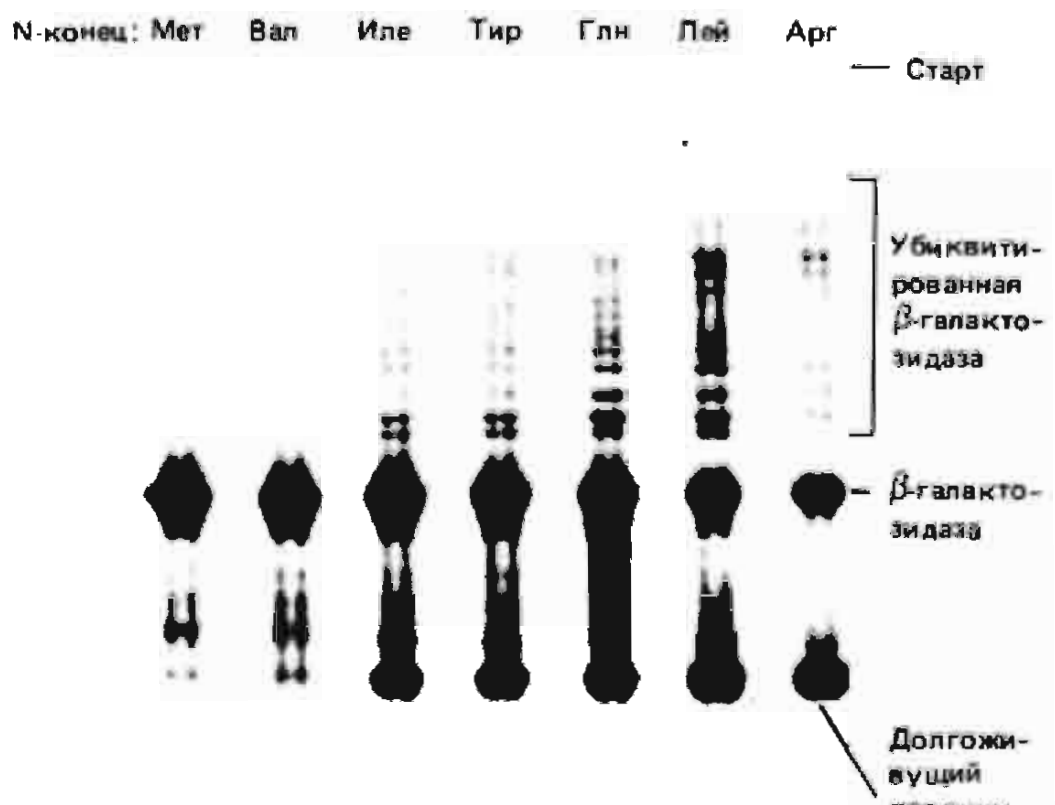


Рис. 14.27. Разрушение β-галактозидазы с различными аминокислотами на аминоконце. Плазмиды, несущие различные гены (каждая плазмида содержала один ген β-галактозидазы, но каждый ген кодировал различные аминоконцы), вводили в клетки дрожжей, которые затем метили радиоактивным метионином в течение 5 мин. Клетки лизировали и ген β-галактозидазы выделяли с помощью иммунопреципитации антителами, полученными к этому ферменту. Белки, узнаваемые антителами (и поэтому выпадающие в осадок), отделяли от антител и неосажденных белков, разделяли в геле и подвергали радиоавтографии. Те полипептиды β-галактозидазы, которые начинались метионином (Мет) или валином (Вал), разрушались в очень незначительной степени. Полипептиды, начинавшиеся изолейцином (Иле), тирозином (Тир) или глутамином (Глн), разрушались достаточно сильно (накопление молекул в нижней части геля), присоединяя наряду с этим несколько пептидов убиквитина (набор полос в верхней части геля свидетельствует об утяжелении интактного белка). β-Галактозидазы, начинающиеся лейцином (Лей) или аргинином (Арг), разрушались в еще большей степени. (Из Bachmair et al., 1986; фотография с любезного разрешения A. Bachmair.)

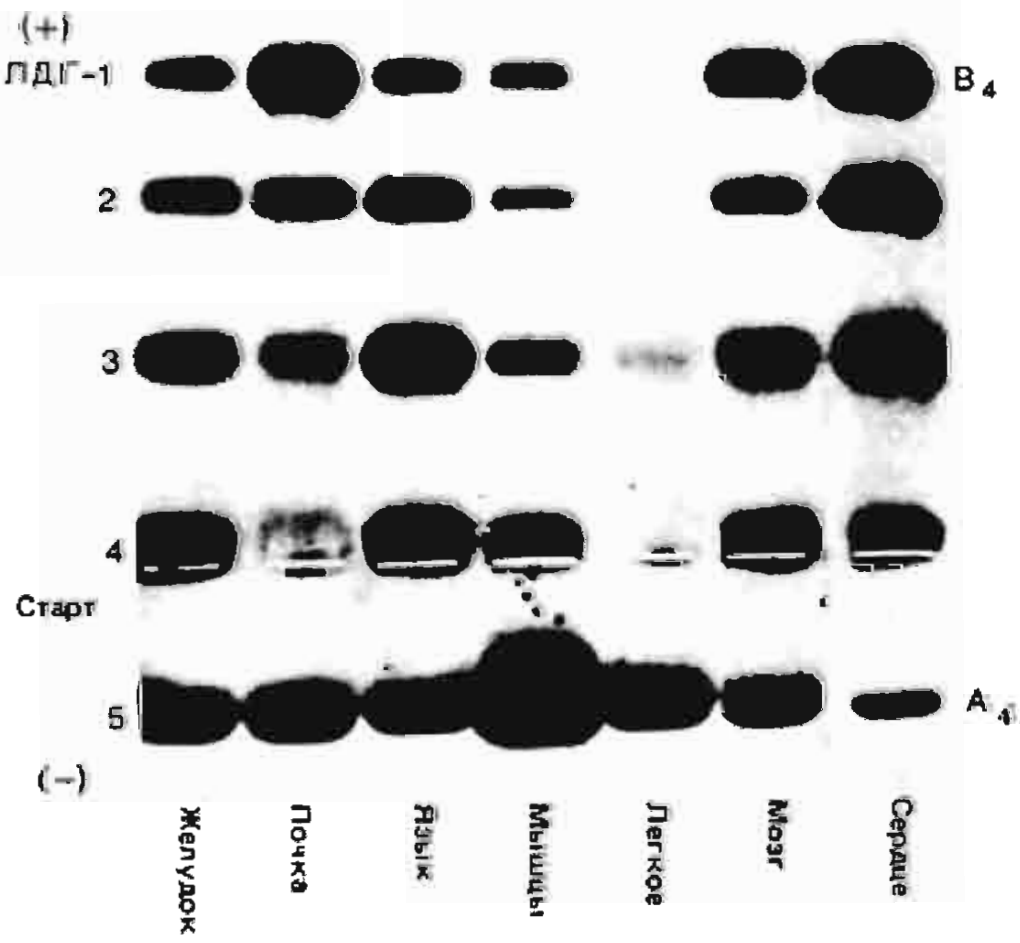


Рис. 14.28. Гель-электрофорез, показывающий различное содержание пяти изоферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в разных тканях крысы. (Из Markert, Ursprung, 1971.)

ках составлены в основном из В-субъединиц (Markert, 1968).

Используя антитела к ЛДГ для осаждения новосинтезированных А-субъединиц, группа исследователей (Fritz et al., 1969) показала, что скорость синтеза ЛДГ-А существенно не варьирует в разных тканях. Однако скорость ее разрушения варьирует очень сильно. ЛДГ-А сердечной мышцы разрушается в 22 раза быстрее, чем в скелетной мышце. Поэтому контроль изоферментов ЛДГ осуществляется не на уровнях транскрипции или трансляции, а на уровне разрушения фермента.

Субклеточная компартментализация белков с помощью посттрансляционных модификаций: адресование белков в мембраны и лизосомы

После того как белки синтезированы, они должны быть правильно размещены в клетке. В конечном итоге белок может быть локализован в растворимой цитоплазме, митохондриях, лизосомах, эндоплазматическом ретикулуме или ядре; он может быть даже выделен клеткой.

Белки, которые предназначены для лизосом, эндоплазматического ретикулума или секреции, проходят в полость гранулярного эндоплазматического ретикулума в то время, когда они еще транслируются (рис. 14.29). Эти белки (включая коллаген и пептидные гормоны, обсуждавшиеся ранее) имеют **сигнальную последовательность**, состоящую примерно из 30 аминокислот, которая узнается **сигнальным рецепторным комплексом**, плавающим в цитоплазме. Когда этот комплекс (который содержит шесть различных пептидных цепей и небольшую молекулу РНК) связывается с пептидом, растущим на цитоплазматической рибосоме, трансляция останавливается. Затем этот комплекс присоединяется к **якорному белку** на эндоплазматическом ретикулуме, и трансляция возобновляется. Растущие полипептиды проходят через мембрану ретикулума, и, когда они оказываются внутри полости, сигнальная последовательность удаляется, а остающийся белок может быть модифицирован (Blobel, Dobberstein, 1975; Walter, Blobel, 1983; Weidmann et al., 1987). Если белок (или предшественник белка) содержит гидрофобную область, то он, возможно, станет частью эндоплазматического ретикулума, а позже – клеточной мембраны. Одна из нерешенных проблем в этой области касается того, как белки локализуются в конкретных участках клеточной мембраны. Так, в плазматических мембранах клеток многих типов определенные белки находятся только на одной стороне мембраны. Мы наблюдали подобное явление при поляризации бластомеров млекопитающих перед компактизацией. Недавно полученные данные (Mostov, 1987) свидетельствуют о том, что существуют определен-

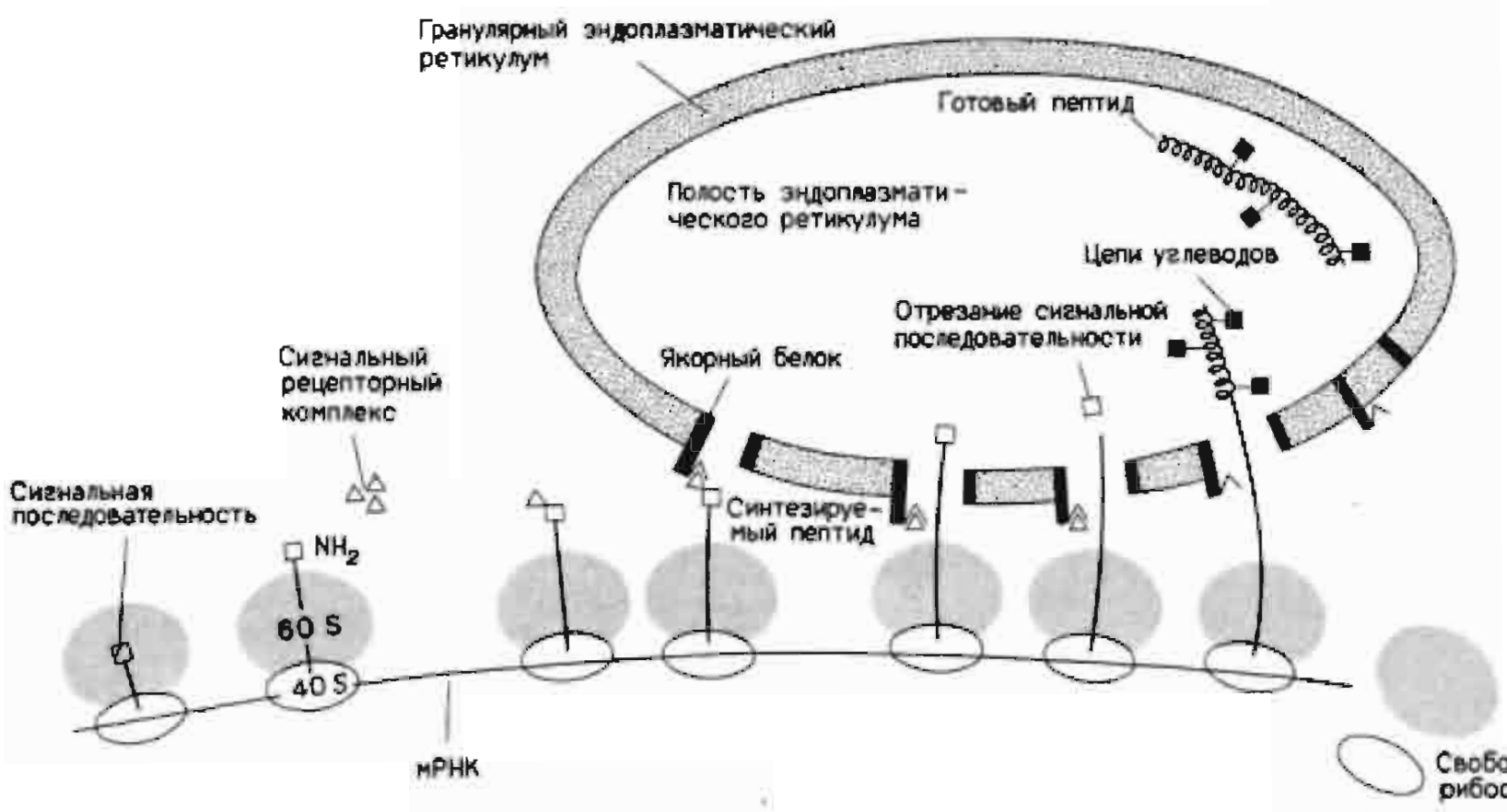


Рис. 14.29. Модели трансляции и гликозилирования секретируемых белков. Первые примерно 50 аминокислот полипептида обычно кодируют «сигнальную последовательность», которая указывает, что данный белок предназначен для встраивания в мембраны гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР). Эта последовательность узнается сигнальным рецепторным комплексом и затем сайтами на ГЭР. Когда она оказывается внутри полости, часть этой последовательности отрезается. При дальнейшей элонгации белка к нему добавляются углеводы.

ные последовательности аминокислот, которые специфичны для апикального и базального участков клеточной мембраны.

Одной из таких модификаций является ковалентное присоединение к белку маннозо-6-фосфата. Этот сахар играет роль адресной метки, по которой собираются гликопротеиды для лизосом. Маннозо-6-фосфат узнается рецепторами в определенных областях эндоплазматического ретикулума, благодаря чему там концентрируются ферменты, имеющие эту адресную метку. Затем эта область ретикулума отпочковывается и образует лизосому (Sly et al., 1981). Если модификации не происходит, то эти белки выделяются из клетки. Доказательством этого служит летальный генетический синдром, I-клеточная болезнь, при которой у больных нарушена способность присоединять к белкам адресную метку из маннозо-6-фосфата. У этих больных в лизосомах отсутствуют соответствующие ферменты, которые ошибочно выделяются в кровь.

Для некоторых белков имеются специфичные связывающие полипептиды, которые локализуют эти белки в определенных областях клетки. В печени мыши β-глюкуронидаза находится и в лизосомах, и на эндоплазматическом ретикулуме. Метка маннозо-6-фосфата может направить этот фермент в лизосомы, однако в печени β-глюкуронидаза может быть присоединена к эндоплазматическому ретикулуму с помощью белка **игазина** (Swank, Paigen, 1973), который специфически узнает этот фермент. На эндоплазматическом ретикулуме клеток печени у мутантной мыши, лишенной игазина, β-глюкуронидаза не обнаруживается (Lusis et al., 1976). Локализация β-глюкуронидазы в клетках разных типов обычно различается. Такие ткани, как печень и почки, богаты игазином и имеют β-глюкуронидазу на эндоплазматическом ретикулуме. Напротив, клетки мозга и селезенки, по-видимому, полностью лишены игазина и содержат всю β-глюкуронидазу в лизосомах (Lusis, Paigen, 1977). Таким образом, внутриклеточная локализация белков регулируется посттрансляционно и может быть различна в разных тканях.

Адресование белков в ядра и митохондрии

Накопление конкретного белка в ядре включает в себя *избирательное проникновение* этого белка в ядро и *избирательное удержание* тех белков, которые вошли в ядро (Dingwall et al., 1982; Kalderon et al., 1984). Эти свойства определяются, очевидно, специфическими аминокислотными последовательностями в белке. В 1984 г. в ядерном белке была идентифицирована последовательность из семи аминокислот, которая могла изменить локализацию исходно цитоплазматического белка (Kalderon et al., 1984). Этим ядерным белком был Т-антиген вируса SV40. Известно, что при мутации в гене этого белка, приводящей к замене лизина в положении 128 на другие аминокислоты, данный белок остается в цитоплазме. Такое наблюдение свидетельствовало о том, что аминокислотная последовательность вокруг положения 128 является сигналом для ядерной локализации. Эту гипотезу проверили в прямом эксперименте, сконструировав рекомбинантную плазмиду, которая объединила почти весь ген для цитоплазматического фермента пируваткиназы и последовательность из 75 пар оснований, кодирующую аминокислоты 114–138 в Т-антигене вируса SV40.

Рекомбинантные плазмиды с помощью микроинъекций вводили в клетки культуры ткани. В некоторых случаях гибридный ген включался в хромосомы, транскрибировался и транслировался в белок, который состоял из пируваткиназы, присоединенной к 25 аминокислотам Т-антигена. При окраске этих клеток флуоресцирующими антителами к пируваткиназе этот белок обнаруживался в ядре (рис. 14.30, *А*). Уменьшение размеров последовательности из гена для Т-антигена позволило получить разные белки. Рис. 14.30 показывает, что за способность локализоваться в ядре отвечает последовательность с выраженными основными свойствами, состоящая из семи аминокислот: Про – Лиз – Лиз – Лиз – Арг – Лиз – Вал.

Это не означает, что каждый ядерный белок использует данную конкретную последовательность для своей локализации или что каждое ядро узнает этот аминокислотный сигнал. Разные ядерные белки имеют различные сигналы для узнавания ядер (Hall et al., 1984; Davey et al., 1985).

Адресование белка в митохондрии еще более усложнено, так как в самой митохондрии имеется четыре отдельных компартмента. Белок может быть направлен на внешнюю или внутреннюю митохондриальные мембраны, в пространство между мембранами или во внутримитохондриальный матрикс (рис. 14.31). В отличие от адресных последовательностей, направляющих белки в ядро, большинство митохондриальных белков направляются аминокислотными последовательностями, которые могут быть легко отделены от зрелого белка (аналогично сигнальным последовательностям для локализации белков в эндоплазматическом ретикулуме). Идентификация этих адресных последовательностей была осуществлена с помощью методик, сходных с теми, которые использовали для обнаружения ядерных сигнальных последовательностей (van Loon et al., 1986; Hurt, van Loon, 1986). Основным внутриклеточным адресным сигналом для митохондриальной локализации является относительно короткая

																										Локализация
											124											135				
А	Мет	Асп	Лиз	Вал	Фен	Арг	Асн	Сер	Сер	Арг	Тре	Про	Про	Лиз	Лиз	Лиз	Арг	Лиз	Вал	Глу	Асп	Про	Арг	Асн	Сер	---	Я
													126									135					
Б				Мет	Асп	Лиз	Ала	Глу	Фен	Лей	Глу	Ала	Про	Лиз	Лиз	Лиз	Арг	Лиз	Вал	Глу	Асп	Про	Арг	Асн	Сер	---	Я
															128							135					
В					Мет	Асп	Лиз	Вал	Фен	Гли	Иле	Про	Арг	Гли	Лиз	Лиз	Арг	Лиз	Вал	Глу	Асп	Про	Арг	Асн	Сер	---	Я
																129						135					
Г						Мет	Асп	Лиз	Вал	Фен	Арг	Асн	Сер	Сер	Арг	Лиз	Арг	Лиз	Вал	Глу	Асп	Про	Арг	Асн	Сер	---	Я/Ц
																	130					135					
Д							Мет	Асп	Лиз	Вал	Фен	Арг	Асн	Сер	Сер	Арг	Арг	Лиз	Вал	Глу	Асп	Про	Арг	Асн	Сер	---	Ц
																			132			135					
Е										Мет	Асп	Лиз	Ала	Глу	Фен	Лей	Глу	Глу	Вал	Глу	Асн	Про	Арг	Асн	Сер	---	Ц
													126								133						
Ж				Мет	Асп	Лиз	Ала	Глу	Фен	Лей	Глу	Ала	Про	Лиз	Лиз	Лиз	Арг	Лиз	Вал	Глу	Фен	Арг	---				Я
													126						132								
З				Мет	Асп	Лиз	Ала	Глу	Фен	Лей	Глу	Ала	Про	Лиз	Лиз	Лиз	Арг	Лиз	Вал	Гли	Иле	Про	---				Я
													126				130										
И				Мет	Асп	Лиз	Ала	Глу	Фен	Лей	Глу	Ала	Про	Лиз	Лиз	Лиз	Арг	Про	Глу	Фен	Арг	---					Ц

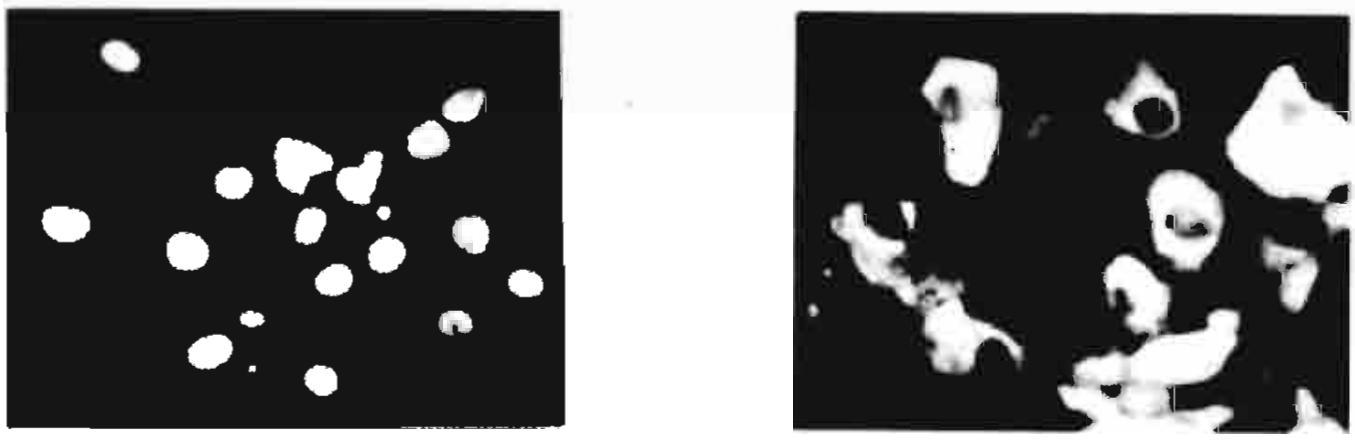


Рис. 14.30. Идентификация аминокислотной последовательности, которая направляет белок в ядро. 25 аминокислотных остатков, фланкирующих лизин-128 в Т-антигене вируса SV40 (*А*), адресуют в ядро пируваткиназу. Выделенный на рисунке участок показывает ближайшие аминокислотные остатки. *Б–И*. Вариации в выделенной последовательности позволяют идентифицировать остатки, необходимые для накопления белка в ядрах. Фотографии показывают внутриклеточную локализацию для случаев *З* и *И*. (Из Kalderon et al., 1984.)

последовательность, состоящая из периодически расположенных основных аминокислот (конкретные длины и состав аминокислотных последовательностей у митохондриальных белков варьируют). Если эта последовательность находится в белке, то он не только направляется в митохондрии, но будет транслоцирован через обе мембраны в митохондриальный матрикс. Если между зрелым белком и адресующей в матрикс последовательностью лежит гидрофобный участок, то предполагается, что он блокирует перенос белка в матрикс. Это приведет к тому, что данный белок станет частью внутренней мембраны. Если зрелый белок легко отщепляется от этого гидрофобного участка, то он будет обнаруживаться в межмембранном пространстве (van Loon, Schatz, 1987).

Надмолекулярная сборка

Последняя форма посттрансляционной регуляции, которую мы рассмотрим, связана со сборкой новосинтезированных белков в функциональный комплекс. Мы уже рассмотрели ряд белков, которые могут спонтанно собираться в функциональные комплексы. Например, гемоглобин и лактатдегидрогеназа состоят из четырех полипептидных цепей, которые образуют с помощью нековалентных связей функциональный белок. Пример на несколько более высоком уровне – два сократительных белка, тубулин и актин, – существуют в полимерных и неполимерных формах. Мы видели, что полимеризация актина из глобулярных мономеров в микрофила-

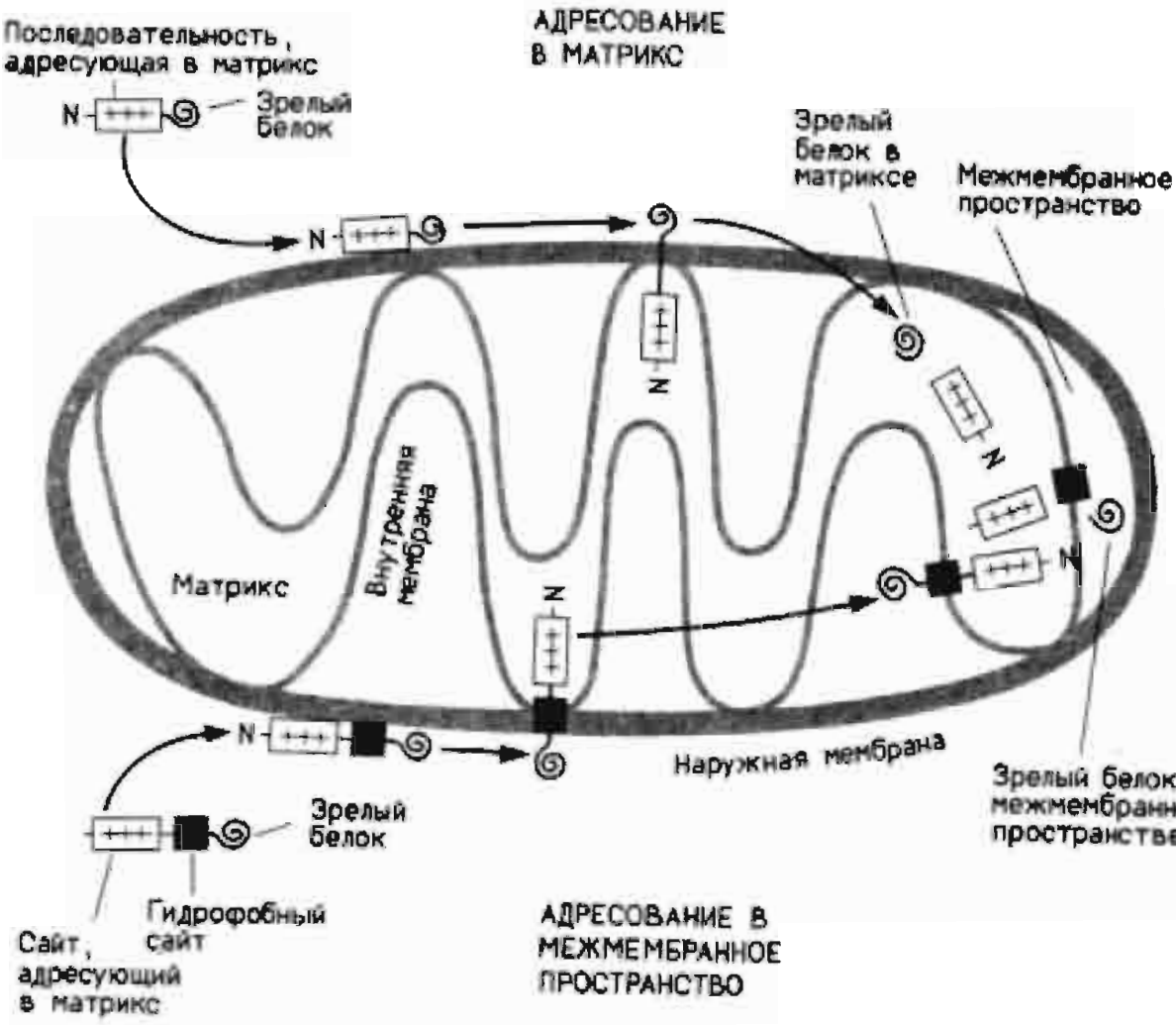


Рис. 14.31. Модель адресования белков в специфические области внутри митохондрии. Все митохондриальные белки, кодируемые ядерными генами, содержат сигнальную последовательность, направляющую в матрикс (изображена прямоугольником с положительными зарядами). Если транспорт белка следует прервать до достижения матрикса, то второй (гидрофобный) сигнал (изображен в виде черного квадрата) позволяет белку задержаться в мембране. Останется ли он в мембране или войдет в межмембранное пространство, зависит от того, будет ли белок отщеплен от этой сигнальной последовательности. Предполагается, что вход предшественников происходит в участках, где две мембраны сближаются друг с другом (Schleyer, Neupert, 1985). Модель составлена по работам Hurt, van Loon (1986), van Loon, Schatz (1987).

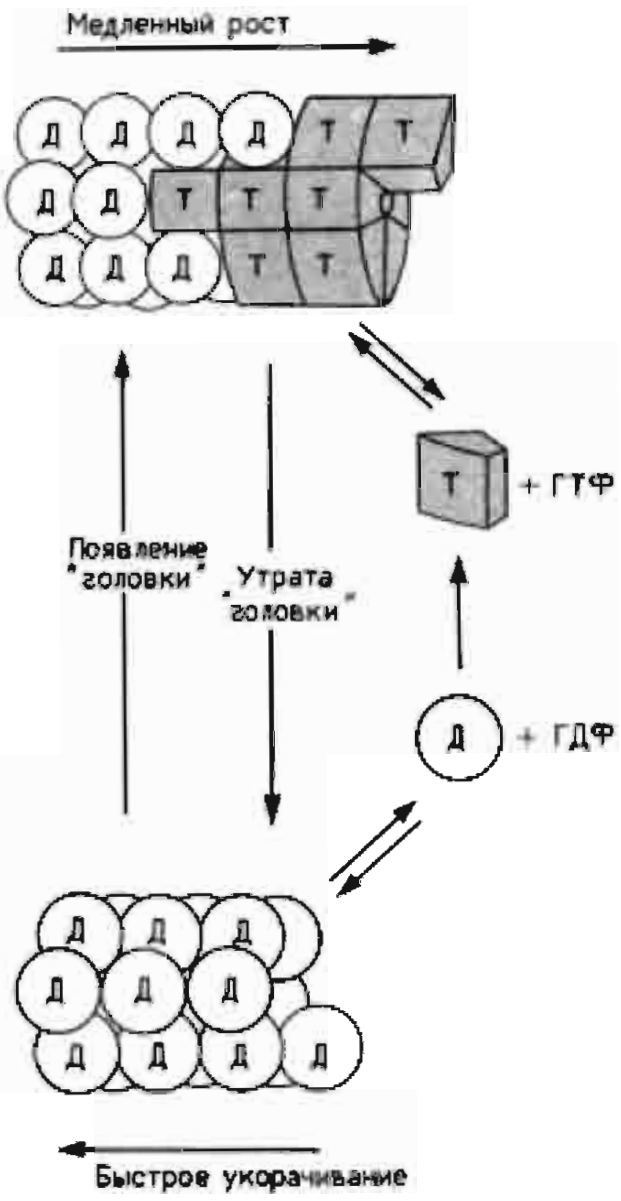


Рис. 14.32. Модель роста и деполимеризации микротрубочек. К растущим микротрубочкам добавляются ГТФ-содержащие субъединицы тубулина (обозначены буквой Т), которые плотно ассоциируют с другими субъединицами тубулина. По мере старения субъединиц связанный с тубулином ГТФ гидролизуется до ГДФ. Тубулин, содержащий ГДФ (обозначен буквой Д), относительно быстро отделяется от микротрубочек. Если гидролиз превосходит сборку, то «головка» из ГТФ-тубулина исчезает и микротрубочка быстро укорачивается. (По Kirschner, Mitchison, 1986.)

ментs необходима для развития акросомного процесса при оплодотворении. Сходным образом тубулин собирается в микротрубочки митотического аппарата и распадается на мономеры при завершении митоза. Затем эти тубулиновые единицы могут быть реорганизованы в новые микротрубочки, которые важны для детерминации формы клеток.

Рост микротрубочки регулируется гидролизом молекул ГТФ, которые ковалентно связаны с тубулином. Новополимеризованный тубулин присоединяется к ГТФ и образует стабильные комплексы с другими молекулами тубулина. При старении тубулинов (или при реорганизации клетки) ГТФ гидролизуется с образованием ГДФ. Тубулин, связанный с ГДФ, не образует комплекс с соседними молекулами тубулина. Полагают, что эта пониженная стабильность вызывает деполимеризацию микротрубочки (рис. 14.32). Как мы увидим в следующей главе, дифференциальный рост микротрубочек может оказывать определяющее влияние на клеточный и эмбриональный морфогенез.

Способность формировать волокна свойственна

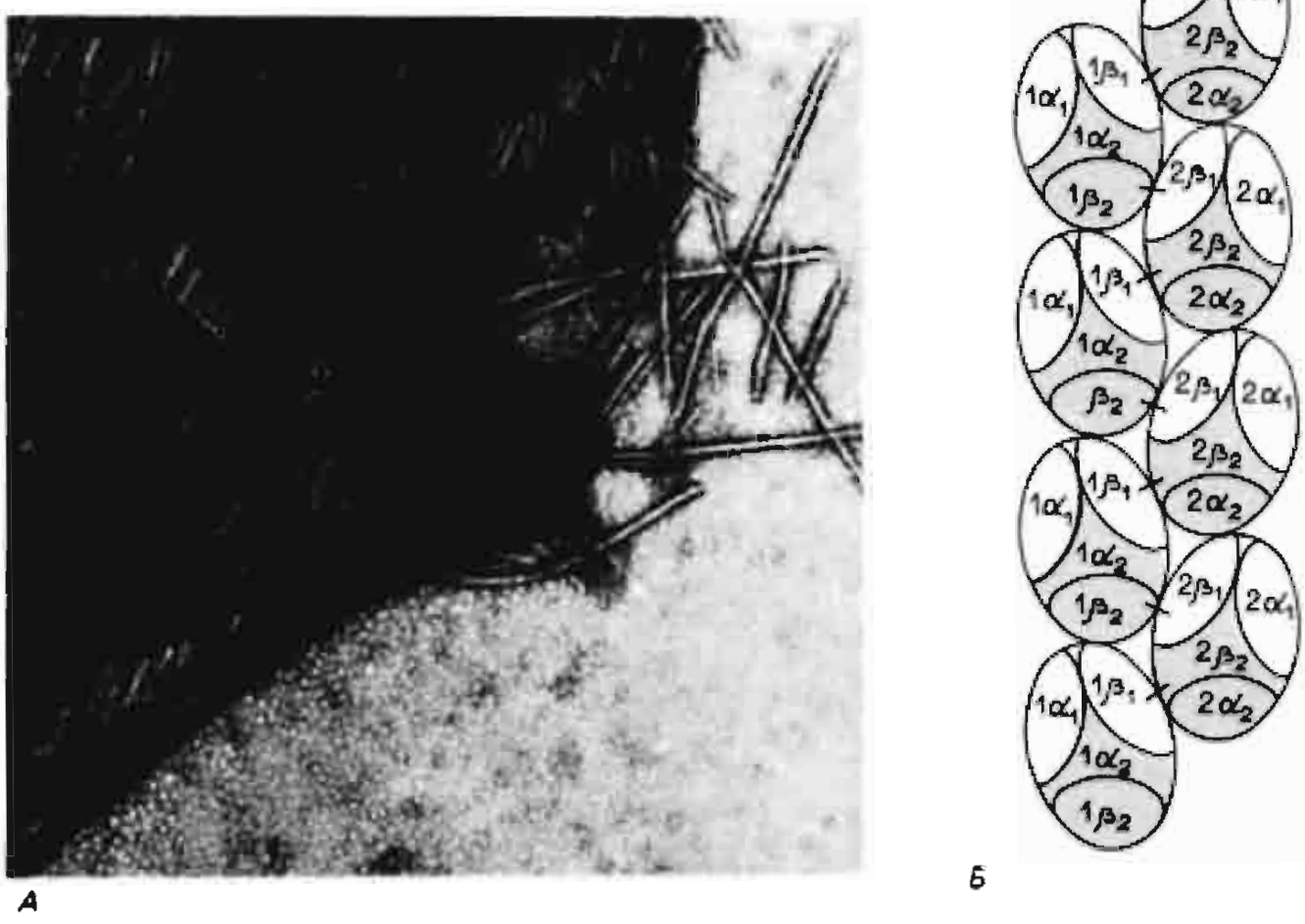


Рис. 14.33. Образование волокон гемоглобина при серповидноклеточной анемии. *А*. Электронная микрофотография волокон дезоксигенированного аномального гемоглобина, выходящих из эритроцита, разрушенного осмотическим шоком. *Б*. Модель формирования волокон, согласно которой мутантный β-глобин способен присоединяться к β-глобиновому пептиду другого гемоглобинового тетрамера. (*А* – из Wellems, Josephs, 1979; фотография с любезного разрешения авторов. *Б* – по Dickerson, Geis, 1983.)

относительно небольшому набору клеточных белков. Приобретение этой способности другими белками благодаря мутации может приводить к гибельным последствиям. Такое явление наблюдается при серповидноклеточной анемии. Замена одной аминокислоты (глутамина на валин в шестом положении β-цепи глобина) вызывает образование гидрофобного кармана, который позволяет взаимодействовать гемоглобиновым тетрамерам в восстановленной форме. Такие волокна растягивают клетку, придавая ей характерную форму серпа, и уменьшают ее гибкость (рис. 14.33).

Некоторые белки образуют комплексы с нуклеиновыми кислотами. Например, гистоны нужны только для того, чтобы вместе с ДНК формировать нуклеосомные частицы. Эукариотическая 80S-рибосома состоит приблизительно из 70 белков и 4 различных рибосомных РНК. Эти белки и нуклеиновые кислоты для своего функционирования должны собираться вместе, и что примечательно, эта сборка происходит быстро и эффективно внутри всех клеток. После этого не должен вызывать удивление тот факт, что полноценные инфекционные вирусы могут быть получены при совместной инкубации структурных белков и нуклеиновых кислот. Белки, которые «маскируют» мРНК в ооцитах, также являются примерами белков, которые могут формировать специфические комплексы с нуклеиновыми кислотами. Белок TFIIIA, который комплексируется с 5S-рРНК в гене 5S-рРНК *Xenopus*, связывается также с 5S-рРНК в ооците и образует стабильную 7S-частицу (Pelham, Brown, 1980). Таким образом, спонтанная самосборка является еще одной важной формой посттрансляционного контроля.

Коллаген: конспект посттрансляционной регуляции

При рассмотрении синтеза коллагена, одного из главнейших структурных белков тела, мы можем показать важность и разнообразие механизмов посттрансляционного контроля (см. обзоры Prockop et al., 1979; Davidson, Berg, 1981).

Во-первых, последовательность мРНК коллагена транслируется в пептид проколлагена. Аминоконец проколлагена содержит сигнальную последовательность, которая позволяет ему войти в полость гранулярного эндоплазматического ретикулума. Этот сигнальный пептид отщепляется от остальной части молекулы коллагена. Внутри эндоплазмати-

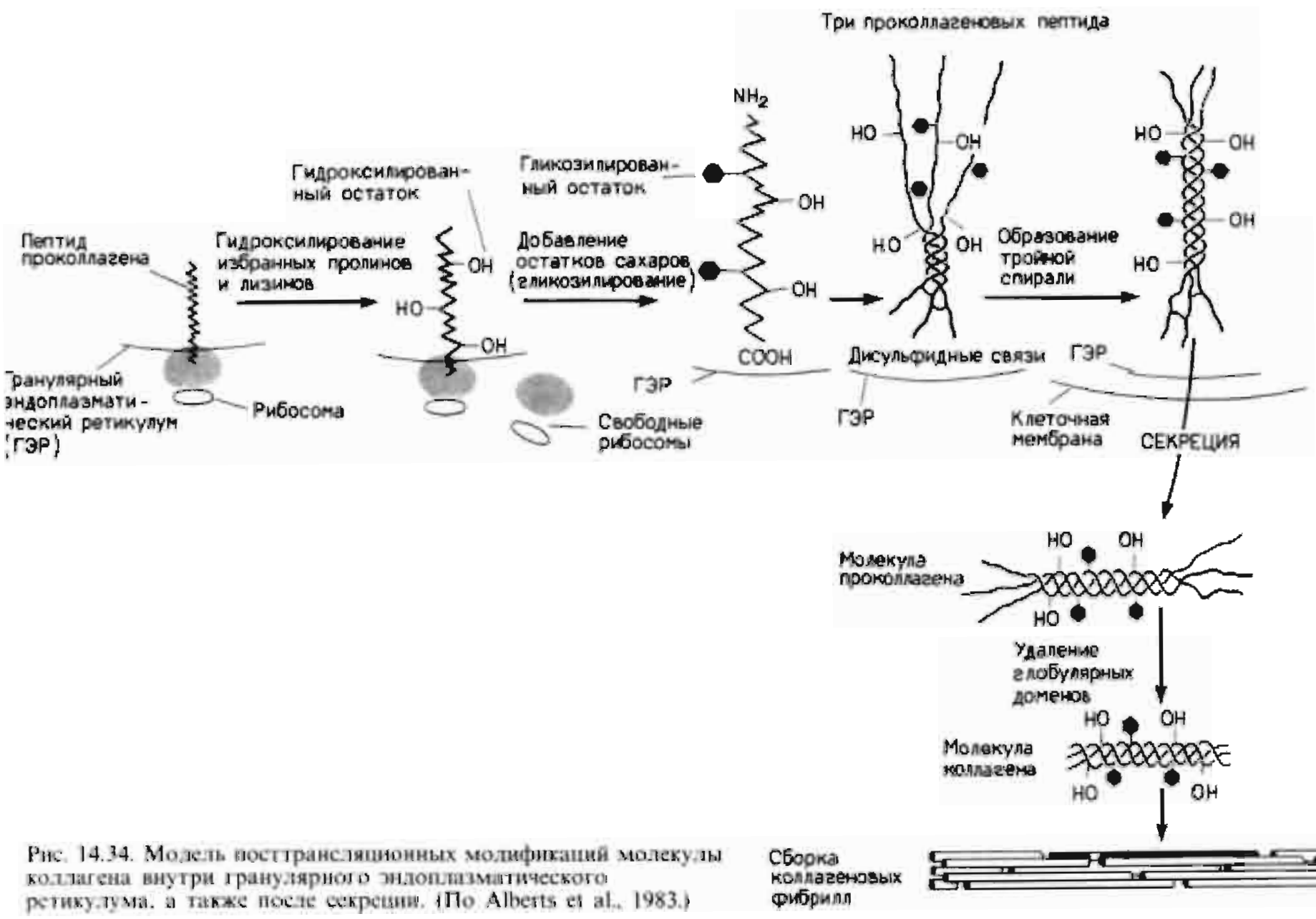


Рис. 14.34. Модель посттрансляционных модификаций молекулы коллагена внутри гранулярного эндоплазматического ретикулума, а также после секреции. (По Alberts et al., 1983.)

ческого ретикулума молекулы коллагена встречаются также с тремя ферментами, которые его гидроксилируют. Два из этих ферментов гидроксилируют остатки пролина в 3-гидроксипролин и 4-гидроксипролин; третий – превращает лизины в оксилизиловые остатки. Эти ферменты узнают остатки пролина и лизина только в определенных положениях (рис. 14.34).

Когда цепи коллагена становятся гидроксилированными, к оксилизинам могут быть добавлены остатки сахаров. Первый фермент – галактозилтрансфераза – добавляет к оксилизину галактозу; второй фермент – глюкозилтрансфераза – добавляет к оксилизилгалактозе глюкозу. Участок около карбоксильного конца модифицируется глюкозамином и маннозой.

Следующий этап включает образование внутрицепочечных дисульфидных связей и организацию трех коллагеновых полипептидов в тройную спираль. Дисульфидные связи образуются на карбоксильных концах между прилежащими молекулами коллагена, создавая тем самым условия для формирования тройной спирали. Если пролины были гидроксилированы правильно, то три цепи скручиваются одна вокруг другой, образуя протяженный участок тройной спирали, ограниченный с обеих сторон глобулярными областями.

В таком виде молекула коллагена выделяется во внеклеточное пространство. Процессинг продолжается даже там. Сначала протеолитические ферменты удаляют глобулярные домены на аминоконце и карбоксильном конце. В результате этого отрезания образуется фрагмент совершенной тройной спирали. На следующем этапе эти фрагменты самопроизвольно собираются в фибриллы. Однако эти фибриллы не обладают достаточной механической прочностью, чтобы функционировать в качестве структурных белков до тех пор, пока различные тройные спирали не будут ковалентно связаны друг с другом с помощью дополнительных поперечных сшивок. Это связывание осуществляется путем ферментативной модификации лизилов в оксилизиловых остатках и присоединения их друг к другу. Таким образом, существует значительное число необходимых этапов модификации белка после трансляции (как мы увидим в следующих двух главах, коллаген – не только исключительно важный структурный белок, но, как полагают, он ответствен

также за некоторые эмбриональные взаимодействия).

Итак, мы рассмотрели различные уровни регуляции экспрессии гена: транскрипцию, процессинг РНК, трансляцию и посттрансляционную модификацию. Было показано, что каждый тип регуляции важен для контроля экспрессии генов в ходе развития. Мы приближаемся к раскрытию тайны дифференцировки, и новые методы клонирования генов (как предсказывал Бовери в 1904 г.) позволят понять дифференцировку на химическом уровне. Однако проблема дифференцировки индивидуальных клеток не единственная в биологии развития. Нам нужно понять также, как взаимодействуют друг с другом клетки тела, чтобы обеспечить развитие в надлежащее время и в надлежащем месте. В следующей части книги мы рассмотрим *клеточные взаимодействия* в развитии, приводящие к формированию тканей и органов.

ЛИТЕРАТУРА

Adamson S. D., Yau P. M. P., Herbert E., Zucker W. V. (1972). Involvement of hemin, a stimulatory fraction from ribosomes, and a protein synthesis inhibitor in the regulation of hemoglobin synthesis. J. Mol. Biol. **63**, 247–264.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts L., Watson J. D. (1983). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, New York.

Akhayat O., de Sa F. G., Infante A. A. (1987). Sea urchin prosome: Characterization and changes during development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 1595–1599.

Anderson K. W., Lengyel J. A. (1979). Rates of synthesis of major classes of RNA in *Drosophila* embryos. Dev. Biol. **70**, 217–231.

Angerer L. M., Angerer R. C. (1981). Detection of poly A$^+$ RNA in sea urchin eggs and embryos by quantitative *in situ* hybridization. Nucleic Acids Res. **9**, 2819–2840.

Audet R. G., Goodchild J., Richter J. D. (1987). Eukaryotic initiation factor 4A stimulates translation in microinjected *Xenopus* oocytes. Dev. Biol. **121**, 58–68.

Bachmair A., Finley D., Varshausky A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its aminoterminal residue. Science **234**, 179–186.

Blanco A. (1980). On the functional significance of LDH-X. Johns Hopkins Med. J. **146**, 231–235.

Brachet J., Decroly M., Ficq A., Quertier J. (1963). Ribonucleic acid metabolism in fetilized and unfertilized sea urchin eggs. Biochim. Biophys. Acta **72**, 660–662.

Briggs R., Cassens G. (1966). Accumulation in the oocyte nucleus of a gene product essential for embryonic development beyond gastrulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **55**, 1103–1109.

Brothers A. J. (1979). A specific case of genetic control of early development: The *o* maternal effect mutation of the Mexican axolotl. In: S. Subtelny and I. R. Konigsberg (eds.), Determinants of Spatial Organization. Academic Press, New York, pp. 167–184.

Carroll C. R. (1974). Comparative study of the early embryonic cytology and nucleic acid synthesis of *Ambystoma mexicanum* normal and *o* mutant embryos. J. Exp. Zool. **187**, 409–422.

Chahal S. S., Matthews H. R., Bradbury E. M. (1980). Acetylation of histone H4 and its role in chromatin structure and function. Nature **287**, 76–79.

Chan S. J., Noyes B. E., Agarwal K. L., Steinner D. F. (1979). Construction and selection of recombinant plasmids containing full-length complementary DNAs corresponding to rat insulins I and II. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5036–5040.

Chen S.-H. and 12 others. (1987). Apolipoprotein B48 is the product of a messenger RNA with an organspecific in-frame stop codon. Science **238**, 363–366.

Clegg K. B., Piko L. (1983). Poly(A) lenght, cytoplasmic adenylation, and synthesis of poly(A)$^+$ RNA in early mouse embryos. Dev. Biol. **95**, 331–341.

Clemens M. J., Henshaw E. C., Rahaminoff H., London I. M. (1974). Met-tRNA$_{f_{met}}$ binding to 40 S ribosomal units: A site for the regulation of initiation of protein synthesis by hemin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 2946–2950.

Colin A. M., Brown B. D., Dholakia J. N., Woodley C. L., Wahba A. J., Hille M. B. (1987). Evidence for simultaneous derepression of messenger RNA and the guanine nucleotide exchange factor in fertilized sea urchin eggs. Dev. Biol. **123**, 354–363.

Craig S. P., Piatigorsky J. (1971). Protein synthesis and development in the absence of cytoplasmic RNA synthesis in non-nucleate egg fragments and embryos of sea urchins: Effect of ethidium bromide. Dev. Biol. **24**, 213–232.

Danilchik M. V., Yablonka-Reuveniz Z., Moon R. T., Reed S. K., Hille M. B. (1986). Separate ribosomal pools in sea urchin embryos: Ammonia activates a movement between pools. Biochemistry **25**, 3696–3702.

Davey J., Dimmock N. J., Colman A. (1985). Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes. Cell **40**, 667–675.

Davidson E. H. (1986). Gene Activity in Early Development, 3rd Ed. Academic Press, New York, pp. 69–173.

Davidson J. M., Berg R. H. (1981). Posttranslational events in collagen biosynthesis. In: A. R. Hand and C. Oliver (eds.), Methods in Cell Biology, Vol. 23. Academic Press, New York, pp. 119–136.

DeLeon C. V., Cox K. H., Angerer L. M., Angerer R. C. (1983). Most early variant histone mRNA is contained in the pronucleus of sea urchin eggs. Dev. Biol. **100**, 197–206.

Denny P. C., Tyler A. (1964). Activation of protein synthesis in non-nucleate fragments of sea urchin eggs. Biochem. Biophys. Res. Commun. **145**, 245–249.

de Sa C. M., de Sa M.-F. G., Akhayat O., Broders F., Scherrer K., Horsch A., Schmid H.-P. (1986). Prosomes: Ubiquity and intraspecies structural variation. J. Mol. Biol. **187**, 479–493.

Dickerson R. E., Geis I. (1983). Hemoglobin. Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.

Dingwall C., Sharnick S. V., Laskey R. A. (1982). A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. Cell **30**, 449–458.

Driesch H. (1898). Über rein-mütterliche Charaktere and Bastardlarven von Echiniden. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org. **7**, 65–102.

Dworkin M. B., Dworkin-Rastl E. (1985). Changes in the RNA titers and polyadenylation during oogenesis and oocyte maturation in *Xenopus laevis*. Dev. Biol. **112**, 451–457.

Ecker R. E., Smith L. D. (1971). The nature and fate of *Rana pipiens* proteins synthesized during maturation and early cleavage. Dev. Biol. **24**, 559–576.

Edgar B. A., Schubiger G. (1986). Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development. Cell **44**, 871–877.

Evans T., Rosenthal E., Younglom J., Distel D., Hunt T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal nRNA in sea urchin

eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell **33**, 389–396.

Fagard R., London I.M. (1981). Relationship between phosphorylation and activity of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 866–870.

Filipowicz W., Sierra J.J., Ochoa S. (1975). Polypeptide chain initiation in eukaryotes: Initiation factor MP in *Artemia salina* embryos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **72**, 3947–3951.

Francke C., Edstrom J.E., McDowell A.W., Miller O.L. (1982). Microscopic visualization of a discrete class of giant translation units in salivary gland cells of *Chironomus tentans*. EMBO J. **1**, 59–62.

Fritz P.I., Vesell E., White E.L., Pruit K.M. (1969). Roles of synthesis and degradation in determining tissue concentration of LDH-5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **62**, 558–565.

Galau G., Kelin W.H., Davis M.M., Wold B., Britten R.J., Davidson E.H. (1976). Structural gene sets active in embryos and adult tissues of the sea urchin. Cell **7**, 487–505.

Gilbert S.F., Solter D. (1985). Onset of paternal and maternal *Gpi-2* expression preimplantation mouse embryos. Dev. Biol. **109**, 515–517.

Goustin A.S., Wilt F.H. (1981). Protein synthesis, polyribosomes, and peptide elongation in early development of *Strongylocentrotus purpuratus*. Dev. Biol. **82**, 32–40.

Grace M., Bagchi M., Ahmad F., Yeager T., Olson C., Chakravarty I., Nasron N., Banerjee A., Gupta N.K. (1984). Protein synthesis in rabbit reticulocytes: Characteristics of the protein factor RF that reverses inhibition of protein synthesis in heme-deficient reticulocyte lysates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 6517–6521.

Gribble T.J., Schwartz H.C. (1965). Effect of protoporphyrin on hemoglobin synthesis. Biochim. Biophys. Acta **103**, 333–338.

Gross K.W., Jacobs-Lorena M., Baglioni G., Gross P.R. (1973). Cell-free translation of maternal messenger RNA from sea urchin eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2614–2618.

Gross M., Redman R., Kaplansky D.A. (1985). Evidence that the primary effects of phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 (α) in rabbit reticulocyte lysate is inhibition of the release of eukaryotic initiation factor 2-GDP from 60S ribosomal subunits. J. Biol. Chem. **260**, 9491–9500.

Gross P.R., Cousineau G.H. (1964). Macromolecular synthesis and the influence of actinomycin D on early development. Exp. Cell Res. **33**, 368–395.

Guyette W.A., Matusik R.J., Rosen J.M. (1979). Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. Cell **17**, 1013–1023.

Hall M.N., Hereford L., Herskowitz I. (1984). Targeting of *E. coli* β-galactosidase to the nucleus in yeast. Cell **36**, 1057–1065.

Harris H. (1975). Principles of Human Biochemical Genetics. Elsevier North-Holland, New York.

Hartl F.-U., Schmidt B., Wachter E., Neupert W. (1986). Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome *c* reductase. Cell **47**, 939–951.

Harvey E.B. (1940). A comparison of the development of nucleate and non-nucleate eggs of *Arbacia punctulata*. Biol. Bull. **79**, 166–187.

Herbert E., Phillips M., Budarf M. (1981). Glycosylation steps involved in processing of pro-corticotropin-endorphin in mouse pituitary tumor cells. Methods Cell Biol. **23**, 101–118.

Hershey J.W.B. (1980). The translational machinery: Components and mechanism. In: D.M. Prescott and L. Goldstein (eds.), Cell Biology: A Comprehensive Treatise. Academic, New York, pp. 1–68.

Hille M.B., Danilchik M.V., Colin A.M., Moon R.T. (1985). Translational control in echinoid eggs and early embryos. In: R.H. Sawyer and R.M. Showman (eds.), The Cellular and Molecular Biology of Invertebrate Development. University of South Carolina Press, pp. 91–124.

Hough-Evans B.R., Wold B.J., Ernst S.G., Britten R.J., Davidson E.H. (1977). Appearance and persistence of maternal RNA sequences in sea urchin development. Dev. Biol. **260**, 258–277.

Humphreys T. (1971). Measurements of messenger RNA entering polysomes upon fertilization in sea urchins. Dev. Biol. **26**, 201–208.

Hurt E.C., van Loon A.P.G.M. (1986). How proteins find mitochondria and intramitochondrial compartments. Trends Biochem. Sci. **11**, 204–207.

Infante A., Nemer M. (1968). Heterogeneous RNP particles in the cytoplasm of sea urchin embryos. J. Mol. Biol. **32**, 543–565.

Itoh N., Okamoto H. (1980). Translational control of proinsulin synthesis by glucose. Nature **283**, 100–102.

Jacobson A., Favreau M. (1983). Possible involvement of poly(A) in protein synthesis. Nucleic Acids Res. **11**, 6353–6368.

Jenkins N.A., Kaumeyer J.R., Young E.M., Raff R.A. (1978). A test masked message: The template activity of messenger ribonucleoprotein particles isolated from sea urchin eggs. Dev. Biol. **63**, 279–298.

Kabat D., Chappell M.R. (1977). Competition between globin messenger ribonucleic acids for a discriminating initiation factor. J. Biol. Chem. **252**, 2684–2690.

Kalderon D., Roberts B.L., Richardson W.D., Smith A.W. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell **39**, 499–509.

Karibian D., London I.M. (1965). Control of heme synthesis by feedback inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun. **18**, 243–249.

Kastern W.H., Swindlehurst M., Aaron C., Hooper J., Berry S.J. (1982). Control of mRNA translation in oocytes and developing embryos of giant moths. I. Functions of the 5′ terminal "cap" in the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Dev. Biol. **89**, 437–449.

Kirschner M., Mitchison T. (1986). Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. Cell **45**, 329–342.

Kozak M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell **44**, 283–292.

Levin D., Ranu R., Ernst V., London I.M. (1976). Regulation of protein synthesis in reticulocyte lysates: Phosphorylation of methionyl-tRNA$_f$ binding factor by protein kinase activity of translational inhibitor isolated from heme-deficient lysates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 3112–3116.

Littauer V.Z., Soreq H. (1982). The regulatory function of poly(A) and adjacent 3′ sequences in translated RNA. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **27**, 53–83.

Lodish H.F. (1971). Alpha and beta globin messenger ribonucleic acid. Different amounts and rates of translation. J. Biol. Chem. **246**, 7131–7138.

London I.M., Clemens M.J., Ranu R.S., Levin D.H., Cherbas L.F., Ernst V. (1976). The role of hemin in the regulation of protein synthesis in erythroid cells. Fed. Proc. **35**, 2218–2222.

Lopo A.C., MacMillan S., Hershey J.W.B. (1988). Translational control in early sea urchin embryogenesis: Initiation factor eIF4F stimulates protein synthesis in lysates from unfertilized eggs of *S. purpuratus*. Biochemistry **27**, 351–357.

Lusis A.J., Tomina S., Paigen K. (1976). Isolation, characterization, and radioimmunoassay of murine egasyn, a protein stabilizing glucuronidase membrane binding. J. Biol. Chem. **251**, 7753–7760.

Lusis A.J., Paigen K. (1977). Relationship between levels of

membrane-bound glucuronidase and the associated protein egasyn in mouse tissues. J. Cell Biol. **731**, 728–735.
Malacinski G. M. (1971). Genetic control of qualitative changes in protein synthesis during early amphibian (Mexican axolotl) embryogenesis. Dev. Biol. **26**, 442–451.
Markert C. L. (1968). The molecular basis for isozymes. Ann. N. Y. Acad. Sci. **151**, 14–40.
Markert C. L., Ursprung H. (1971). Developmental Genetics. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
Meijlink F., Curran T., Miller A. D., Verma I. M. (1985). Removal of a 67-base pair sequence in the non-coding region of protooncogene *fos* converts it to a transforming gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 4987–4991.
Mermod J. J., Schatz G., Croppa M. (1980). Specific control of messenger translation in *Drosophila* oocytes and embryos. Dev. Biol. **75**, 177–186.
Moon R. T., Danilchik M. V., Hille M. (1982). An assessment to the masked messenger hypothesis: Sea urchin egg messenger ribonucleoprotein complexes are efficient templates for in vitro protein synthesis. Dev. Biol. **93**, 389–403.
Moon R. T., Nicosia R. F., Olsen C., Hille M. B., Jeffery W. R. (1983). The cytoskeletal framework of sea urchin eggs and embryos: Developmental changes in the assosiation of messenger RNA. Dev. Biol. **95**, 447–458.
Morle F., Lopez B., Henni T., Godet J. (1985). α-Thalassemia associated with the deletion of two nucleotides at positions −2 and −3 preceding the AUG codon. EMBO J. **4**, 1245–1250.
Mostov K. E., Breitfeld P., Harris J. M. (1987). An anchor-minus form of polymeric immunoglobin receptor is secreted predominantly apically in Madin-Darby canine kidney cells. J. Cell Biol. **105**, 2031–2036.
Nakakura N., Miura T., Yamana K., Ito A., Shiokawa K. (1987). Synthesis of heterogenous mRNA-like RNA and low-molecular-weight RNA before the midblastula transition in embryos of *Xenopus laevis*. Dev. Biol. **123**, 421–429.
Newport J., Kirshner M. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos. II. Control of the onset of transcription. Cell **30**, 687–696.
Palatnik C. M., Wilkins C., Jacobson A. (1984). Translational control during early *Dictyostelium* development: Possible involvement of poly(A) sequences. Cell **36**, 1017–1025.
Pavlakis G. N., Lockard R. E., Vamvakopolous N., Rieser L., RajBhandary U. L., Vournakis J. N. (1980). Secondary structure of mouse and rabbit α- and β-globin mRNAs: Differential accessibility of initiator AUG codons towards nucleases. Cell **19**, 91–102.
Pelham H. R. B., Brown D. D. (1980). A specific transcription factor that can bind either the 5 S RNA gene or 5 S RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 4170–4174.
Pelletier J., Sonenberg N. (1985). Insertional mutagenesis to increase secondary structure within the 5′ noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. Cell **40**, 515–526.
Poccia D., Wolff R., Kragh S., Williamson P. (1985). RNA synthesis in male pronuclei of the sea urchin. Biochim. Biophys. Acta **824**, 349–356.
Powell L. M., Wallis S. C., Pease R. J., Edwards Y. H., Knott T. J., Scott J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. Cell **50**, 831–840.
Prockop D. J., Kivirikko K. I., Tuderman L., Guzman N. A. (1979). The biosynthesis of collagen and its discordes. N. Engl. J. Med. **301**, 13–23.
Raff R. A. (1980). Masked messenger RNA and the regulation of protein synthesis in eggs and embryos. In: D. M. Prescott and L. Goldstein (eds.), Cell Biology: A Comprehensive Treatise, Vol. 4. Academic, New York, pp. 10–136.
Raff R. A., Colot H. V., Solvig S. E., Gross P. R. (1972). Oogenetic origin of messenger RNA for embryonic synthesis of microtubule proteins. Nature **235**, 211–214.
Ranu R. S., Levin D. H., Delaunay J., Ernst U., London I. M. (1976). Regulation of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates: Characteristics of inhibition of protein synthesis by a translational inhibitor from heme-deficient lysates and its relationship to the initiation factor which binds Met-tRNA$_f$. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 2720–2726.
Ray B. K. and 8 others. (1983). Role of mRNA competition in regulating translation: Further characterization of mRNA discriminatory initiation factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 663–667.
Raychaudhury P., Chaudhuri A., Maitra U. (1985). Formation and release of eukaryotic initiation factor 2 GDP complex during eukaryotic ribosomal polypeptide chain initiation complex formation. J. Biol. Chem. **260**, 2140–2145.
Rebagliati M. R., Weeks D. L., Harvey R. P., Melton D. A. (1985). Identification and cloning of localized maternal RNAs from *Xenopus* eggs. Cell **42**, 769–777.
Restifo L. L., Guild G. M. (1986). Poly(A) shortening of coregulated transcripts in *Drosophila*. Dev. Biol. **115**, 507–510.
Richter J. D., Smith L. D. (1984). Reversible inhibition of translation by *Xenopus* oocyte-specific proteins. Nature **309**, 378–380.
Rodgers W. H., Gross P. R. (1978). Inhomogeneous distribution of egg RNA sequences in the early embryo. Cell **14**, 279–288.
Rogers S., Wells R., Rechsteiner M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis. Science **234**, 364–368.
Rosenthal E. T., Ruderman J. V. (1987). Widespread change in the translation and adenylation of maternal messenger RNA following fertilization of *Spisula* oocytes. Dev. Biol. **121**, 237–246.
Rosenthal E., Hunt T., Ruderman J. V. (1980). Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissima*. Cell **20**, 487–494.
Sarker G., Edery I., Gallo R., Sonenberg N. (1984). Preferential stimulation of rabbit α-globin mRNA translation by a cap-binding protein complex. Biochim. Biophys. Acta **783**, 122–129.
Schleyer M., Neupert W. (1985). Transport of proteins into mitochondria: Translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. Cell **43**, 339–350.
Shapiro D. J., Blume J. E., Nielsen D. A. (1987). Regulation of messenger RNA stability in eukaryotic cells. BioEssays **6**, 221–226.
Shatkin A. J. (1976). Capping of eukaryotic mRNAs. Cell **9**, 645–653.
Shatkin A. J. (1985). mRNA cap binding proteins: Essential factors for initiating translation. Cell **40**, 223–224.
Shaw G., Kamen R. (1986). A conserved AU sequence from the 3′ untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. Cell **46**, 659–667.
Showman R. M., Wells D. E., Anstrom J., Hursh D. A., Raff R. A. (1982). Message-specific sequestration of maternal histone mRNA in the sea urchin egg. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 5944–5947.
Shyne-Athwal S., Riccio R. P., Chakraborty G., Ingolia N. A. (1986). Protein modification by amino acid addition is increased in crushed sciatic but not optic nerves. Science **231**, 603–607.
Sierra J. M., de Haro C., Datta A., Ochoa S. (1977). Translational control by protein kinases in *Artemia salina* and wheat germ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4356–4359.
Skoultchi A., Gross P. R. (1973). Maternal histone messenger

RNA: Detection by molecular hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 2840–2844.

Sly W.S., Fischer H.D., Gonzales-Noriega A., Grubb J.H., Natowicz M. (1981). Role of the 6-phosphomannosyl-enzyme receptor in intracellular transport and adsorptive pinocytosis of lysosomal enzymes. Methods Cell Biol. **23**, 191–214.

Smith L.D., Ecker R.C. (1965). Protein synthesis in enucleated eggs of *Rana pipiens*. Science **150**, 777–779.

Soffer R.L. (1980). Biochemistry and biology of aminoacyl-transfer RNA-protein transferases. In: D. Soll, J. N. Abelson and P.R. Schimmel (eds.). Transfer RNA: Biological Aspects. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 493–505.

Spirin A.S. (1966). On "masked" forms of messenger RNA in early embryogenesis and in other differentiating systems. Curr. Top. Dev. Biol. **1**, 1–38.

Standart N., Hunt T., Ruderman J.V. (1986). Differential accumulation of ribonucleotide reductase subunits in clam oocytes: The large subunit is stored as a polypeptide, the small subunit as untranslated mRNA. J. Cell Biol. **103**, 2129–2136.

Swank R.T., Paigen K. (1973). Biochemical and genetic evidence for a macromolecular β-glucuronidase complex in microsomal membranes. J. Mol. Biol. **77**, 371–389.

Swenson K.I., Farrell K.M., Ruderman J.V. (1986). The calm embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. Cell **47**, 861–870.

Tennant D.H. (1914). The early influence of spermatozoa upon the characters of echinoid larva. Carnegie Inst. Wash. Publ. **182**, 127–138.

Thomas N.S.B., Matts R.L., Levin D.H., London I.M. (1985). The 60S ribosomal subunit as a carrier of eukaryotic initiation factor 2 and the site of reversing factor activity during protein synthesis. J. Biol. Chem. **260**, 9860–9866.

van Loon A.P.G.M., Brandli A.W., Schatz G. (1986). The presequence of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting. Cell **44**, 801–812.

van Loon A.P.G.M., Schatz G. (1987). Transport of protons into the mitochondrial intramembranous spase: The "sorting" domain of cytochrome c_1 presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. EMBO J. **6**, 2441–2448.

Wagenaar E.B., Mazia D. (1978). The effect of emetine on the first cleavage division of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. In: E.R. Dirksen, D.M. Prescott and L.F. Fox (eds.), Cell Reproduction: In Honor of Daniel Mazia. Academic, New York, pp. 539–545.

Walter P., Blobel G. (1983). Subcellular distribution of signal recognition particle and 7SL-RNA determined with polypeptide-specific antibodies and complementary DNA probe. J. Cell Biol. **97**, 1693–1699.

Weidmann M., Kurzchalia T.V., Hartmann E., Rapoport T.A. (1987). A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. Nature **328**, 830–833.

Weir M.P., Kornberg T. (1985). Patterns of *engrailed* and *fushi tarazu* transcripts reveal novel intermediate stage of *Drosophila* segmentation. Nature **318**, 433–439.

Wellems T.E., Josephs R. (1979). Crystallization of deoxyhemoglobin S by fiber alignment and fusion. J. Mol. Biol. **135**, 651–674.

Wilt F.H. (1964). Ribonucleic acid synthesis during sea urchin embryogenesis. Dev. Biol. **9**, 299–313.

Winkler M.M., Nelson E.M., Lashbrook C., Hershey J.W.B. (1985). Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. Dev. Biol. **107**, 290–300.

Winkler M.M., Steinhardt R.A. (1981). Activation of protein synthesis in a sea urchin cell-free system. Dev. Biol. **84**, 432–439.

Woodland H.R., Ballantine J.E.M. (1980). Paternal gene expression in developing hybrid embryos of *Xenopus laevis* and *Xenopus borealis*. J. Embryol. Exp. Morphol. **60**, 359–372.

Young E.M., Raff R.A. (1979). Messenger ribonucleoprotein patricles in developing sea urchin embryos. Dev. Biol. **72**, 24–40.

Zucker W.V., Schulman H.M. (1968). Stimulation of globin-chain initiation by hemin in the reticulocyte cell-free system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **59**, 582–589.

Оглавление

Часть II. Механизмы клеточной дифференцировки 5

Глава 7. Детерминация посредством цитоплазматической спецификации. *Перевод Г. М. Игнатьевой* 5
Введение 5
Преформация и эпигенез 5
Французские тератологи 7
Цитоплазматическая спецификация у зародышей оболочников 8
Цитоплазматическая локализация у зародышей моллюсков 14
Дополнительные сведения и гипотезы 14
Внутриклеточная локализация и движения морфогенетических детерминантов 14
Детерминация у нематоды *Caenorhabditis elegans* 20
Цитоплазматическая локализация детерминантов половых клеток 24
Генетика цитоплазматических детерминантов у дрозофилы 30
Резюме 36
Литература 36

Глава 8. Прогрессивная детерминация. *Перевод Г. М. Игнатьевой* 39
Введение 39
Август Вейсман: теория зародышевой плазмы . 39
Вильгельм Ру: мозаичное развитие 40
Ганс Дриш: регуляционное развитие 41
Свен Герстадиус: потенции и градиенты в ооците 43
Ганс Шпеман: прогрессивная детерминация эмбриональных клеток 49
Ганс Шпеман и Гильда Мангольд: первичная эмбриональная индукция 52
Региональная специфичность индукции . . . 53
Механизмы первичной эмбриональной индукции 56
Нейральный индуктор как молекула, способная к диффузии 61
Компетенция и вторичная индукция 61
Литература 63

Глава 9. Тождество геномов и дифференциальная экспрессия генов: эмбриологические исследования. *Перевод Г. М. Игнатьевой* 65
Введение 65
Тождество геномов 65
Клонирование у амфибий: ограничение потенций клеток 71
Клонирование у амфибий: исключения из ограничения потенций 74
Дополнительные сведения и гипотезы 76
Клонирование 76
Литература 79

Глава 10. Тождество геномов и дифференциальная экспрессия генов: молекулярные исследования. *Перевод В. С. Михайлова* 80
Введение 80
Методы молекулярной биологии 80
Дополнительные сведения и гипотезы 85
Когда ген клонирован 85
Дифференциальная экспрессия генов 92
Дополнительные сведения и гипотезы 99
Изменения генов 99
Резюме 107
Литература 107

Глава 11. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции: изменение транскрипции в ходе развития. *Перевод В. С. Михайлова* 109
Введение 109
Гетерохроматин 110
Дополнительные сведения и гипотезы 114
Определение времени инактивации Х-хромосомы 114
Амплифицированные гены 114
Дополнительные сведения и гипотезы 119
Молекулярная основа быстрой транскрипции рибосомных генов 119
Селективная транскрипция генов 120
Белок-регулятор транскрипции: контроль генов 5S-рРНК 127
Контроль детерминации на уровне транскрипции: гены переключения путей дифференцировки дочерних клеток 130
Дополнительные сведения и гипотезы 132
Детерминация клеток вульвы у *Caenorhabditis elegans* 132
Резюме 134
Литература 134

Глава 12. Регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции: механизмы дифференциальной транскрипции генов. *Перевод В. С. Михайлова* 137
Эукариотические гены, кодирующие белки . . . 137
Экзоны и интроны 137
Структура и функция промотора 141
Структура и функция энхансеров 144
Транскрипция генов легких цепей иммуноглобулинов 151

Дополнительные сведения и гипотезы 154
Модульные гены 154
Метилирование ДНК 155
Дополнительные сведения и гипотезы 158
Определение сайтов метилирования 158
Хроматин эукариот 159
Нуклеосомы 159
Активация репрессированного хроматина . . 162
Связь активной ДНК с ядерным матриксом . . 167
Резюме 171
Литература 172

Глава 13. Контроль развития на уровне процессинга РНК. *Перевод В. С. Михайлова* 177
Введение 177
Гетерогенная ядерная РНК 177
Сложность ядерной и цитоплазматической РНК 178
Контроль развития на уровне процессинга яРНК 180
Дополнительные сведения и гипотезы 183
Механизмы специфического процессинга ядерных РНК 183
Присутствие в ядре предшественников мРНК, не прошедших процессинг 185
Образование альтернативных белков на одном гене: дифференциальный процессинг РНК в иммунной системе 186
Дифференциальный процессинг РНК: генерация новых белков в разных клетках в разное время 188
Дополнительные сведения и гипотезы 190
Биохимия процессинга РНК 190
Образование 3'-конца РНК 194
Транспорт из ядра 195
Резюме 196
Литература 196

Глава 14. Трансляционная и посттрансляционная регуляция процессов развития. *Перевод В. С. Михайлова* 199
Трансляционная регуляция развития 199
Механизм трансляции у эукариот 199
Контроль на уровне трансляции при координированном синтезе белка: продукция гемоглобина 202
Селективная деградация мРНК 204
Трансляционный контроль ооцитных мРНК . . 206
Дополнительные сведения и гипотезы 216
Активация генома зародыша 216
Гормональная стабилизация специфических мРНК 217
Широкая распространенность контроля на уровне трансляции 218
Посттрансляционная регуляция экспрессии генов . 219
Посттрансляционная активация белков . . . 219
Инактивация белков при посттрансляционных модификациях 221
Субклеточная компартментализация белков с помощью посттрансляционных модификаций: адресование белков в мембраны и лизосомы . 224
Адресование белков в ядра и митохондрии . . 225
Надмолекулярная сборка 226
Коллаген: конспект посттрансляционной регуляции 228
Литература 230

Учебное издание

Скотт Ф. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах
Том 2

Заведующая редакцией
канд. биол. наук М. Д. Гроздова
Ведущий редактор М. Б. Николаева
Редактор И. А. Ермакова
Художник А. Е. Волков
Художественные редакторы Н. М. Иванов, Л. М. Аленичева
Технический редактор М. А. Страшнова
Корректор И. А. Дериколенко

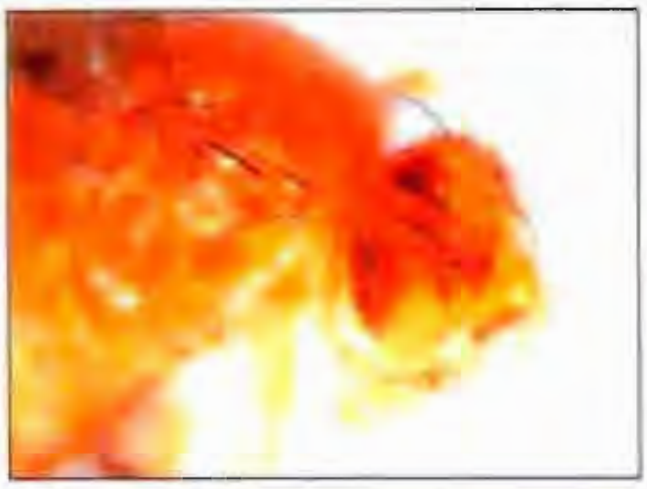
ИБ № 7425

Лицензия Л. Р. № 010174 от 22.01.92.

Сдано в набор 15.01.92. Подписано к печати 05.08.94.
Формат 84 × 108$^{1}/_{16}$. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Гарнитура таймс.
Объем 7,50 бум. л. Усл. печ. л. 25,20. Усл. кр.-отт. 27,72.
Уч.-изд. л. 28,00.
Изд. № 4/7637. Тираж 7000 экз. Зак. 1246.

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

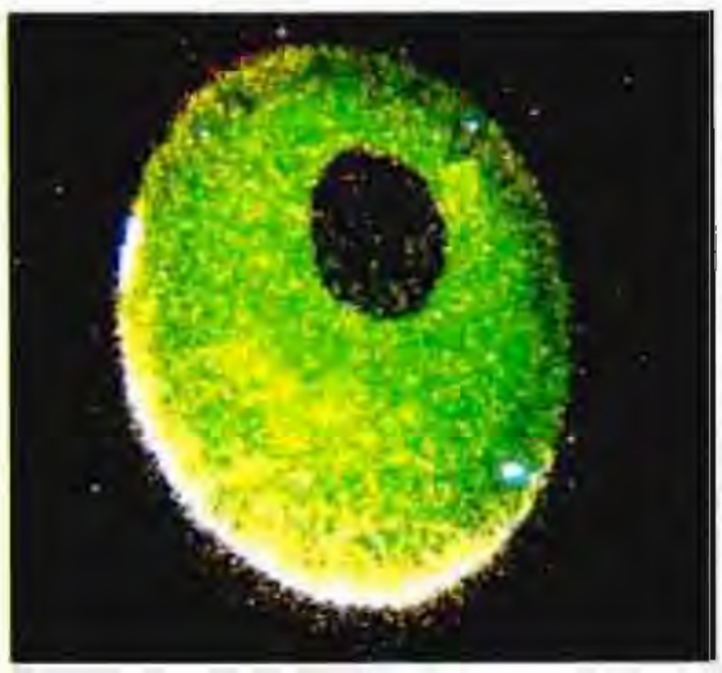
Можайский полиграфкомбинат
Комитета Российской Федерации по печати
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.



Данные, свидетельствующие о динамичности генома

Мозаичная структура глаза у дрозофилы сформировалась в результате спонтанного удаления участка ДНК (транспозона), который находился в гене, контролирующем синтез пигмента в клетках, дающих начало глазу. Белые участки образованы клетками, сохранившими транспозон, тогда как красные клетки способны синтезировать пигмент, поскольку вызывающий мутацию транспозон удален из гена, кодирующего синтез пигмента. Глава 10. (Фотографии с любезного разрешения G. M. Rubin.)





Локализация специфических мРНК в яйце

Br1 мРНК, кодирующие белок, подобный фактору роста, обнаружены с помощью метода гибридизации in situ только в вегетативной области яйца *Xenopus*. Белый серп, локализующийся внизу по периферии яйца, обусловлен радиоактивностью зонда, узнающего мРНК; остальная цитоплазма окрашена красителем Гимза. Главы 7, 8, 14. (Фотография с любезного разрешения D. A. Melton.)

Мыши, имеющие по шесть родителей

Эти разноцветные мыши были получены в результате смешивания клеток трех зародышей, находящихся на 4-клеточной стадии. Каждый из зародышей имел двух родителей: двух черных, двух белых и двух бурых. При этом трехголовых монстров не возникало, а образовывалась одна мышь (нормальных размеров), в развитие которой внесли вклад все три зародыша. У гибридной мыши образуются половые клетки трех типов. Об этом свидетельствует тот факт, что от скрещивания химерной мыши с рецессивной (белой) мышью были получены белые, черные, бурые и пятнистые потомки (показанные на фотографии). Глава 8. (Фотографии с любезного разрешения C. Markert.)



Активация энхансером тканеспецифической транскрипции

Энхансеры представляют собой участки ДНК, которые позволяют соседним генам экспрессироваться в соответствующее время и в соответствующей ткани. Если ген бактериальной β-галактозидазы помещают сразу после энхансера, обеспечивающего транскрипцию какого-либо гена в жировом теле самки, то бактериальный ген активируется в жировых телах (но не в других органах самки) (*справа*) и не активируется у самца (*слева*); это продемонстрировано с помощью окрашивания, специфического для β-галактозидазы (*А*). Окрашивания не наблюдается, если энхансер помещают не по соседству с β-галактозидазным геном (*Б*) или если какие-либо другие ДНК заменяют энхансер (*В*). Глава 12. (Фотографии с любезного разрешения P. Wensink.)

Том теперь — великий муж науки... и знает обо всем, кроме того, почему куриное яйцо не превращается в крокодила.

Ч. Кингсли, 1863

Изучая период дробления, мы приближаемся к источнику, дающему начало прогрессивно разветвляющимся потокам дифференцировок, которые завершаются в конце концов почти тихими заводями — индивидуальными клетками взрослого организма

Э. Джаст, 1939

С. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Издательство «Мир» Москва





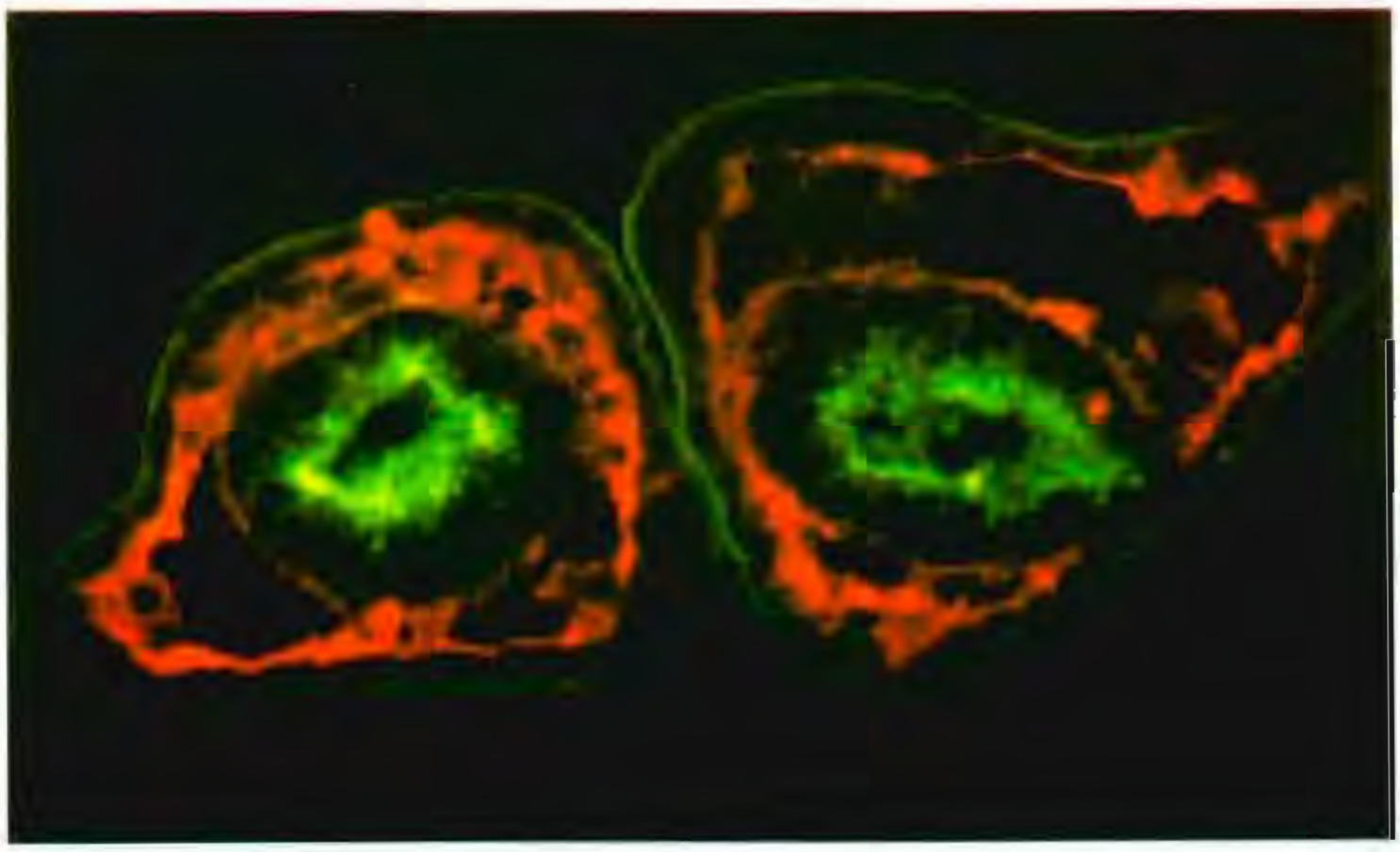


3



Гинандроморфы у бабочек

Половой мозаик (гинандроморф у бабочки *Io*) отчетливо делится на две половины: розовато-коричневую женскую и желтую с менее крупными крыльями мужскую. Появление таких половых мозаиков обусловлено тем, что одна из двух X-хромосом утрачивается на ранней стадии митотического деления. Глава 21. (Фотография T. R. Manley с любезного разрешения. „The Journal of Heredity".)



Топографические различия клеточных мембран

Не все клеточные мембраны одинаковы. Способность клеток изменять свое положение в зародыше часто рассматривают как следствие изменений, происходящих на клеточной поверхности. На приведенной фотографии видно, что некий белок (окрашенный в красный цвет с помощью флуоресцирующих антител) экспрессируется на поверхности только тех клеток, которым предстоит образовать скелетные элементы личинки морского ежа. Другие компоненты клеточной поверхности (окрашенные в зеленый цвет) обнаруживаются только на клетках, образующих кишку личинки. Фотография сделана со среза, перпендикулярного дорсовентральной оси личинки. Главы 4 и 15. (Фотография с любезного разрешения G. Wessel.)

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

Developmental Biology

Second Edition

SCOTT F. GILBERT
SWARTHMORE COLLEGE



Sinauer Associates, Inc. • Publishers
Sunderland, Massachusetts

С. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах

Перевод с английского
д-ра биол. наук А. И. Иванова
канд. биол. наук Д. Г. Полтевой
Н. О. Фоминой

под редакцией
д-ра биол. наук С. Г. Васецкого

3

«Мир» Москва
1995

ББК 28.0
Г47
УДК 57

Гилберт С.
Г47 Биология развития: В 3-х т. Т. 3: Пер. с англ. – М.: Мир, 1995.– 352 с., ил.
ISBN 5-03-001833-6

Фундаментальное учебное и справочное пособие по относительно новой, быстро развивающейся дисциплине – биологии развития. На русском языке выходит в 3-х томах. В третьем томе рассматриваются клеточные взаимодействия в процессе развития. В этот том внесены изменения, подготовленные автором для 3-го английского издания (1991 г.)

Для эмбриологов, молекулярных биологов, а также студентов биологических факультетов.

ББК 28.0

Редакция литературы по биологии

Издание выпущено в счет дотации, выделенной Комитетом РФ по печати

ISBN 5-03-001833-6 (русск.)
ISBN 5-03-001830-1
ISBN 0-87893-248-8 (англ.)

© 1988, 1991 by Sinauer Associates, Inc.
© перевод на русский язык,
А. И. Иванов, Д. Г. Полтева,
Н. О. Фомина, 1995

Часть III

Клеточные взаимодействия в развитии

Глава 15

Пространственная упорядоченность клеток: роль клеточной поверхности

Но природа не расчленена на атомы. Ей изначально присуща организация, в ней очевиден порядок, лежащий в основе красоты; более того, человеческий разум способен постигать ее только потому, что он сам – неотъемлемая часть этого порядка.

ПАУЛЬ ВЕЙС (1960)

Славлю Тебя, потому что я дивно устроен.

ПСАЛОМ 138

Введение

Организм – это не просто собрание случайно расположенных клеток различных типов, и развитие заключается не только в *дифференцировке клеток*, но и в их пространственной организации в многоклеточные структуры (ткани и органы), называемой *морфогенезом*. Подробно изучая такие ткани, как сетчатка, мы встречаемся со сложным и четким пространственным распределением целого ряда клеточных типов. В последующих шести главах мы рассмотрим пути изменения клеток развивающегося зародыша, которые приводят к созданию функциональных органов тела. Обсуждение морфогенеза можно ограничить пятью основными вопросами.

1. *Как из клеток формируются ткани?* Почечный эпителий, например, образует плотную трубку из клеток с мощной базальной мембраной для фильтрации крови. Каким образом эти клетки скреплены вместе?
2. *Как ткани объединяются в органы?* Эпителиальные клетки почечных канальцев должны образовать трубку, окруженную мезенхимой. Именно такая организация почечных канальцев обеспечивает ток мочи и ресорбцию: будь они заполнены соединительной тканью, они не смогли бы функционировать. Кроме того, фильтрующие единицы почки должны быть как-то соединены с мочеточником, по которому моча поступает в мочевой пузырь. Все эти связи требуют строгой упорядоченности.
3. *Почему органы возникают в строго определенном, соответствующем для них месте?* Почки, например, симметрично располагаются в дорсальной части брюшной полости. Они не развиваются в голове или в конечностях.
4. *Каким образом мигрирующие клетки достигают конечного пункта своей миграции?* Половые клетки позвоночных образуются не в гонадах. Что заставляет их следовать определенным маршрутом и прекратить миграцию по достижении области формирующейся гонады?
5. *Как происходит рост органов и составляющих их клеток; как скоординирован этот рост в процессе развития?* Скорость роста почки у новорожденного и взрослого человека неодинакова. Вместе с тем клетки – предшественники форменных элементов крови делятся в течение всей жизни человека примерно с той же скоростью, что и у плода. Какие факторы контролируют эти различия в скорости роста?

Все эти вопросы касаются аспектов поведения клеток. В самом деле, принято считать, что морфогенез происходит благодаря осуществлению относительно ограниченного набора процессов, происходящих на клеточном уровне: 1) направления и числа клеточных делений; 2) изменения формы клеток; 3) миграции клеток; 4) их роста; 5) гибели и, наконец, 6) изменений в составе клеточной мембраны и внеклеточного матрикса. О некоторых из перечисленных процессов мы уже упоминали, особенно при изучении гаструляции – одного из важнейших морфогенетических событий в жизни раннего зародыша.

Существуют, по-видимому, два основных способа, посредством которых клетки, взаимодействуя друг с другом, влияют на морфогенез. В основе первого лежит секреция клетками одного типа способных к диффузии веществ, изменяющих поведение клеток других типов. Эти вещества представлены гормонами, факторами роста и морфогенами (более подробно они будут описаны в гл. 19 и 20). Их молекулы координируют морфогенетическую активность всего организма. В основе второго способа, ответственного прежде всего за создание специфических тканей и органов, лежит взаимодействие между клеточными поверхностями соседних клеток. В процессе органогенеза отдельные клетки или группы клеток меняют свое относительное положение и вступают во взаимодействие с клетками других типов. Избирательное взаимодействие между соседствующими клетками приводит к тому, что клетки разных типов располагаются строго упорядоченным образом, формируя различные ткани и органы.

Следовательно, клетки должны обладать способностью к избирательному узнаванию других клеток, прикрепляясь к одним и мигрируя по поверхности других. Молекулярные события, обусловливающие избирательное узнавание клеток и их организацию в ткани и органы, происходят на клеточной поверхности. В этой главе мы рассмотрим пути взаимодействия клеточных поверхностей в ходе развития, приводящего к тому, что клетки надлежащим образом оказываются локализованными в соответствующих тканях и органах.

Дифференциальное сродство клеток

Стационарные культуры

Начало современному анализу морфогенеза было положено экспериментами Таунса и Гольтфретера в 1955 г. Использовав способность тканей зародышей амфибий диссоциировать на отдельные клетки в щелочной среде, эти исследователи приготовили суспензии одиночных клеток каждого из трех зародышевых листков и тканей нейрулы. Две или более таких суспензий можно комбинировать в разных сочетаниях; после нормализации pH клетки прилипают друг к другу, формируя агрегаты на агаре, покрывающем дно чашки Петри. Используя зародышей разных видов, клетки которых различались по размерам и окраске, Таунсу и Гольтфретеру удалось проследить поведение реагрегированных клеток (рис. 15.1).

Результаты экспериментов оказались поразительными. Во-первых, исследователи обнаружили, что диссоциированные клетки способны к пространственной сегрегации. Иными словами, происходит **рассортировка** смешанных клеток, и клетки каждого типа занимают соответствующую область. Так, в агрегате, образованном эпидермальными и мезодермальными клетками, эпидермальные клетки

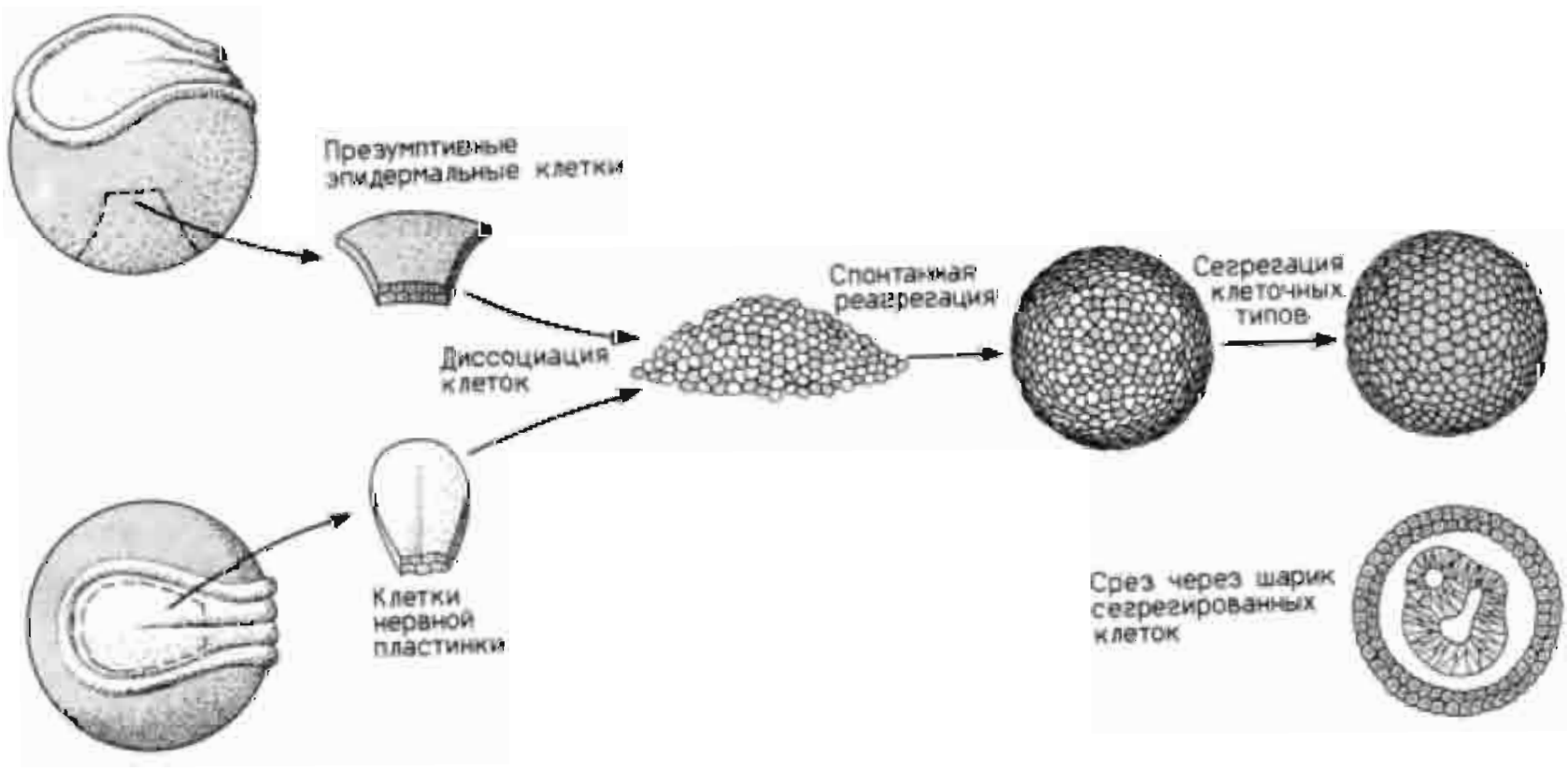


Рис. 15.1. Реагрегация клеток нейрул амфибий. Смешивают презумптивные эпидермальные клетки пигментированных зародышей и клетки нервной пластинки непигментированных зародышей. Реагрегация происходит таким образом, что клетки одного типа (в данном случае презумптивного эпидермиса) покрывают клетки другого типа. (По Townes, Holtfreter, 1955.)

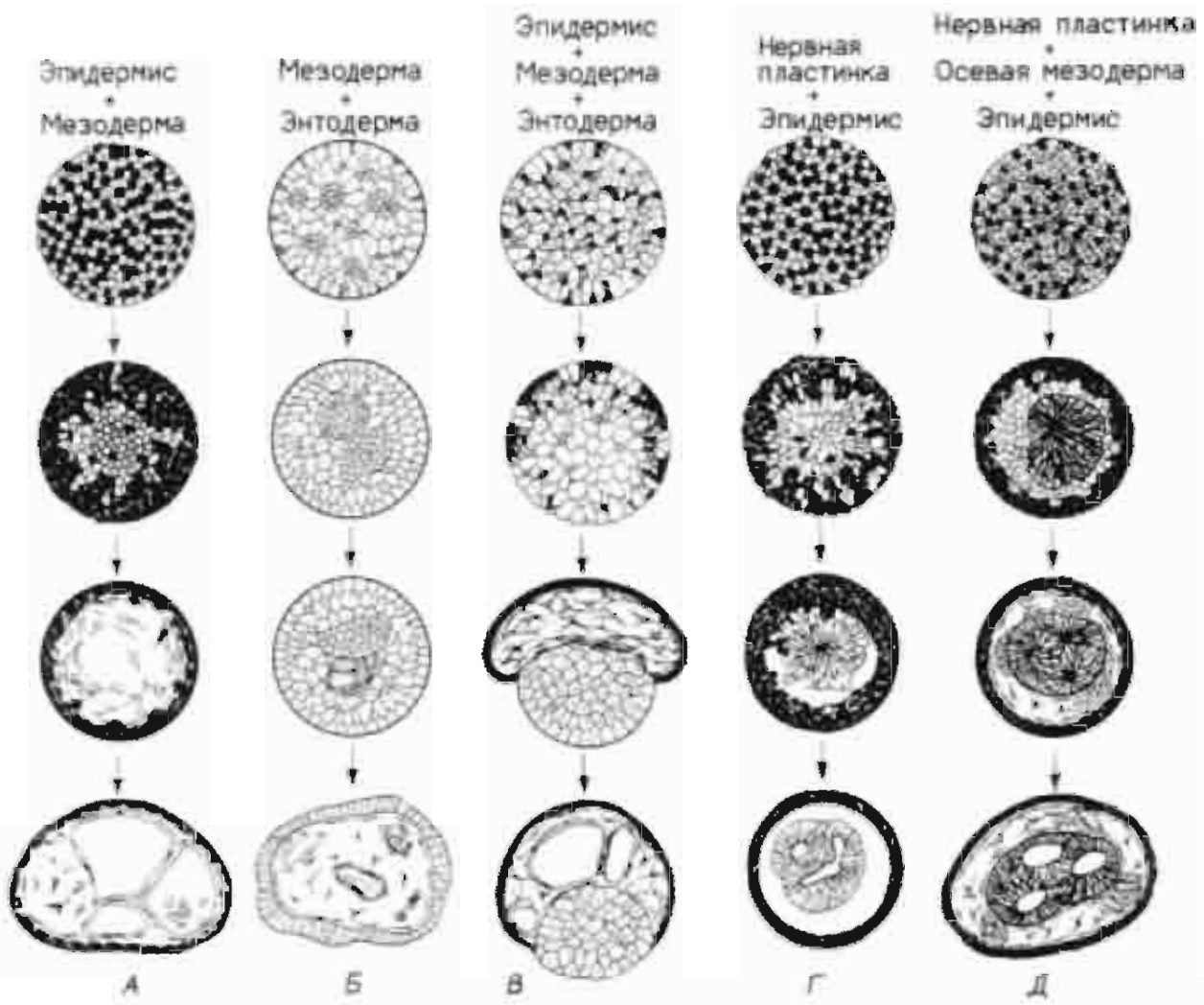
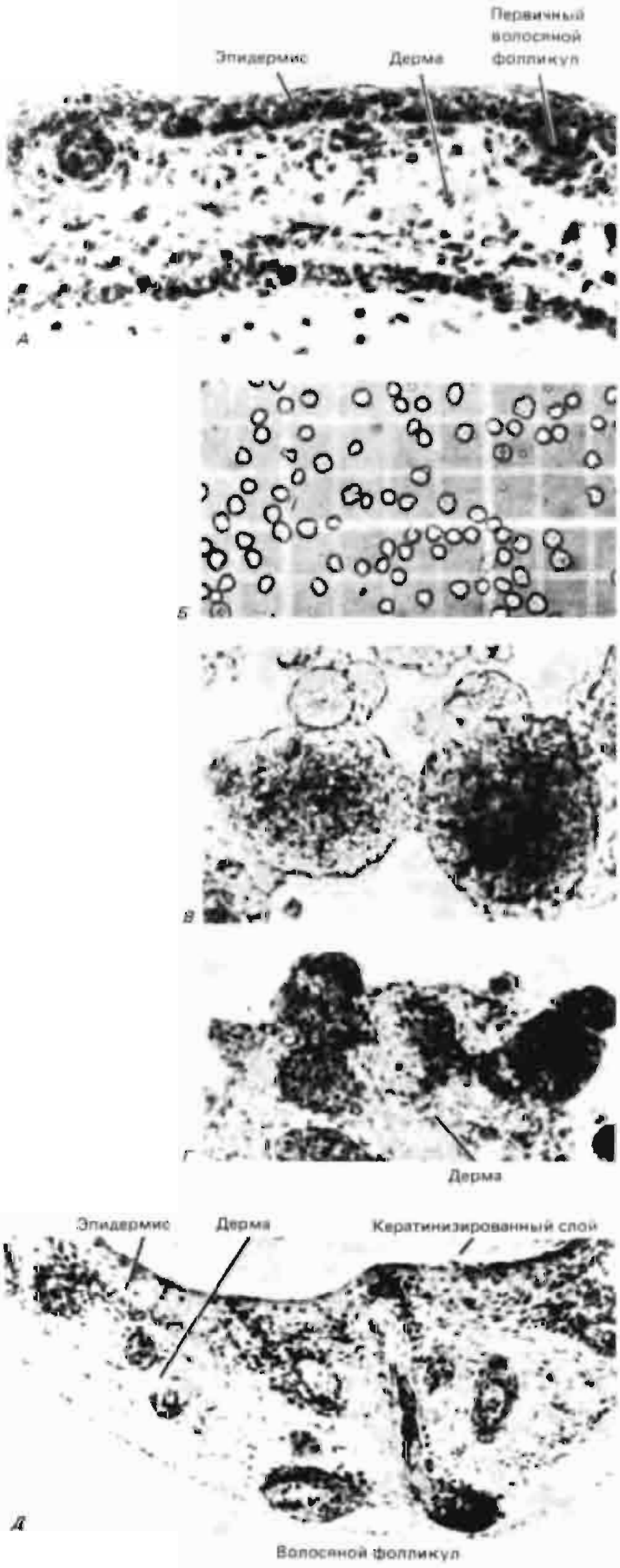


Рис. 15.2. Рассортировка и реорганизация пространственных отношений в агрегатах зародышевых клеток амфибии. Объяснения см. в тексте. (По Townes, Holtfreter, 1955.)

оказываются на периферии агрегата, а мезодермальные внутри. Ни в одном из случаев в образовавшихся агрегатах клетки не располагались беспорядочно. В большинстве случаев клетки одного типа окружали клетки другого.

Во-вторых, Таунс и Гольтфретер обнаружили, что окончательное положение реагрегировавших клеток отражает их положение в зародыше. Как мы уже видели, мезодерма занимает центральное положение по отношению к эпидермису, прилипая к его внутренней поверхности (рис. 15.2, *А*). Мезодерма мигрирует к центру и по отношению к энтодерме (рис. 15.2, *Б*). Однако в том случае, когда смешивают клетки всех трех зародышевых листков (рис. 15.2, *В*), энтодерма отделяется от эктодермы и мезодермы, которые затем ее окружают. В окончательной конфигурации эктодерма располагается по периферии агрегата, энтодерма оказывается внутри, а мезодерма между ними. Гольтфретер назвал это явление **избирательным сродством**. Внутренняя поверхность эктодермы имеет положительное сродство к мезодермальным клеткам и отрицательное сродство к энтодерме. Мезодерма обладает положительным сродством и к эктодермальным, и к энтодермальным клеткам. Сходство в расположении клеток в агрегате и в нормальном зародыше проявляется также и при реагрегации клеток эпидермиса и первой пластинки (рис. 15.2, *Г*). Как и прежде, презумптивные эпидермальные клетки мигрируют на периферию, а клетки нервной пластинки перемещаются внутрь, образуя структуру, напоминающую нервную трубку. Если к суспензии презумптивных эпидермальных клеток и клеток нервной пластинки добавить клетки осевой мезодермы, то в результате сегрегации клеток образуется наружный слой эпидермиса, центрально расположенная нервная ткань и слой сомитов и мезенхимы между ними (рис. 15.2, *Д*). Как бы то ни было, клетки способны сортироваться в соответствии со своим истинным положением в зародыше. Такое предпочтительное сродство отмечал также Буко (Boucaut, 1974), который инъецировал клетки того или иного зародышевого листка в бластоцель зародышей амфибий; инъецированные клетки мигрировали в соответствующий зародышевый листок: энтодермальные клетки – в энтодерму хозяина, а эктодермальные – только в его эктодерму. Таким образом, избирательное сродство играет важную роль в передаче позиционной информации клеткам зародыша.

Третий вывод, к которому пришли Гольтфретер и его сотрудники, заключался в том, что в процессе развития избирательное сродство меняется. Этого следовало ожидать, поскольку связь между соседними клетками зародыша не остается постоянной. Для нормального развития необходимо, чтобы в определенные периоды времени осуществлялось дифференциальное взаимодействие клеток одной



популяции с клетками другой. Это явление убедительно подтвердил Тринкаус (Trinkaus, 1963), показавший четкую корреляцию между изменением способности клеток прилипать друг к другу (т.е. их **адгезией**) и изменениями в их поведении. У костистых рыб в начале гаструляции пограничные клетки дискоидальных зародышей уплощаются и плотно прикрепляются к цитоплазматической поверхности яйца, сокращение которой обусловливает перемещение бластодермы к вегетативному полюсу яйца. Тринкаус обнаружил, что клетки, изолированные со стадии *бластулы*, не прилипают к искусственному субстрату, тогда как те же клетки *гаструлирующего* зародыша прикрепляются к поверхности. Более того, если клетки бластулы культивировать в течение времени, необходимого для начала гаструляции, то они начинают уплощаться и прилипают к искусственному субстрату, т.е. ведут себя так, как если бы они были в составе интактного зародыша.

Ротационные культуры

Агрегаты клеток зародышей птиц и млекопитающих более поздних стадий развития впервые получил Москона, воспользовавшись двумя методическими приемами. Во-первых, для диссоциации клеток он применил трипсин (Moscona, 1952). Расщепляя белки клеточной поверхности и белки межклеточного матрикса, этот фермент разрушает многочисленные связи, соединяющие клетки друг с другом. Во-вторых, он использовал методику ротационной агрегации (Moscona, 1961). Эта методика не позволяла клеткам оседать на дно культурального сосуда (к которому они имеют малое сродство или не имеют его вовсе), поскольку содержимое сосуда с культивируемыми в нем клетками осторожно перемешивали. В таких условиях клетки агрегировали, если силы адгезии, удерживающие их вместе, были выше, чем гидростатические силы, стремящиеся их разъединить. В первоначальном агрегате клетки располагались случайным образом, однако затем в результате миграции происходила их рассортировка в соответствии с принадлежностью к тому или иному клеточному типу. Иными словами, строение агрегатов уподоблялось строе-

Рис. 15.3. Реконструкция кожи из суспензии клеток кожи 15-дневного зародыша мыши. *А*. Срез кожи зародыша. На срезе видны эпидермис, дерма и первичный волосяной фолликул. *Б*. Суспензия единичных клеток кожи, полученная из дермы и эпидермиса. *В*. Агрегаты спустя 24 ч. *Г*. Срез через агрегат, на котором видна миграция эпидермальных клеток на периферию. *Д*. Дальнейшее развитие агрегата (72 ч), показывающее восстановленный эпидермис и дерму с волосяными фолликулами и кератинизированным слоем. (Из Monroy, Moscona, 1979; фотографии с любезного разрешения А. Moscona.)

нию исходной ткани. На рис. 15.3 представлена «реконструкция» ткани кожи 15-дневного зародыша мыши. Клетки кожи разделяли протеолитическими ферментами и помещали в ротационную культуру для образования агрегатов. В образовавшихся агрегатах эпидермальные клетки мигрировали к периферии, а клетки дермы – к центру. Через 72 ч происходила реконституция эпидермиса, формировался кератиновый слой, в области дермы были видны волосяные фолликулы. Таким образом, процедура агрегации позволяет индивидуальным клеткам восстановить ткань. В аналогичных экспериментах одиночные клетки в суспензии из зародышевой почки реагрегировали с образованием канальцев, а клетки сетчатки, объединяясь, формировали нейральную сетчатку. Такое восстановление сложных тканей из единичных клеток называют **гистотипической агрегацией**. Следовательно, клетки зародышевых органов сохраняют морфогенетическую информацию, что дает им возможность вновь формировать тканеи органоспецифические структуры.

У некоторых видов из суспензии единичных клеток может вновь возникнуть целый организм. Диссоциированные бластомеры морского ежа могут реагрегировать с образованием бластулоподобных структур, которые затем способны развиваться в нормальных личинок – плутеусов (рис. 15.4) (Giudice, 1962; Spiegel, Spiegel, 1975). Для этого необходимо присутствие всех трех типов клеток (микромеров, макромеров и мезомеров), что свидетельствует о невозможности возврата клеток к дедифференцированному состоянию и последующей редифференцировке в соответствии с их новым положением (Spiegel, Spiegel, 1975).

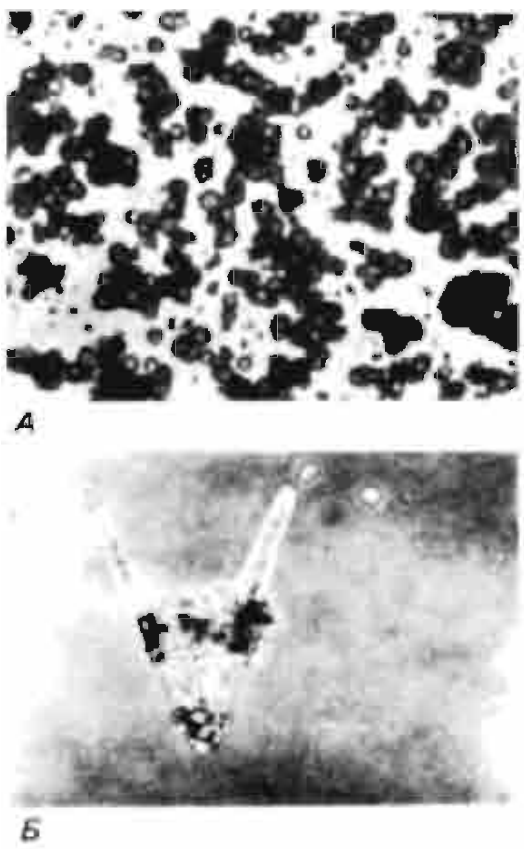


Рис. 15.4. Агрегация бластомеров диссоциированного 16-клеточного зародыша морского ежа *Arbacia punctulata*. *А*. Диссоциированные клетки. *Б*. Реконструированная личинка плутеус через 25 ч после начала агрегации. (Из Spiegel, Spiegel, 1975; фотографии с любезного разрешения авторов.)

Если основной парадигмой генетики развития является дифференциальная экспрессия генов, то в случае морфогенеза парадигма основана на **дифференциальном сродстве клеток**.

Изменение специфического сродства клеток и их миграция у зародышей морского ежа

Разнообразные события в развитии и особенно события, связанные с направленными перемещениями клеток, объясняют изменением сродства клеточных поверхностей. Так, в гл. 4, например, описывались эксперименты (Fink, McClay, 1985), свидетельствующие о том, что во время ранней гаструляции происходит изменение сродства клеток-предшественников первичной мезенхимы. В начале гаструляции эти клетки утрачивают сродство к соседним клеткам и внеклеточному гиалиновому слою и одновременно приобретают сродство к волокнам фибронектина, выстилающим бластоцель. На более поздних этапах гаструляции эти клетки приобретают способность мигрировать к определенной части стенки бластоцеля. Кроме того, будучи «антисоциальными» по отношению друг к другу со времени ингрессии в бластоцель, теперь они начинают объединяться в синцитий и формировать мезодермальное кольцо вокруг инвагинирующей энтодермы. Эти изменения адгезионных свойств характеризуются временной специфичностью и специфичностью в отношении клеток первичной мезенхимы (McClay, Ettensohn, 1987). Изменение сродства клеток приобретает исключительную важность для процессов морфогенеза.

Способы клеточной миграции

Подвижная клетка (как и бесцельно движущаяся особь) едва ли в течение какого-то времени покинет свое исходное местоположение и удалится от него на значительное расстояние, если условия существования не вынудят ее перемещаться в определенном направлении. Каков же механизм, позволяющий клеткам мигрировать в те или иные области зародыша? Дальние миграции могут быть обусловлены хемотаксисом, гаптотаксисом, гальванотаксисом и контактным ориентированием. Ближние взаимодействия (ответственные, например, за взаимодействие клеток при формировании органов) могут быть обусловлены контактным ингибированием и термодинамическими взаимодействиями на клеточных поверхностях.

Хемотаксис

Хемотаксисом называют движение клеток в направлении градиента концентрации какого-либо химического фактора, содержащегося в растворе (Harris, 1954; Armstrong, 1985). Клетки будут воспринимать химический сигнал и перемещаться в направлении повышающейся концентрации до тех пор, пока не достигнут источника секреции этого вещества. Однако легко составить представление о хемотаксисе и трудно подтвердить его существование. Во-первых, скопление клеток в данном месте может объясняться тем, что они просто попадают в «ловушку». Во-вторых, не исключено, что растворимый фактор только стимулирует подвижность клеток, а при наличии лишь одного пути миграции их перемещение будет имитировать хемотаксис (Zigmond, 1978; Trinkaus, 1985). Мы уже приводили два примера хемотаксиса, имеющего место в развитии. Спермии морского ежа перемещаются по градиенту низкомолекулярных веществ (таким, например, как резакт), выделяемых студенистой оболочкой яйца, а секретируемые опухолью факторы, вызывающие ангиогенез, обусловливают миграцию эндотелиальных клеток капилляров к опухоли.

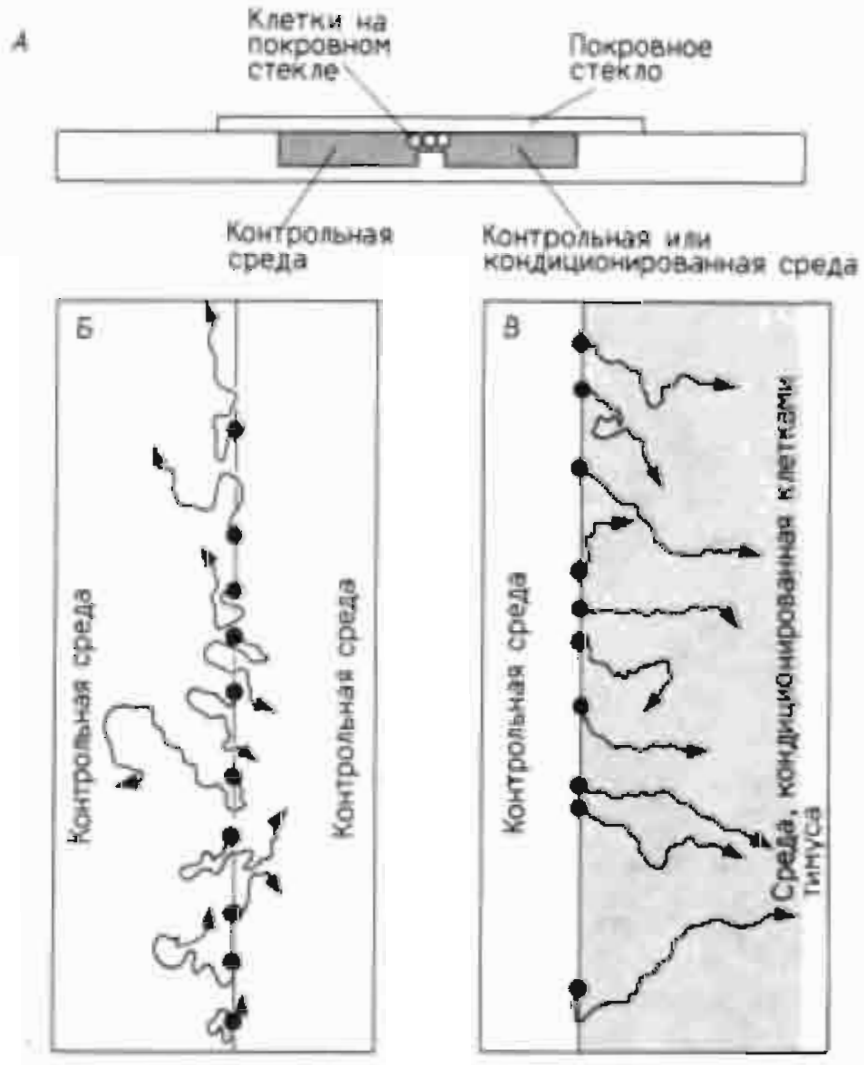


Рис. 15.5. Хемотаксис предшественников лимфоцитов к растворимому веществу, выделенному из тимуса. Клетки помещали в центр покровного стекла, прикрывающего две камеры, заполненные культуральной средой (*А*). Среда могла смешиваться под клетками, образуя градиент. Перемещение клеток регистрировалось с помощью видеокамеры. *Б*. Траектории движения клеток в случае, когда обе камеры были заполнены одной и той же контрольной средой. *В*. Траектории движения клеток, когда в одной из камер содержалась контрольная (некондиционированная) среда, а в другой – кондиционированная, т. е. среда, в которой росли эпителиальные клетки тимуса. (По Champion et al., 1986.)

Можно ли процессы морфогенеза, протекающие в зародыше, объяснить хемотаксисом? По крайней мере в одном случае миграция клеток обусловлена специфическими хемотактическими факторами. Это миграция предшественников лимфоцитов из костного мозга в эмбриональный тимус (где они становятся Т-клетками иммунной системы), обусловленная растворимыми факторами, которые секретируются клетками тимуса. Для подтверждения хемотаксиса (Champion et al., 1986) клетки костного мозга перепела помещали на границе между двумя камерами, составляющей в длину 1 мм (рис. 15.5, *А*). Если в обеих камерах среда была нормальной, то направленного движения не наблюдалось (рис. 15.5, *Б*). Но если одна из камер содержала среду, в которой культивировались эпителиальные клетки эмбрионального тимуса, то происходила специфическая миграция клеток костного мозга в эту камеру (рис. 15.5, *В*). Веществом, обусловливающим хемотаксис, оказалось низкомолекулярное соединение (от 1000 до 4000 дальтон), стабильное при 95 °С и разрушающееся под действием протеаз. Это вещество не исследовали in vivo, но можно полагать, что миграция лимфоидных предшественников в развивающийся тимус направляется небольшим пептидом, который секретируют эпителиальные клетки эмбрионального тимуса.

Гаптотаксис

Градиенты возникают не только в растворе. Молекулы, обусловливающие адгезию, также могут образовывать градиенты во внеклеточном матриксе. Любая клетка, постоянно образующая и разрушающая адгезионные контакты с такими молекулами, будет перемещаться из области их низкой концентрации к месту высокой концентрации. Это явление называют **гаптотаксисом** (Carter, 1967; Curtis, 1969). Экспериментально было показано (Harris, 1973), что клетки в культуре способны мигрировать по градиенту концентрации вещества, добавленного в пластик культуральной чашки, но условия должны быть достаточно жесткими. Если субстрат окажется недостаточно липким, то клетки будут отклоняться от правильного пути, если же субстрат будет слишком липкий, то клетки к нему просто прилипнут.

Имеются данные (Poole, Steinberg, 1982), свидетельствующие о том, что миграция клеток протока

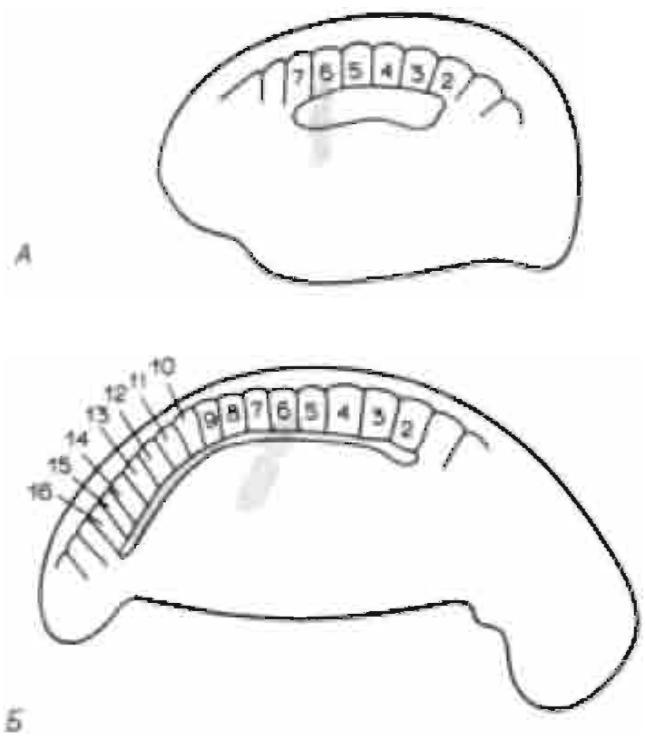


Рис. 15.6. Удлинение протока пронефроса путем клеточной миграции. На тело зародыша в месте новообразованного зачатка протока пронефроса нанесена метка витальным красителем. Спустя несколько часов меченая часть протока пронефроса переместилась в каудальную область зародыша, удалившись от первоначального источника. (По Poole, Steinberg, 1982b.)

пронефроса у хвостатых амфибий регулируется гаптотаксисом. Зачаток протока пронефроса отделяется от дорсальной мезодермы в виде плотного тяжа клеток, простирающегося вдоль пяти-шести сомитов по вентролатеральной границе сегментирующейся мезодермы. Сначала эта группа клеток выявляется в виде овальной массы вблизи головы зародыша, но по мере его развития этот зачаток распространяется вдоль вентролатеральной границы сомитов до тех пор, пока не достигнет клоаки (места выделения мочи). Рост протока осуществляется путем миграции исходной клеточной популяции. При этом клеточных делений не отмечено, индивидуальные клетки не удлиняются, а краситель, использованный для мечения клеток заднего конца зачатка пронефроса у раннего зародыша, обнаруживается вблизи клоаки на поздних стадиях (рис. 15.6). Таким образом, очевидно, что клетки зачатка пронефроса мигрируют по определенному пути из одного места на поверхности зародыша в другое.

Можно полагать, что фактор, определяющий эту миграцию, поляризован (т.е. локализован в виде градиента) на поверхности зародыша. Эту миграцию нельзя объяснить хемотаксисом, поскольку удаление области клоаки ее не прекращает, а пересадка клоаки в другие области зародыша не изменяет направление миграции зачатка пронефроса. Миграцию не определяет форма зародыша, не обусловливается она и электрическим градиентом (см. ниже). Если зачаток пронефроса одного зародыша пересадить другому, то проток донора всегда перемещается дорсально вдоль боковой мезодермы, чтобы соединиться с протоком хозяина, а затем мигрирует под сомитами каудально по направлению к клоаке (рис. 15.7). Трансплантированный проток никогда не смещается вентрально или к голове, какой бы ни была его ориентация при имплан-

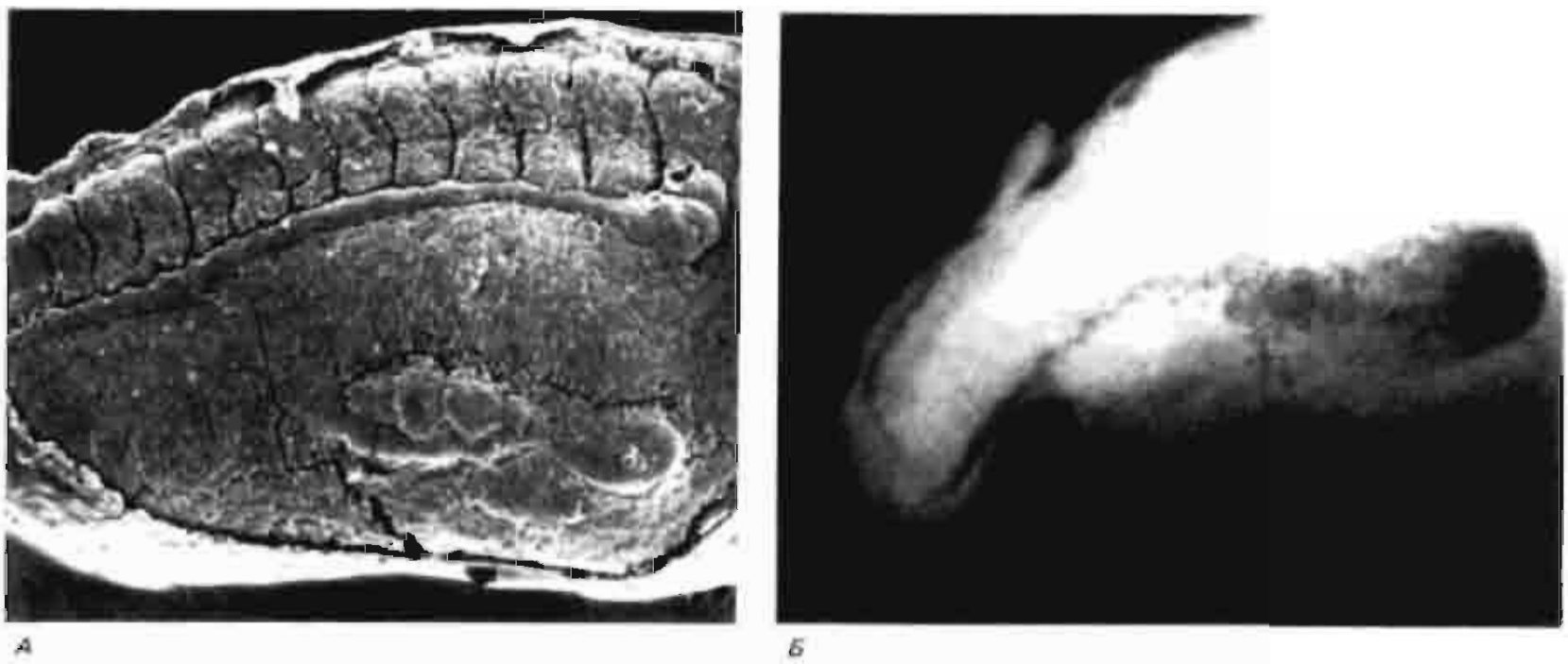


Рис. 15.7. Миграция клеток при удлинении протока пронефроса. *А*. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа, на которой представлен трансплантированный зачаток протока пронефроса (*внизу*), распространяющийся по боковой мезодерме хозяина дорсокаудально, где он сольется с протоком хозяина. *Б*. Проток пронефроса аксолотля дикого типа трансплантирован хозяину-альбиносу, чтобы показать, что миграция происходит только в дорсальном (к сомитам) и каудальном (к клоаке) направлениях. (*А* – из Steinberg, Poole, 1982; *Б* – из Zackson, Steinberg, 1986; фотографии с любезного разрешения M. S. Steinberg, S. Zackson.)

тации (Zackson, Steinberg, 1987). Согласно полученным сравнительно недавно данным (Steinberg, 1987), у зародышей хвостатых амфибий на поверхности мезодермы существует градиент щелочной фосфатазы; этот градиент располагается в вентродорсальном и переднезаднем направлении. Устранение градиента ингибиторами щелочной фосфатазы останавливает миграцию протока пронефроса. Таким образом, вдоль клеточных поверхностей, по-видимому, существуют градиенты молекул, ориентирующие клетки при их миграции в зародыше.

Гальванотаксис

Возможен еще один источник полярных градиентов в зародыше – заряженные ионы. Разница потенциалов между клетками и их окружением может играть ключевую роль в развитии (как и в процессе оплодотворения). Существует ли разница потенциалов между отдельными частями зародыша и насколько важна такая разница для морфогенеза?

В 1920 г. в лаборатории Гаррисона были получены данные, свидетельствующие о том, что растущие нервные волокна располагаются вдоль электрических силовых линий (Ingvar, 1920). Однако спустя 14 лет аналогичные эксперименты в той же лаборатории дали иные результаты (Weiss, 1934), в связи с чем представление о влиянии электрических токов на морфогенез (**гальванотаксис**) потеряло свою популярность. Положение изменилось, когда Яффе и Нуччителли (Jaffe, 1981; Nuccitelli, 1984) сконструировали зонд, способный выявлять исключительно малые электрические токи в живом организме. Этих слабых электрических полей (10–100 мВ·мм$^{-1}$) оказалось достаточно для изменения направления роста нервов или для его ускорения в направлении отрицательного полюса (рис. 15.8) (Hinkle et al., 1981; Jaffe, Poo, 1979). Подобный катодный эффект можно наблюдать при электрических градиентах около 7 мВ·мм$^{-1}$. По-видимому, электрический ток обусловливает приток Ca^{2+} в особую зону конуса роста, вызывая сборку цитоскелета и движение в определенном направлении (Cooper, Schliwa, 1985). Фибробласты куриного зародыша также мигрируют к отрицательному полюсу при культивировании их в слабом поле постоянного тока (Nuccitelli, Erickson, 1983). Более сильные электрические токи зарегистрированы у раннего куриного зародыша (Jaffe, Stern, 1979), в регенерационной бластеме конечностей некоторых амфибий (Borgens, 1982) и в яичнике бабочки *Cecropia* (Woodruff, Telfer, 1974). В последнем случае электрический ток, вероятно, играет важную роль в избирательном транспорте (наподобие электрофореза) материала из фолликулярных клеток в ооцит (гл. 21). Однако роль таких токов в направленной миграции аксонов и в поведении клеток в организме все еще остается неясной.

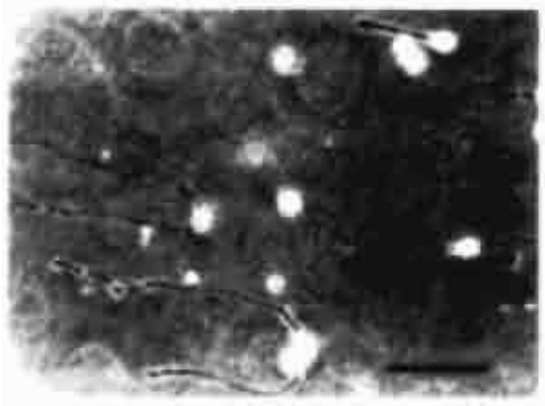


Рис. 15.8. Гальванотаксис в культуре. Нейроны *Xenopus* простирают свои аксоны параллельно градиенту напряжения 170 мВ/мм. Знаками плюс и минус обозначены соответственно анод и катод. (Из Hinkle et al., 1981; фотография с любезного разрешения K. R. Robinson.)

Контактное ориентирование

До сих пор мы ограничивались обсуждением влияния химических или ионных факторов на направленную миграцию клеток. Однако не исключено, что важную роль в этом процессе играют также и физические факторы. На клетку влияют физические свойства субстрата, по которому она перемещается; эти особенности заставляют ее выбирать преимущественное направление своего перемещения путем **контактного ориентирования** (contact guidance). Если физические преграды оставляют открытым только один канал, то подвижным клеткам не остается иного пути миграции, кроме этого канала.

В 1934 г. в опытах Вейса (Weiss, 1934) было показано, что растущие нервные волокна следуют по контурам стресса сгустка плазмы, не выходя из неглубоких желобков. Более того, изменяя линии стресса, можно было заставить нервные волокна идти параллельно друг другу (рис. 15.9). Вейс (Weiss, 1955) отметил, что если форма субстрата изменена линиями натяжения, идущими в определенном направлении, то созданные таким образом каналы будут ориентировать клеточную миграцию. В то время, однако, не был понятен источник таких натяжений. Только в 1980 г. Гаррис показал, что фибробласты могут кардинально изменять субстрат, на котором их культивируют. При культивировании на пленке из силиконовой резины или на коллагене они деформируют субстрат, образуя под собой такие же волокна стресса, как и те, что наблюдал Вейс (рис. 15.10). Таким образом, скопление фибробластов может изменить форму субстрата. Если на такой субстрат беспорядочно поместить мышечные клетки, то они организуются в оформленные функциональные единицы (Stopak, Harris, 1982). Полагают, что контактное ориенти-

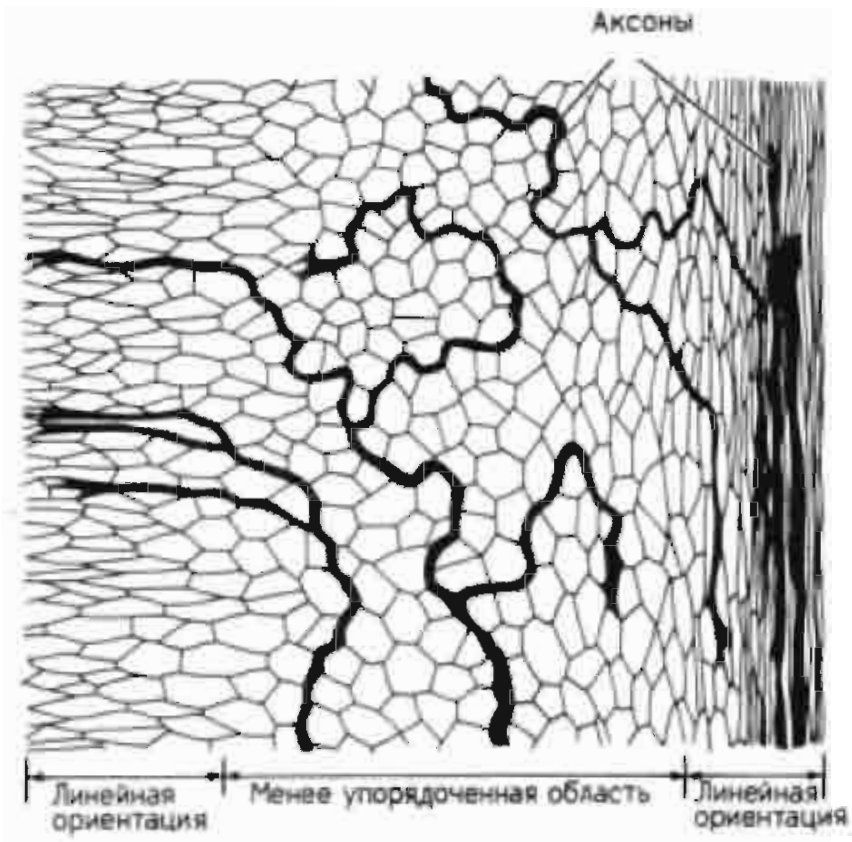


Рис. 15.9. Контактное ориентирование аксонов волокнами стресса сгустка плазмы. В том случае, когда субстрат представлен неупорядоченной сетью волокон, расположение аксонов случайно, и они часто ветвятся. Однако в местах, где волокна матрикса параллельны друг другу, аксоны также вынуждены располагаться параллельно друг другу. (По Weiss, 1955.)

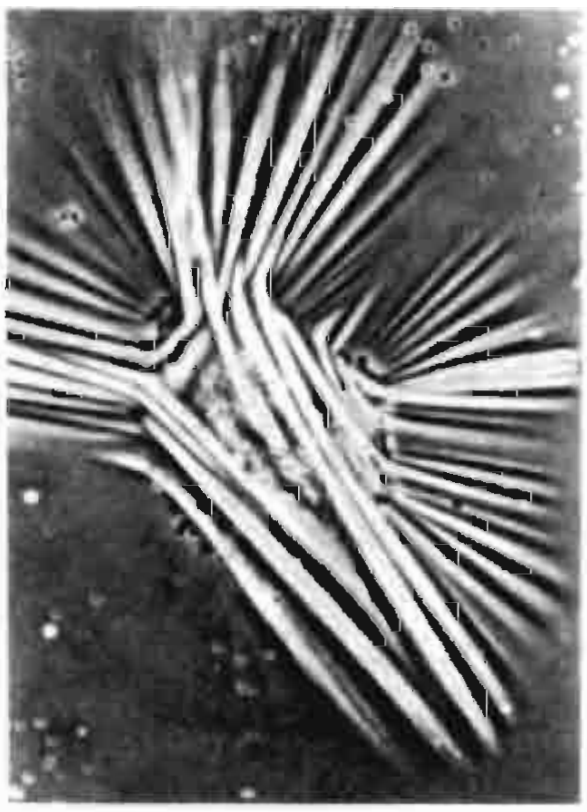


Рис. 15.10. Волокна стресса, образуемые одиночным фибробластом куриного зародыша. Фибробласт движется по слою силиконовой резины. Ширина клетки составляет примерно 80 мкм. (Из Harris, 1984; фотография с любезного разрешения A. K. Harris.)

рование вызывает миграцию мезенхимных клеток в плавнике рыбы. Содержащие коллаген фибриллы в основании развивающегося грудного плавника у зародышей костистых рыб образуют субстрат, обеспечивающий преимущественное направление движения мезенхимных клеток из туловища в область плавника (Wood, Thorogood, 1987).

Контактное ингибирование движения

Рассмотренные выше механизмы миграции клеток на относительно дальние расстояния следует дополнить локальными явлениями, которые также вносят определенный вклад в направленную миграцию. Клетки движутся посредством вытягивания тонкого отростка – **ламеллоподии**. Когда ламеллоподия одной мигрирующей клетки контактирует с поверхностью другой клетки, наблюдается паралич этой ламеллоподии и ее исчезновение. Такое явление называется **контактным ингибированием движения** (рис. 15.11). В данном случае новая ламеллоподобия образуется где-либо в другом месте клетки, уводя ее от соседней (Abercrombie, Ambrose, 1958). В итоге происходит миграция подвижных клеток от центральной массы. (Это явление прежде всего характерно для мезенхимных клеток и не свойственно клеткам, объединенным в эпителиальный слой, если только не обнажена свободная граница эпителия.)

Контактное ингибирование может служить стимулом для миграции клеток нервного гребня (Rosavio et al., 1983); процесс этот имеет место и при заживлении ран. Если удалить эпидермальные клетки с хвостов головастиков *Xenopus*, то подстилающие базальные клетки по краям раны в течение 5–10 секунд формируют ламеллоподии. С помощью этих ламеллоподий клетки перемещаются по базальной мембране, покрывая площадь раны. Прикасаясь друг к другу, противолежащие ламеллоподии слегка пересекаются, слипаются и перестают двигаться (Radice, 1980).

Термодинамическая модель клеточных взаимодействий

Приведенные выше модели объясняют ряд существенных черт морфогенеза, но они не позволяют объяснить явление рассортировки, обнаруженное Таунсом и Гольтфретером. В 1964 г. Малколм Стейнберг предложил модель, объясняющую направления клеточной рассортировки на основе принципов термодинамики. В опытах на клетках трипсинизированных эмбриональных тканей Стейнберг показал, что клетки определенных типов в комбинациях с одними клетками всегда мигрируют к центру, а с другими – к периферии. Более того, эти взаимо-

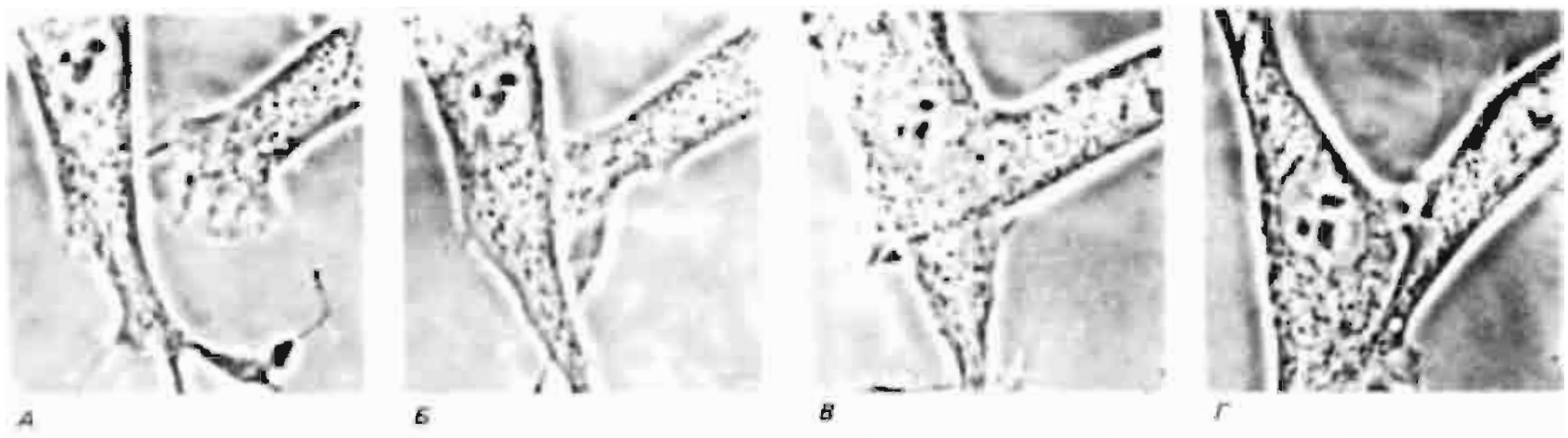


Рис. 15.11. Контактное ингибирование. Ламеллоподия одного фибробласта приближается (*А*) и контактирует (*Б*) с мембраной другого фибробласта. Во время этого контакта клетка с гофрированной мембраной проходит под другой клеткой (*В*) и затем от нее удаляется (*Г*). (Из Erickson, 1978; фотография с любезного разрешения C. A. Erickson.)

действия образуют коммутативную иерархию (Steinberg, 1970). Если положение одного клеточного типа А является внутренним по отношению к другому клеточному типу Б, а Б служит внутренним по отношению к третьему клеточному типу В, то А всегда будет внутренним по отношению к В (рис. 15.12). Это наблюдение привело Стейнберга к мысли о том, что смешанные клетки взаимодействуют таким образом, что формируется агрегат с наименьшей свободной энергией поверхности (рис. 15.13). Иными словами, в результате клеточной перестройки достигается наиболее стабильная в термодинамическом отношении организация. Если клеточные типы А и В обладают различной силой адгезии и если сила связей А–А больше А–В или В–В, то произойдет рассортировка, в результате которой клетки А займут центральное положение. Если же сила связей А–А меньше или равна силе связей А–В, то клетки в агрегате останутся беспорядочно перемешанными. И наконец, если сила сцепления А–А намного больше силы сцепления А–В, другими словами, если адгезия между клетками А и В практически отсутствует, то клетки А и В сформируют раздельные агрегаты.

Все, что необходимо для рассортировки клеток,–это разная сила их адгезии. В простейшем случае на поверхности всех клеток может быть один и тот же сорт «клея». Количество этого продукта клеточной поверхности или клеточная архитектура, обусловливающая различную концентрацию этого вещества, может стать достаточным условием для установления разного количества устойчивых контактов между клетками разных типов. Вместе с тем причиной термодинамических различий могут быть разные типы адгезионных молекул. Эта термодинамическая модель названа **гипотезой дифференциальной адгезии**. В соответствии с этой гипотезой считается, что ранний зародыш находится в состоянии равновесия, пока какое-либо изменение активности генов не приведет к изменению поверхностных молекул. Тогда происходят перемещения клеток с целью поиска и установления новой равновесной конфигурации.

Данные в пользу термодинамической модели, полученные in vivo

До недавнего времени не удавалось поставить эксперимент по проверке термодинамической моде-

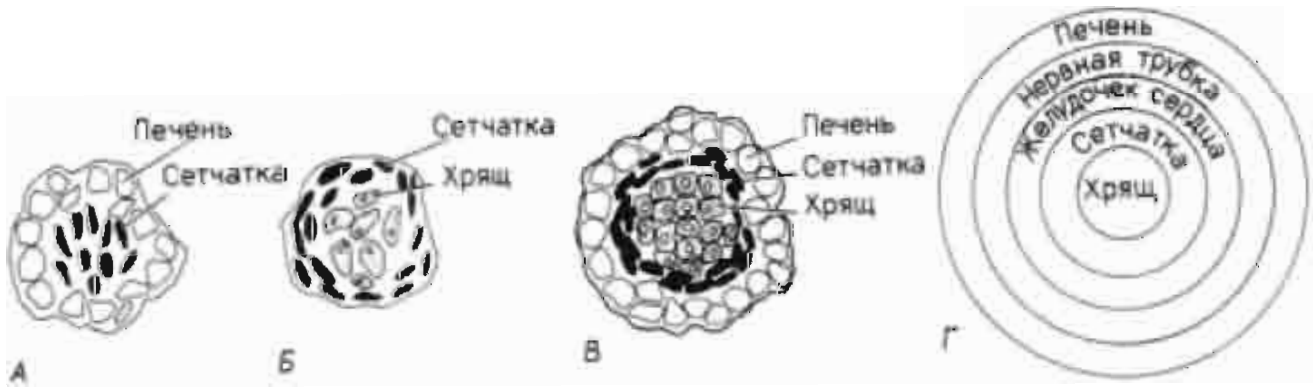


Рис. 15.12. Коммутационная иерархия рассортировки у ранних куриных зародышей. Клетки, обладающие способностью к слипанию в наибольшей степени, занимают в смешанном агрегате центральное положение *А*. Пигментированные клетки сетчатки отсортировываются от клеток печени к центру, но в случае смешивания с клетками хряща занимают периферическое положение (*Б*). *В*. Если смешаны клетки всех трех типов, то клетки сетчатки образуют слой между центрально расположенными хрящевыми клетками и периферическими клетками печени. *Г*. Относительное положение, занимаемое в агрегатах клетками пяти различных типов. (Из Steinberg, 1964.)

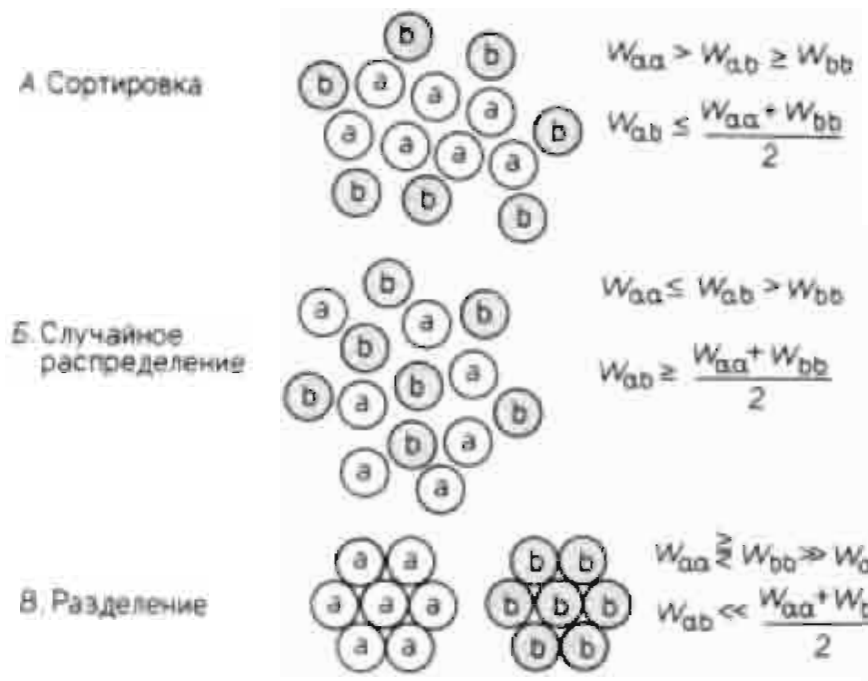


Рис. 15.13. Рассортировка – процесс, стремящийся к максимальной термодинамической устойчивости. *А*. Рассортировка происходит в том случае, когда средняя сила адгезии между клетками разных типов (w_{ab}) меньше среднего значения гомотипических (a – a или b – b) адгезивных сил (w_{aa}, w_{bb}). Клетки, обладающие большей адгезивной способностью, занимают центральное положение. *Б*. Если сила адгезии a – b больше или равна среднему гомотипических адгезий, то рассортировки не будет, так как система уже достигла термодинамического равновесия, и смесь клеток будет носить случайный характер. *В*. Если связи a – b намного слабее, чем среднее гомотипических адгезий, то произойдет полное разделение клеток разных типов. (Это наблюдается, например, в случае смешивания масла и воды.) (По Steinberg, 1982.)

ли клеточной миграции in vivo, однако теперь данные в поддержку этой гипотезы удалось получить в опытах по изучению регенерации конечностей у бесхвостых амфибий. Регенерация конечностей этих животных (подробно этот процесс будет описан в гл. 17) характеризуется рядом примечательных особенностей. Если переднюю конечность ампутировать на уровне *плеча*, то на конце оставшейся культи формируется масса дедифференцированных клеток (регенерационная бластема), которые делятся, дифференцируются и формируют новую конечность. Дифференцировка новых тканей начинается в месте ампутации, образуя в этом случае недостающую часть от уровня плеча в дистальном направлении. Если передняя конечность удалена на уровне *запястья*, то формируется аналогичная регенерационная бластема. Однако она не образует тканей плеча и предплечья – скорее, она «знает» свое место и регенерирует только запястье и пальцы.

Каким образом хранится эта «позиционная память?» Нарди и Стокум (Nardi, Stocum, 1983) показали, что если совместить две бластемы конечностей хвостатой амфибии с одного уровня ампутации, то они сольются, но ни одна из тканей не будет окружать другую (рис. 15.14). Однако если бластемы взяты с разных уровней, то более проксимальная (та, что ближе к телу) бластема окружит более дистальную. Эти факты свидетельствуют о том, что адгезивные свойства клеток образуют градиент вдоль проксимодистальной оси, будучи в большей степени представлены в запястье и в меньшей – в области плеча.

Исследователям (Crowford, Stocum, 1988) удалось связать эти процессы рассортировки клеток, наблюдаемые вне организма, с процессами в живой регенерирующей конечности. Бластемы из области запястья, предплечья или плеча пересаживали на границу бластема – культя задней конечности, ампутированной на уровне середины бедра. Бластемы передней конечности мигрировали дистально на соответствующий уровень задней конечности хозяина и затем регенерировали новые структуры (рис. 15.15). Бластема *плеча* регенерировала полную переднюю конечность непосредственно от уровня середины бедра. Бластема *предплечья* перемещалась на уровень голени и здесь образовывала недостающую часть передней конечности в дистальном направлении; бластема *запястья* смещалась к концу регенерирующей задней конечности, где рядом с предплюсной формировала запястье. Эти данные позволяют считать, что иерархия клеточной рассортировки, наблюдаемая вне организма, отражает существующие в организме различия, которые позволяют ему создавать новые органы.

Изменения в строении клеточной поверхности

Строение клеточной мембраны

Формирование тканей и органов обусловлено событиями, происходящими на клеточной поверхности соседних клеток. Клеточная поверхность включает: плазматическую мембрану клетки, молекулы, расположенные непосредственно под ней и с ней связанные, и молекулы, находящиеся во внеклеточном пространстве. Эукариотические клетки окружены сложным молекулярным пограничным слоем, называемым плазматической (или клеточной) мембраной. Современные представления о строении этой мембраны укладываются в **жидкостно-мозаичную модель**, изображенную на рис. 15.16 (Singer, Nicolson, 1972). Основу мембраны составляют два слоя фосфолипидов, полярные концы которых ориентированы в сторону водных растворов с каждой стороны фосфолипидной среды. Некоторые белки про-

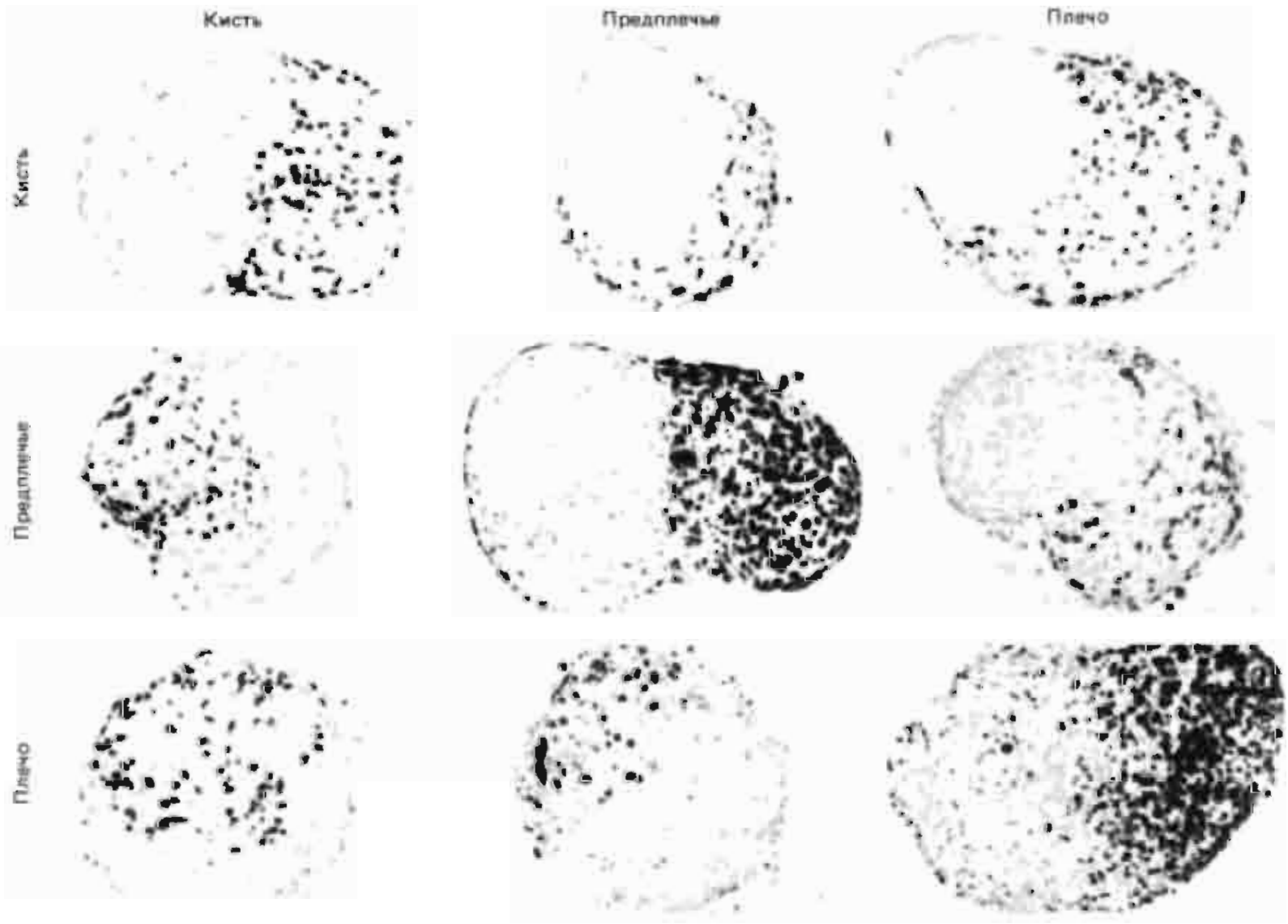


Рис. 15.14. Рассортировка бластем передних конечностей с одного и того же и с разных уровней ампутации, совмещенных в условиях культуры. Наиболее дистальной из анализируемых структур служит запястье, наиболее проксимальной – плечо. В каждой комбинации один из членов мечен тритием. Через 3 сут культивирования агрегаты были зафиксированы, и из них приготовлены срезы. Результаты изучения гистологических препаратов показали, что граница слияния бластем, полученных на одном и том же уровне ампутации, имеет вид прямой линии, тогда как при слиянии бластем с разных уровней проксимальная бластема имеет тенденцию окружать более дистальные клетки. (Из Nardi, Stocum, 1983; фотографии с любезного разрешения D. Stocum.)

низывают мембрану насквозь, тогда как другие лишь частично погружены в фосфолипидный бислой. Распределение белков обусловливает «мозаичность» мембраны. Способность белков перемещаться в плоскости фосфолипидного матрикса служит свидетельством ее «жидкостной» природы. Многие мембраны содержат также достаточно большие количества углеводов. Эти сложные сахара присоединены к липидам и белкам на наружной поверхности мембраны.

Данные о мозаичном распределении белков в фосфолипидном матриксе были получены с помощью разных методик, но главная из них – методика **замораживания–скалывания** (рис. 15.17, *А*). Суть ее заключается в том, что замороженная мембрана расщепляется таким образом, что ее липидные слои отделяются друг от друга. Поверхность скола (рис. 15.17, *Б*) дает возможность судить о мозаичной природе распределения белков. Жидкостная природа мембраны была убедительно продемонстрирована в опытах по слиянию соматических клеток с использованием клеток мыши и человека (Frye, Edidin, 1970). С этой целью клетки человека инъецировали кролику, получая таким образом антитела к их белкам; аналогичным способом были получены специфические антитела к белкам мышиных клеток. Затем, применяя флуоресцентный краситель, получали флуоресцирующие антитела против белков мыши, дающие зеленое свечение в ультрафиолетовом свете; антитела против человеческих белков окрашивали родамином, дающим красное свечение. Таким образом, белки клеток обоих типов оказались мечеными – человеческие стали красными, а мышиные – зелеными. После слияния клеток и маркирования их мечеными антителами мышиные и человеческие белки сначала

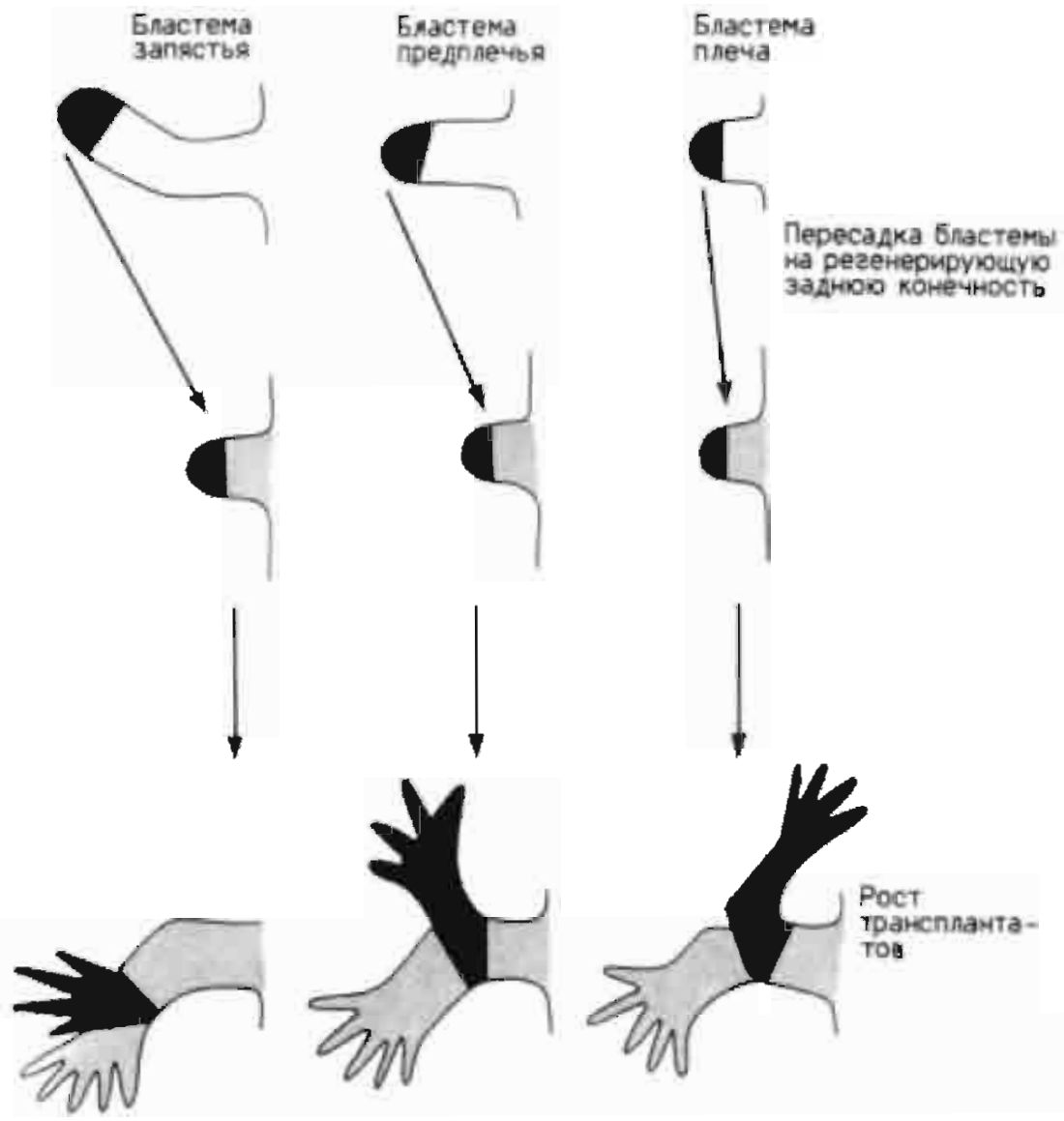


Рис. 15.15. Рассортировка in vivo («аффинофорез») демонстрируется экспериментом, в котором регенерационная бластема передней конечности (черная), пересаженная на бластему середины бедра (серая), смещается в соответствующую область регенерирующей задней конечности (т. е. плечо к середине бедра, предплечье – к голени, запястье – к лапке) и здесь инициирует регенерацию передней конечности в дистальном направлении. (По Stocum, 1986.)

можно было обнаружить в разных половинах гибридной клетки (рис. 15.18). Когда, однако, обработали такие клетки мечеными антителами, через час после слияния белки оказались полностью перемешанными. Поскольку ингибиторы синтеза белков не блокируют этого смешивания, синтез новых белков можно исключить. Следовательно, белки могут перемещаться по жидкому матриксу. Текучесть липидного бислоя дает также возможность новым липидным и белковым компонентам внедряться в уже существующую мембрану.

Диффузия белков в мембране служит примером пассивной диффузии и не требует затраты энергии клеткой. Специфические белки, однако, могут быть вынуждены перемещаться определенным образом. Если антитела, полученные к специфическим мембранным белкам, добавить к содержащим эти белки клеткам в избытке, то белки перераспределяются, образуя сначала пятна, а затем «колпачки» ("caps") на одном из концов клетки (рис. 15.19). Этот процесс, называемый кэппингом, зависит от энергии и от системы микротрубочек и микрофиламентов клетки (Edelman, 1976; Nicolson, 1976). Он наблюдается в нормальных клетках при перемещении специфических молекул в определенную область мембраны. Его можно наблюдать также при поляризации бластомеров млекопитающих перед компактизацией (гл. 3).

Мы располагаем данными о том, что микрофиламенты и микротрубочки находятся в контакте с плазматической мембраной и контролируют движение мембранных белков. Например, в процессе фагоцитоза количество клеточных мембранных ферментов не уменьшается: несмотря на включение мембраны в клетку (интернализацию), ферменты остаются снаружи. Следовательно, клетка каким-то образом запрещает белкам помещаться в том участке мембраны, который подлежит интернализации. Если же фагоцитоз частиц происходит в присутствии ингибитора образования микротрубочек колхицина, то количество ферментов на поверхности клеток уменьшается (Ukena, Berlin, 1972). Эти данные свидетельствуют о том, что взаимодействия цитоскелета и мембраны контролируют положение некоторых мембранных белков.

Актиновые микрофиламенты также, по-видимому, связаны с белками плазматической мембраны (рис. 15.16, *B*). При обработке клеток цитохалазином B, разрушающим микрофиламенты, кэппинг подавляется (DePetris, 1974). Наличие микрофиламентов – это типичный признак цитоплазмы на границе с клеточной мембраной; иногда микрофила-

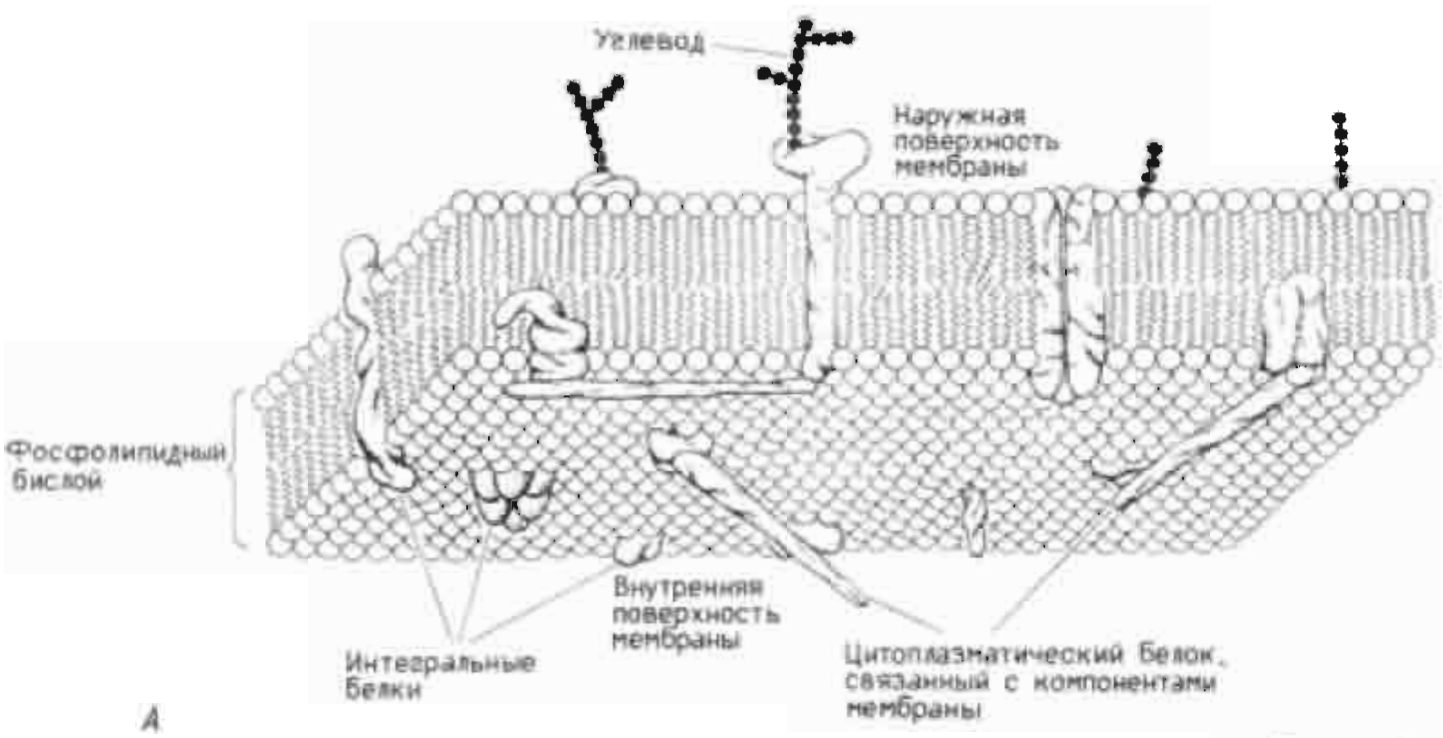
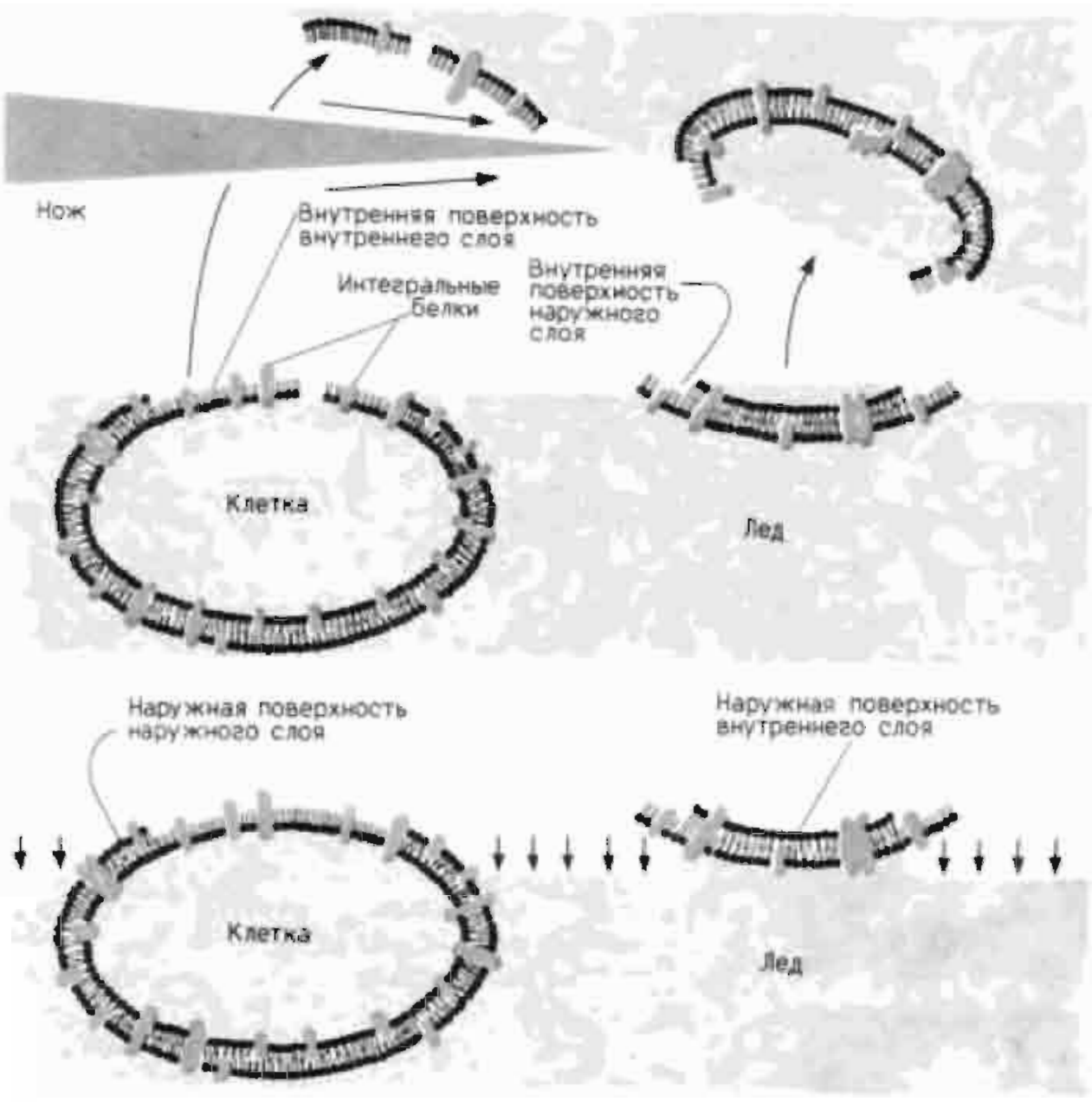


Рис. 15.16. Строение клеточной поверхности. *А*. Жидкостно-мозаичная модель строения клеточной мембраны. *Б*. Подлежащий цитоскелет. Сократительные волокна, представленные актиновыми микрофиламентами и тубулиновыми микротрубочками, связаны друг с другом и с клеточной мембраной. Интегральные гликопротеины мембраны могут быть связаны и с внеклеточными белками, и с внутренними волокнами. *В*. На фотографии, полученной с помощью сканирующего электронного микроскопа (использован метод замораживания–скалывания) выявляются детали строения поверхности клетки тонкой кишки. Актин, входящий в микроворсинки, сразу под клеточной мембраной соединяется толстыми и тонкими филаментами. (*В* – из Hirokawa et al., 1983; с любезного разрешения N. Hirokawa.)



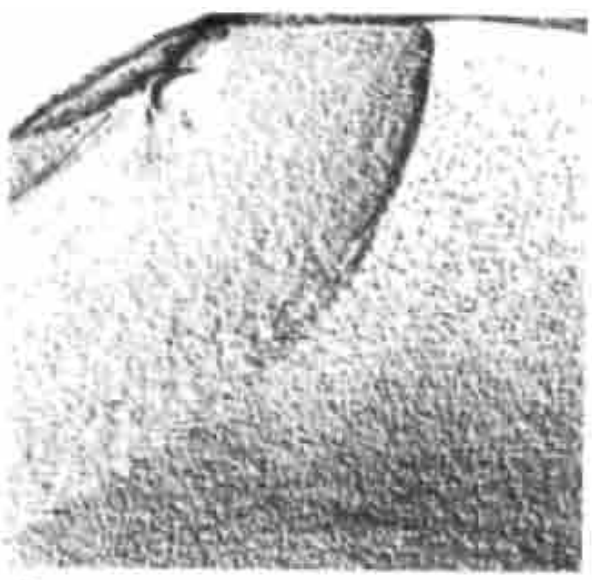

Б

Рис. 15.17. Метод замораживания – скалывания. *А*. Схематически представлена плоскость скола, расщепляющего мембрану на два слоя. *Б*. Электронная микрофотография внутренней поверхности мембраны эритроцита после замораживания – скалывания, позволяющая видеть множество связанных с мембраной частиц. (Фотография с любезного разрешения D. Branton.)

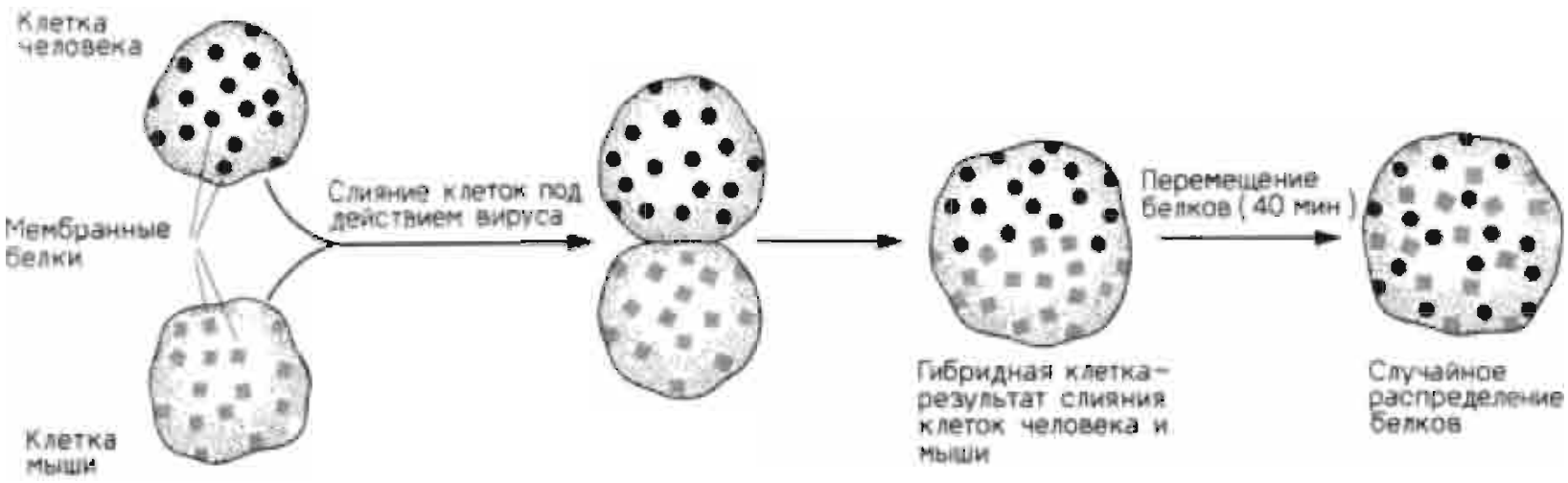


Рис. 15.18. Латеральная подвижность мембранных белков, демонстрируемая в эксперименте по слиянию клеток.

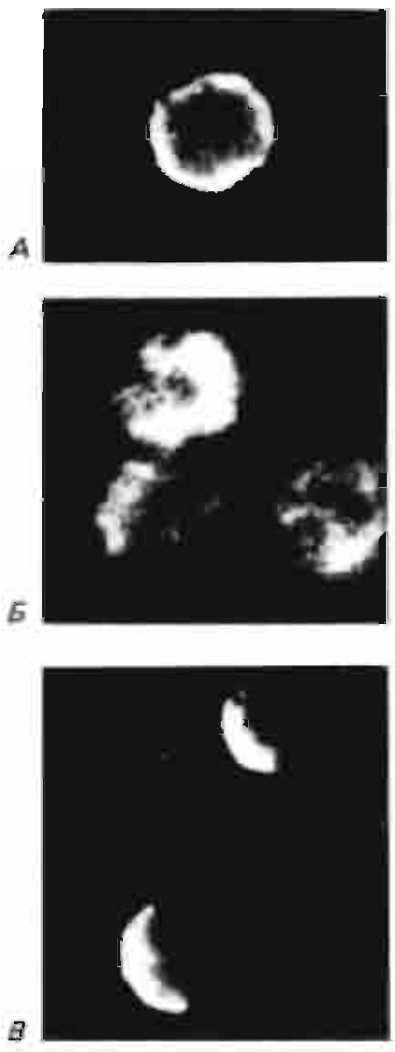


Рис. 15.19. Специфическое перемещение белков клеточной мембраны. Связывание антител со специфическими молекулами клеточной поверхности, равномерно распределенными в клеточной мембране (*А*), вызывает объединение последних в кластеры, образующие дискретные пятна (*Б*), перемещающиеся к одному полюсу (*В*). На этих фотографиях молекулы клеточной поверхности выявляются благодаря тому, что связавшиеся с ними антитела окрашены флуоресцентным красителем. (Фотография с любезного разрешения G. M. Edelman.)

менты непосредственно связаны с самой мембраной (рис. 15.20). Микрофиламенты играют важную роль и в движении клеток. В этом случае актиновые микрофиламенты связываются с миозином, α-актином и тропомиозином, образуя сократимую сеть, сходную с аналогичной структурой в мышцах. Предполагается, что эта сократимая сеть заякорена в мембране при помощи белка **талина**, соединяющего микрофиламенты с белком клеточной мембраны. У большинства клеток позвоночных эта сеть обеспечивает механизм удлинения и миграции клетки.

Клеточная мембрана содержит также белки, способные взаимодействовать с внешней средой. Некоторые белки имеют активные участки, направленные наружу, к другим клеткам. Наиболее известные белки этого типа – **транспортные белки**, облегчающие движение ионов и питательных веществ в клетку, и **рецепторные белки**, связывающие гормоны и лекарственные препараты. Кроме того, есть еще три класса молекул клеточной мембраны (обычно это белки), специально участвующие в обеспечении специфических взаимодействий с другими клетками (Edelman, Thiery, 1985).

1. *Молекулы клеточной адгезии.* Эти белки участвуют в адгезии клетка–клетка. Они могут объединять клетки в эпителиальные слои и конденсировать мезенхимные клетки.
2. *Молекулы адгезии клеток к субстрату.* Эти молекулы участвуют в связывании клеток с их внеклеточными субстратами. К их числу относятся компоненты внеклеточного матрикса и рецепторы для этих молекул на поверхности клеток. Молекулы адгезии к субстрату обусловливают движение мезенхимных клеток и пространственное разделение эпителиальных слоев.
3. *Молекулы клеточных контактов.* Эти молекулы обеспечивают пути, посредством которых

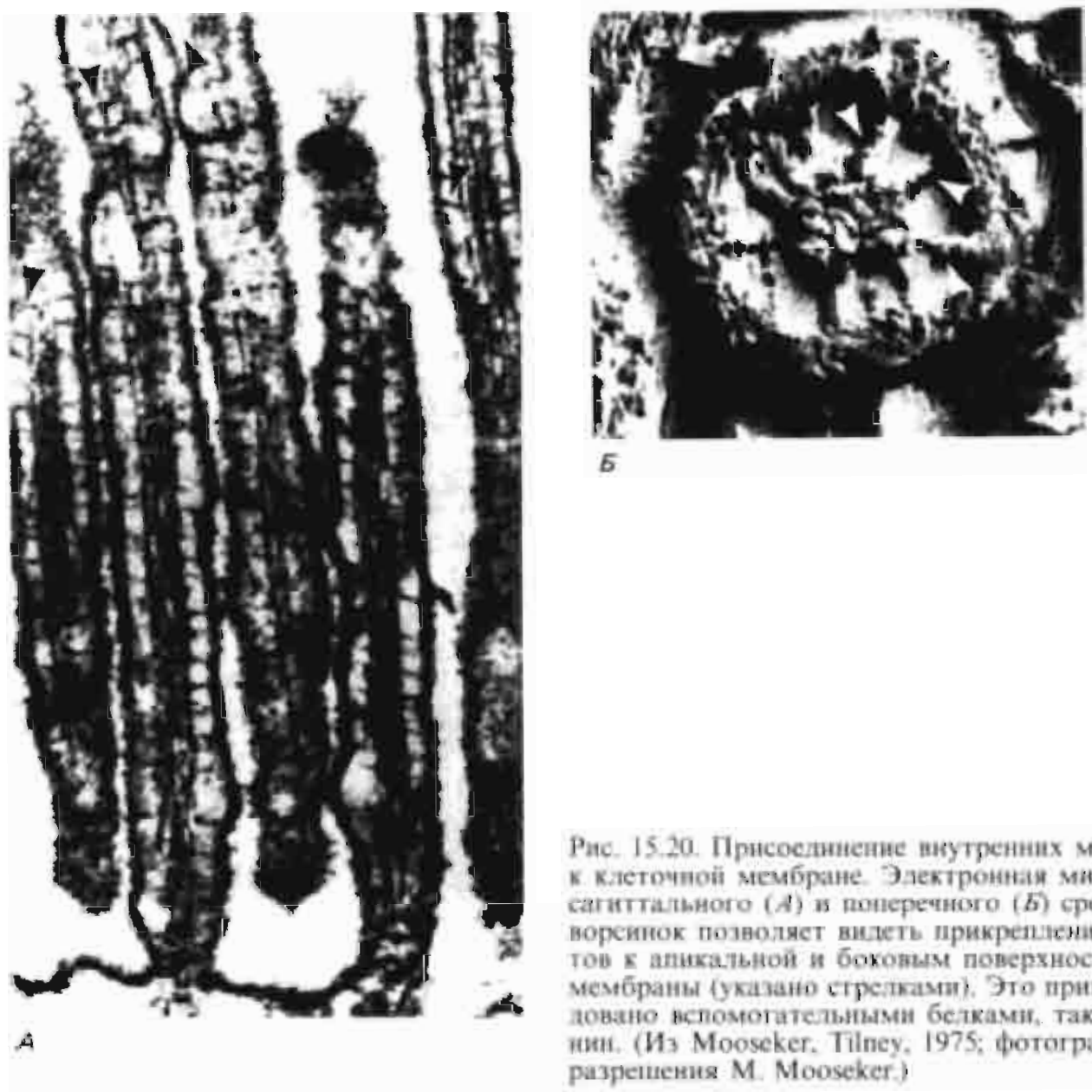


Рис. 15.20. Присоединение внутренних микрофиламентов к клеточной мембране. Электронная микрофотография сагиттального (*А*) и поперечного (*Б*) срезов кишечных ворсинок позволяет видеть прикрепление микрофиламентов к апикальной и боковым поверхностям клеточной мембраны (указано стрелками). Это прикрепление опосредовано вспомогательными белками, такими, как α-актинин. (Из Mooseker, Tilney, 1975; фотографии с любезного разрешения M. Mooseker.)

цитоплазма соседних клеток может сообщаться (т. е. их коммуникацию), а также обеспечивают непроницаемость и сообщают механическую прочность эпителиальным слоям.

Предполагается, что экспрессия этих молекул клеточной поверхности опосредует связь между одномерным генетическим кодом и трехмерным организмом. Модулируя появление этих молекул, геном таким образом детерминирует процесс морфогенеза.

Изменения клеточной мембраны в процессе развития

Экспрессия различных компонентов мембраны изменяется во времени и пространстве. Клетки разных типов характеризуются различными компонентами клеточной поверхности, к тому же последние изменяются по мере развития клеток. Эти тканеспецифические мембранные компоненты часто выявляются с помощью антисывороток, поэтому их называют **антигенами дифференцировки** (Boyse, Old, 1969).

Специфические антигены дифференцировки можно идентифицировать в настоящее время с помощью **моноклональных антител** (рис. 15.21). Эти антитела получают путем инъекции чужеродных клеток мышам (или клеток мыши одной линии мышам другой линии). Мышиные В-лимфоциты будут продуцировать антитела против любого чужеродного компонента этих клеток, причем каждый В-лимфоцит синтезирует антитела только одного типа. Эти лимфоциты были сделаны «бессмертными» путем слияния их со злокачественными В-лимфоцитами (клетками миеломы), которые мутировали таким образом, что 1) перестали синтезировать собственные антитела и 2) утратили фермент гипоксантин-фосфорибозилтрансферазу (ГФРТ), участвующий в обмене пуринов. Последнее изменение означает, что клетки миеломы способны лишь синтезировать пуриновые нуклеотиды de novo и не способны использовать пурины, содержащиеся в культуральной среде. После слияния клетки выращивают в среде с добавлением аминоптерина – вещества, ингибирующего синтез пуринов de novo. В результате неслившиеся клетки миеломы гибнут из-за пуринового голодания: они не могут получать пуриновые нуклеотиды с помощью синтеза, опосре-

дованного ГФРТ, а их синтез ингибирован аминоптерином. Нормальные В-лимфоциты в культуре не делятся, поэтому они также погибают. Продукт слияния В-лимфоцита и миеломной клетки – **гибридома** – пролиферирует, получая ГФРТ от В-лимфоцита и способность к росту от злокачественной клетки. Кроме того, каждая из этих гибридом секретирует специфические антитела В-лимфоцита. Затем среду, в которой растут гибридомы, тестируют на антитела, способные связываться с исходной популяцией клеток. Такие антитела, первичным источником которых является единственный В-лимфоцит, называются моноклональными антителами. Моноклональные антитела можно получать в неограниченных количествах и с их помощью узнавать антигены (белки, липиды или углеводы), экспрессированные в малых дозах (Köhler, Milstein, 1975).

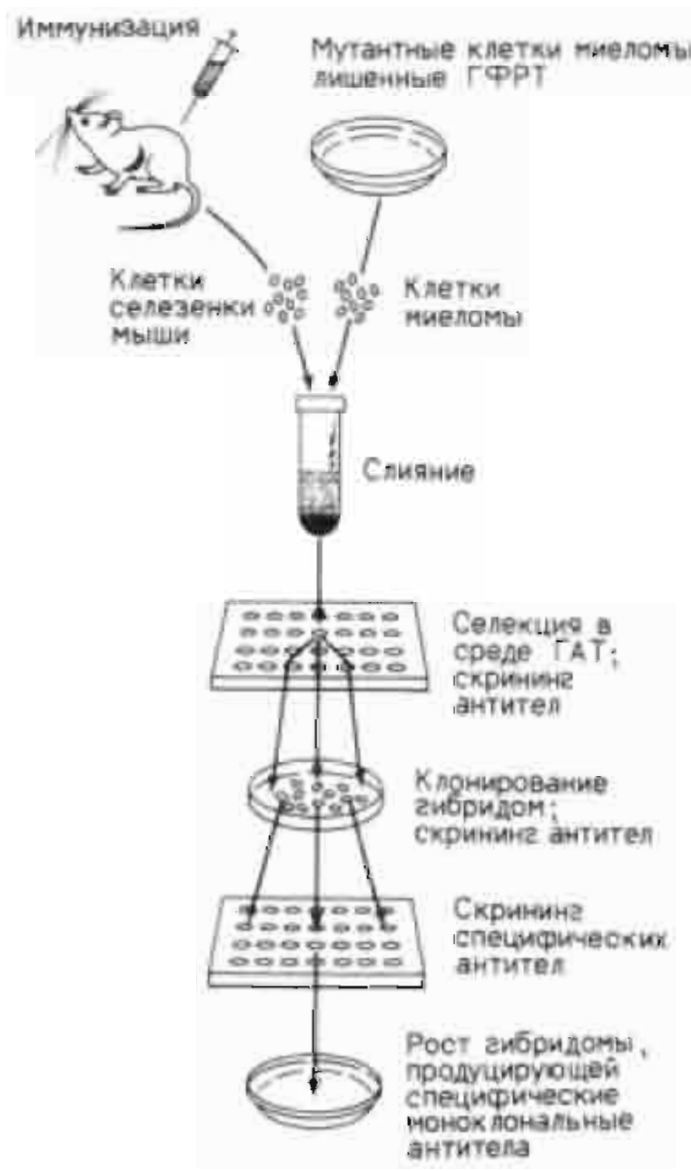


Рис. 15.21. Протокол получения моноклональных антител. Клетки селезенки иммунизированной мыши сливаются с мутантными клетками миеломы, лишенными фермента ГФРТ. Клетки выращиваются в среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин, тимидин (ГАТ). Несливавшиеся клетки миеломы в этой среде расти не могут, так как аминоптерин блокирует единственный путь, посредством которого они могут синтезировать пуриновые нуклеотиды. В-клетки при культивировании погибают, несмотря на то что содержат фермент (ГФРТ), позволяющий им использовать гипоксантин, содержащийся в среде. Растут и делятся только слившиеся клетки (гибридомы). Лунки, в которых растут гибридомы, проверяются на наличие эффективных антител; из «положительных» лунок клетки высевают при плотности, достаточно низкой для того, чтобы индивидуальные клетки могли дать отдельные клоны. Полученные клоны выделяют и снова производят скрининг на эффективные антитела. Такие антитела будут моноклональными. Гибридому, продуцирующую эти антитела, можно вырастить и заморозить. (По Yelton, Scharff, 1980.)

Моноклональные антитела против специфических клеточных типов позволили обнаружить многочисленные антигены дифференцировки, появляющиеся в процессе развития в разных местах и в различное время. На рис. 15.22 представлены различные молекулы клеточной поверхности в *пространственно* разграниченных слоях нейральной сетчатки только что вылупившегося цыпленка. Каждое из моноклональных антител узнает разные молекулы клеточной мембраны. Как видно из этой скомпонованной фотографии, мембраны всех клеток нейральной сетчатки не одинаковы. Фактически различаться могут даже разные участки мембраны одной и той же клетки: так, мембрана аксона и мембрана тела нейрона содержат разные молекулы. На рис. 15.23 показаны *временные* изменения клеточной мембраны одной эпителиальной клетки дрозофилы по мере того, как эта клетка превращается в фоторецептор сетчатки. Моноклональные антитела были получены после инъекции мыши гомогената тканей головы дрозофилы, а затем набор антител был тестирован на клетках имагинального диска глаза личинки третьего возраста; этот диск дифференцируется в структуры глаза. Как только недифференцированные эпителиальные клетки диска приобретали свойства нейрона, они экспрессировали антиген 22C10. Этот антиген был обнаружен и на других типах нервных клеток. Однако вскоре клетка начинала экспрессировать другую молекулу клеточной мембраны – антиген 24B10. Эта молекула появлялась только у тех нейронов, которые давали начало фоторецепторам. На более поздних стадиях (спустя примерно 80 ч) на некоторых областях созревающих фоторецепторов появлялся антиген 21A6 и затем другой антиген, 28H9, характерный для окончательно дифференцированных фоторецепторов сетчатки (Zipursky et al., 1984).

Таким образом, поверхностные мембраны клеток различных типов содержат разные молекулы, и эти молекулы могут меняться по мере созревания данной клетки.

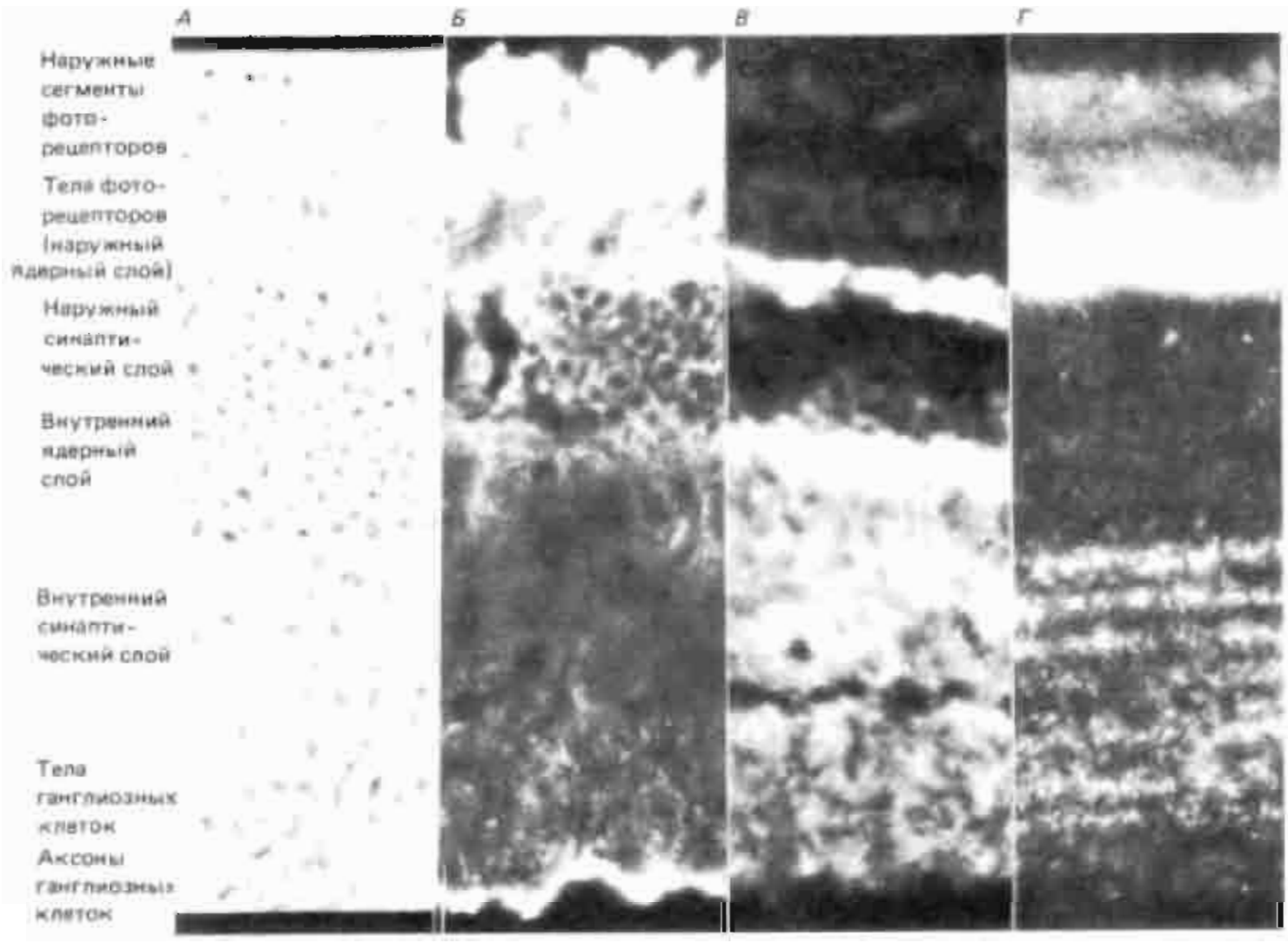


Рис. 15.22. Специфичность клеточной поверхности нейральной сетчатки цыпленка. *А*. Фазово-контрастная фотография среза нейральной сетчатки только что вылупившегося цыпленка. *Б*. Срез сетчатки, окрашенный флуоресцирующими моноклональными антителами, узнающими клетки сетчатки (но не другие нервные клетки). *В*. Срез сетчатки, окрашенный флуоресцирующими моноклональными антителами, узнающими нервные (но не глиальные) клетки сетчатки. *Г*. Срез сетчатки, окрашенный флуоресцирующими моноклональными антителами, узнающими антигены на фоторецепторах и телах ганглиозных клеток. (Фотографии с любезного разрешения G. Grunwald.)

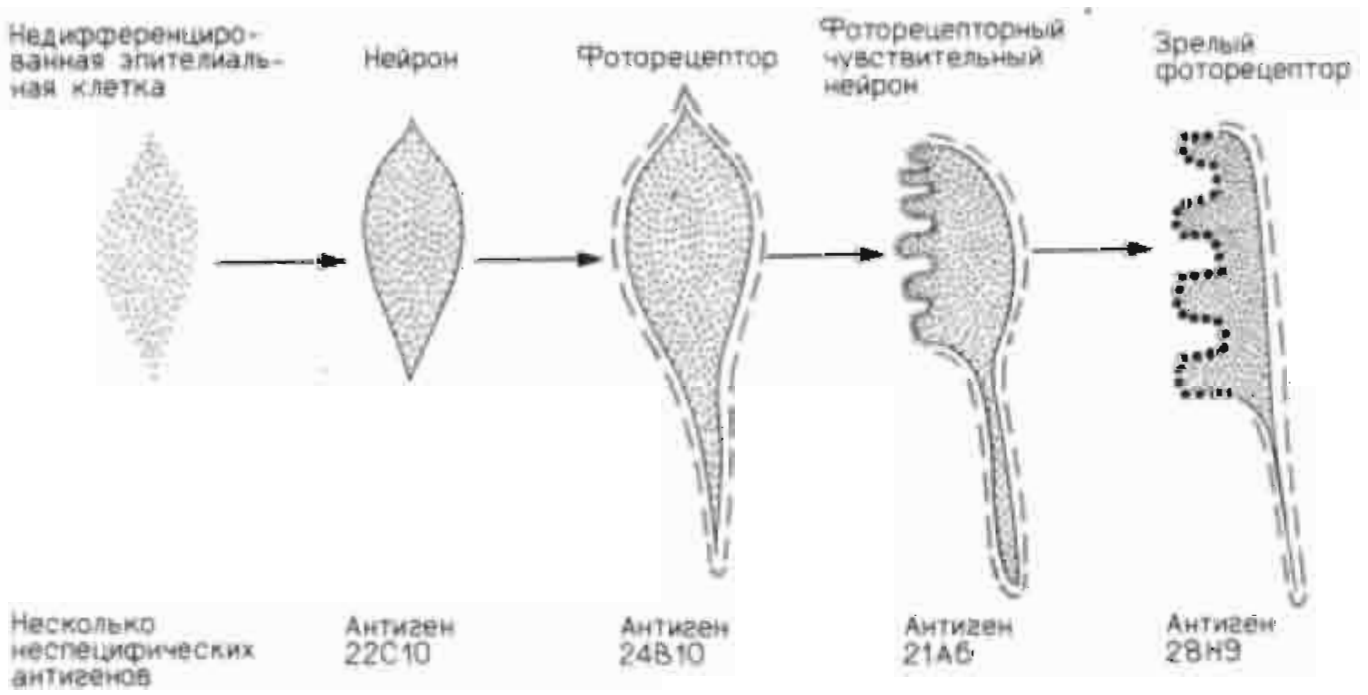


Рис. 15.23. Временные изменения клеточной мембраны, коррелированные с морфогенезом фоторецепторных клеток сетчатки. По мере дифференцировки фоторецепторов на их клеточной мембране экспрессируются различные антигены. (По Venkatesh et al., 1985.)

Дополнительные сведения и гипотезы

От белка к гену

Поскольку антигенами дифференцировки часто служат белки, экспрессия которых регулируется в пространстве и во времени, и поскольку эти изменения часто коррелируют со специфическими морфологическими переходами (что иллюстрирует рис. 15.23), было бы интересно знать, каким образом регулируется активность их генов. Например, если бы нам было известно, как экспрессируется белок 24B10, то это послужило бы ключом к разгадке генетического механизма дивергенции нейронов. Каким образом можно проследить эту «обратную генетику» – от белка к гену?

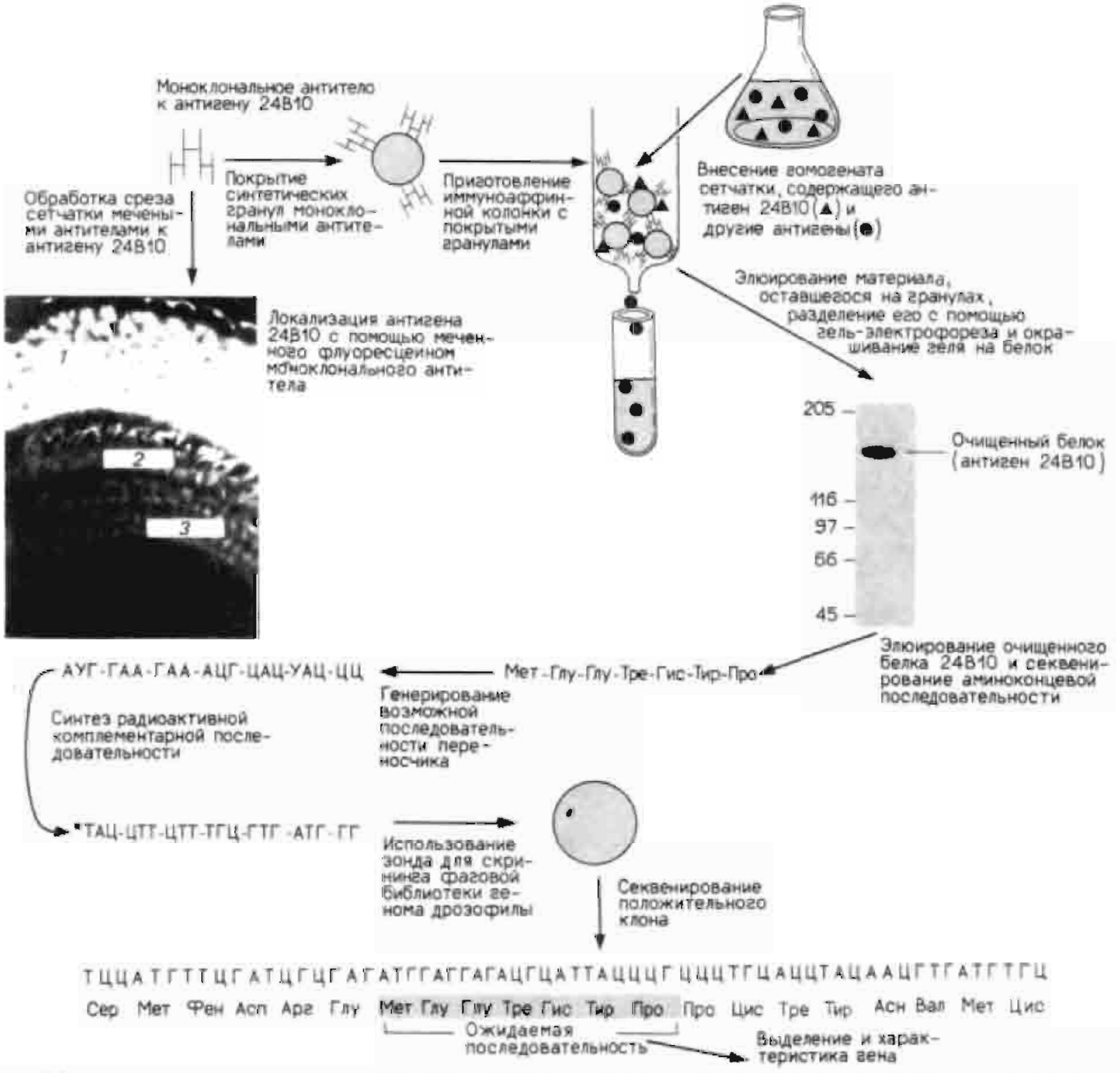


Рис. 15.24. Протокол опыта по выявлению гена, кодирующего белок, идентифицированный моноклональными антителами. Объяснения см. в тексте. *1* – сетчатка; *2* – базальная пластинка; *3* – мозг. (По Venkatesh et al., 1985; фотография с любезного разрешения S. Benzer.)

Для начала моноклональные антитела связывают с гранулами сорбента и гомогенаты сетчатки пропускают через колонку этого материала (рис. 15.24). (Она называется иммуноаффинной колонкой.) Антитела связываются только с теми антигенами, которые они узнавали изначально; затем связанный с гранулами белок элюируют с гранул (используя ионные растворы) и очищают от любых возможных примесей с помощью гельэлектрофореза. Область геля, содержащую этот белок, вырезают, белок элюируют с гелевого матрикса и частично секвенируют. Затем синтезируют радиоактивные олигонуклеотиды, которые связались бы с последовательностью ДНК, способной кодировать данный белок. В случае белка 24B10 их использовали для скрининга библиотеки клонов рекомбинантной ДНК, содержащих области генома дрозофилы. ДНК положительного клона секвенировали, чтобы убедиться в ее соответствии последовательности исходного белка, выделенного с помощью моноклональных антител. Таким образом можно пройти путь от редкого белка, идентифицированного моноклональным антителом, до специфического участка геномной ДНК (Zipursky et al., 1984; Venkatesh et al., 1985).

Регуляция антигенов дифференцировки – важнейшая проблема экспериментальной эмбриологии, поскольку эти молекулы, возможно, играют определяющую роль в морфогенезе. Кроме того, нарушения в регуляции таких антигенов могут иметь тяжелые последствия у взрослых. Известна серия заболеваний, называемых **паранеопластическими синдромами**; эти нарушения у взрослых иногда развиваются наряду со злокачественными новообразованиями, но, по-видимому, не вызываются непосредственно опухолью. Например, у некоторых больных с мелкоклеточной карциномой легкого развивается дегенерация сетчатки, ведущая к слепоте. Каким образом опухоль в легком может вызвать заболевание глаз? Данные, касающиеся возможного механизма этого паранеопластического синдрома приводятся в работе Грюнвальда и др. (Grunwald et al., 1985, 1987); эти авторы показали, что особый тип опухолевых клеток содержит антигены дифференцировки, обычно экспрессируемые клетками сетчатки. Иммунная система производит антитела к этому опухолевому белку (который воспринимается организмом как «чужой» из-за того, что иммунная система нормального организма не контактирует с клетками центральной нервной системы в пределах гемато-энцефалического барьера) и циркулирующие антитела разрушают клетки сетчатки. В результате нарушение регуляции антигена дифференцировки в опухолевых клетках может вызвать деструкцию той ткани, которая обычно его экспрессирует.

Молекулы клеточной адгезии

Идентификация молекул клеточной адгезии

Исследования по реагрегации клеток в лабораториях Гольтфретера и Стейнберга не привели к идентификации молекул, вовлеченных в процессы дифференциальной клеточной адгезии. Рот (Roth, 1968; Roth et al., 1971a) показал, что клетки различных типов содержат разные адгезионные молекулы. Он модифицировал методику ротационной агрегации, инкубируя меченные ^{3}H хрящевые клетки и меченные ^{14}C гепатоциты в растворе, содержащем маленькие агрегаты немеченых хрящевых клеток. Измерив радиоактивность ^{14}C- и ^{3}H-меченных клеток в этих агрегатах, он обнаружил, что хрящевые агрегаты специфически захватывают клетки хряща. Подобные эксперименты, в которых выявилась такая же закономерность, были проведены также на печеночных и мышечных клетках (рис. 15.25). Таким образом, очевидно, что адгезию клеток обусловливают специфические для каждого типа клеток молекулы.

Следующий шаг – это идентификация молекул, обусловливающих клеточную адгезию, чтобы понять, каким образом такая адгезия осуществляется. Было использовано два методических подхода. Первый состоял в поисках антител, с помощью которых можно было бы обнаружить и идентифицировать адгезионные молекулы, а в основу второго легло наблюдение, свидетельствующее о том, что для адгезии клеток часто необходим кальций; в связи с этим ряд исследователей сосредоточили свои усилия на поисках адгезионных молекул, связывающих кальций.

Антитела впервые были использованы для идентификации адгезионных молекул *Dictyostelium*. Антитела против *Dictyostelium* химически расщепляли таким образом, что от них остались лишь одновалентные антиген-связывающие участки – так называемые Fab′-фрагменты (рис. 15.26, *А*). (Расщеплять двухвалентные антитела необходимо потому, что они могут искусственно соединять клетки и эффект специфического связывания будет невозможно измерить.) Это привело к открытию гликопротеина с молекулярной массой 80 000 дальтон, обусловливающего адгезию при агрегации *Dictyostelium*. Для изучения адгезии эмбриональных клеток этот подход был использован Эдельманом и его коллегами (Brackenbury et al., 1977), выделившими в результате своих исследований **нейральные молекулы клеточной**

адгезии (N-МКА). В этом исследовании инъецировав кролику клетки нейральной сетчатки цыпленка, приготовили антитела к поверхности клеток нейральной сетчатки и расщепили их на Fab'-фрагменты. При добавлении Fab'-фрагментов в культуральную среду агрегация клеток нейральной сетчатки подавлялась. Добавление же к этой смеси фракции мембран нейральной сетчатки вызывало связывание Fab'-фрагментов, в результате чего клетки нейральной сетчатки получали возможность агрегировать. Экстрагировав компоненты этих мембран, Тьери и др. (Thiery et al., 1977) обнаружили, что Fab'-фрагменты связали белок с молекулярной массой 140 000 дальтон. Внесенный в раст-

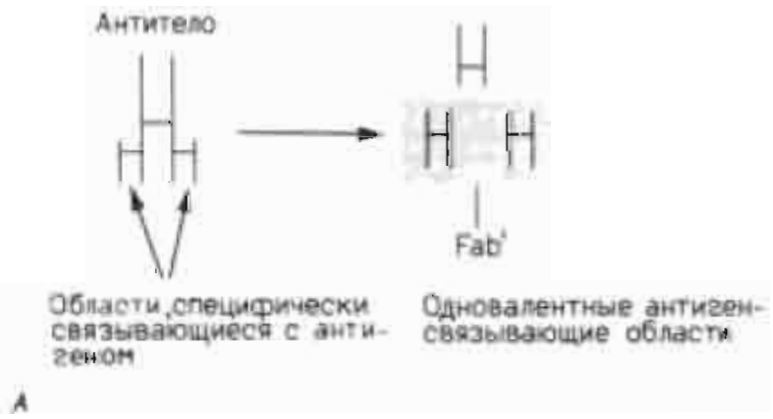


Счет радиоактивных клеток, связавшихся с агрегатом

Тип агрегата	Меченые единичные клетки в суспензии [1]		
	хрящевые	гепатоциты	мышечные
Хрящ	100	6	48
Печень	10	100	0
Грудная мышца	38	49	100

[1] Доля клеток (%), связавшихся с тем или иным агрегатом.

Рис. 15.25. Специфичность взаимодействия клетка – клетка. Агрегаты, представленные клетками одного типа, помещены в ротационную культуру, содержащую единичные клетки как того же самого (изотипические), так и другого (гетеротипические) типа. Единичные изотипические и гетеротипические клетки предварительно метили различными радиоактивными изотопами. Через 6 ч агрегаты собирали, отмывали и подсчитывали в них число изотипических и гетеротипических клеток; результаты подсчета приведены в таблице. (Данные из Roth, 1968.)



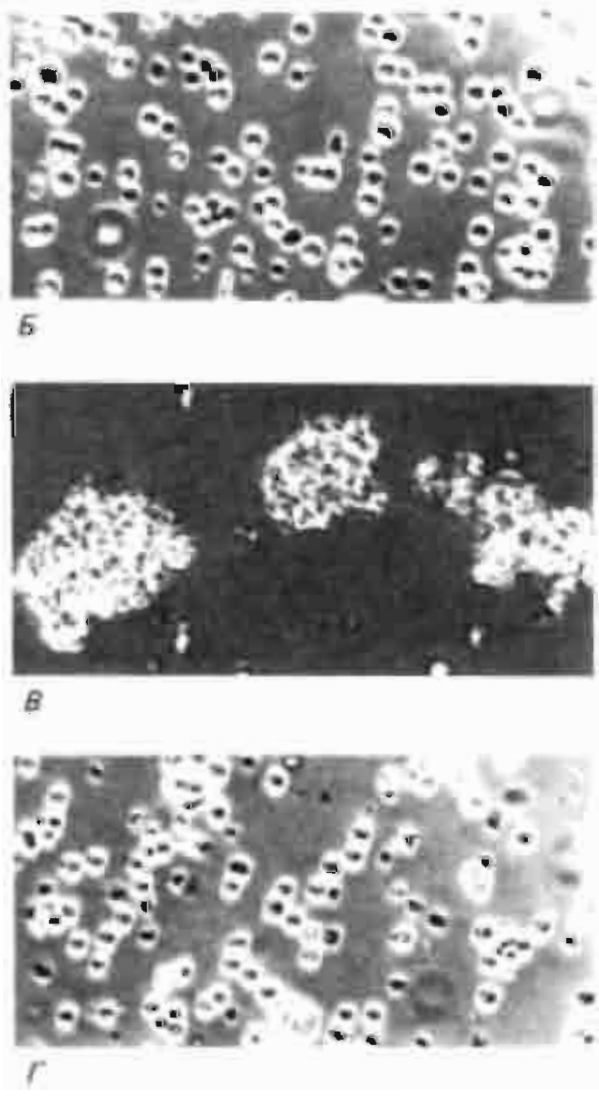


Рис. 15.26. Агрегация клеток нейральной сетчатки 10-дневного куриного зародыша. *А*. Получение Fab'-фрагментов антитела. *Б*. Единичные клетки до агрегации. *В*. Агрегаты, образовавшиеся через 30 мин после начала ротации. *Г*. Ингибирование агрегации, когда ротацию клеток сетчатки в течение 30 мин производили в присутствии Fab'-фрагментов антител к N-МКА. (Из Brackenbury et al., 1977; с любезного разрешения G. M. Edelman.)

вор с агрегирующими клетками сетчатки, он один ингибировал действие Fab'-фрагментов. Отсюда заключили, что белок с молекулярной массой 140 000 дальтон представляет собой компонент клеточной поверхности, выполняющий очень важную функцию в агрегации нейронов.

Второй подход к идентификации молекул клеточной адгезии был использован Такеичи и его коллегами. Эти исследователи выявили семейство белков, которым для выполнения ими адгезионных функций, а также для устойчивости к трипсину необходимы ионы кальция. Такие кальций-зависимые гликопротеины клеточной адгезии были названы **кадгеринами** (Takeichi, 1987).

Кадгерины

Молекулы клеточной адгезии (МКА) можно подразделить на три группы: *кадгерины*, адгезионные свойства которых зависят от ионов кальция, *иммуноглобулиновое сверхсемейство МКА*, у которых домены, связывающие клетки, сходны с доменами молекул антител, и, наконец, *сахаридные МКА*, у которых МКА-белки узнают углеводные остатки на соседних клетках. В табл. 15.1 перечислены некоторые из недавно открытых молекул клеточной адгезии.

Кадгерины представляют собой кальций-зависимые МКА, которые отвечают за пространственную сегрегацию клеток и организацию формы тела животного. Идентифицированы три класса кадгеринов. **Е-кадгерин** (гомологичен L-МКА цыпленка) экспрессируется всеми эмбриональными клетками млекопитающих, начиная с одноклеточной стадии. Позже распространение Е-кадгерина ограничивается эпителиальными тканями зародышей и взрослых. **Р-кадгерин** первоначально экспрессируется на внезародышевых клетках и клетках стенки матки (Nose, Takeichi, 1986). Возможно, что Р-кадгерин облегчает связь трофобласта с маткой, во всяком случае у зародышей мыши наблюдается контакт Р-кадгерина клеток матки с Р-кадгерином клеток трофобласта (Kadokawa et al., 1989). **N-кадгерин** впервые обнаруживается на мезодермальных клетках зародыша во время гаструляции по мере утраты ими экспрессии Е-кадгерина (Hatta, Takeichi, 1986). Мигрирующие клетки нервного гребня не экспрессируют ни N- ни Е-кадгеринов, но, когда эти клетки приступают к реагрегации, экспрессия N-кадгерина возобновляется. N-МКА и N-кадгерин часто обнаруживаются на одних и тех же клетках, но в разных областях зародыша. Так, в нервной трубке N-МКА концентрируется на нейроэпителиальных клетках, располагающихся вблизи наружной границы, тогда как N-кадгерин выявляется на клетках, выстилающих просвет (Hatta et al., 1987; Rutishauer, Jessell, 1988). Появление и исчезновение N-кадгерина часто наблюдается в местах активных клеточных перестроек, например при разъединении сомита: когда склеротом и дерматом начинают отделяться от эпителиальных структур сомита, они теряют свой N-кадгерин (Hatta et al., 1987). Клетки, экспрессирующие N-кадгерин, легко обособляются от N-кадгерин-отрицательных клеток in vitro, а Fab-антитела против кадгеринов превращают трехмерный гистотипический агрегат клеток в монослой (Takeichi et al., 1979). При трансфекции генов Е-кадгерина и экспрессии их в культуре фибробластов мыши (которые обычно не экспрессируют этого белка) Е-кадгерин обнаруживается на поверхности фибробластов, которые плотно соединяются друг с другом (Nagafuchi et al., 1987).

Дифференциальной экспрессией кадгеринов можно объяснить данные по гомотипической сегрегации, представленные выше. Например, клетки печени стремятся объединиться с себе подобными – клетками печени, а клетки сетчатки точно так же собирают клетки сетчатки. Было показано (Takeichi, 1987), что клетки сетчатки экспрессируют N-кадгерин, а клетки печени – Е-кадгерин; основываясь на этом можно сказать, что сегрегация клеток является следствием различий в экспрессии кадгеринов. Наблюдения Тауиса и Гольтфретера также можно объяснить дифференциальной экспрессией кадгеринов. Подтвердилось это в экспериментах по трансфекции различных кадгериновых генов в фибро-

Таблица 15.1. Общая классификация основных молекул клеточной адгезии (МКА)

Класс	МКА
Кадгерины (кальций-зависимые МКА)	N-кадгерин (известен также как A-МКА) Р-кадгерин Е-кадгерин (известен также как L-МКА, увоморулин)
Иммуноглобулиновое сверхсемейство МКА	N-МКА Ng-МКА (известна также как L1, NILE) Нейрофасцин TAG-1 LFA-1 Гликопротеин CD4 (рецептор HIV)
Сахарид-опосредованные МКА	Биндин Галактозилтрансфераза спермиев мыши N-ацетилгалактозилтрансфераза нейральной сетчатки Ламинин-гепарансульфатный репептор нейритов Проакрозин Галактозилтрансфераза gp90^{MGL} компактизации зародыша мыши (рецептор хоминга лимфоцитов)

бласты мыши, которым вообще не свойственна экспрессия каких бы то ни было кадгеринов. В результате этих трансфекций была выявлена дифференциальная экспрессия фибробластов: те из них, что экспрессировали Е-кадгерин, прилипали к фибробластам, несущим Е-кадгерин, а фибробласты, экспрессирующие Р-кадгерин, прилипали к другим, несущим Р-кадгерин. Кроме того, при рекомбинации диссоциированной ткани эмбрионального легкого в присутствии нормальных фибробластов и фибробластов, несущих Е-кадгерин, было обнаружено, что последние включаются в состав эпителиальных легочных трубочек (которые в норме экспрессируют Е-кадгерин), тогда как нормальные, петрансфицированные фибробласты ассоциируются с клетками мезенхимы (не экспрессирующими каких-либо кадгеринов) (Nose et al., 1988).

Все эксперименты, о которых говорилось выше, были выполнены на клетках в культуре. Но недавно появилось сообщение (Fujimoro et al., 1990) об исследованиях in vivo. мРНК N-кадгерина цыпленка инъецировали в один из бластомеров двухклеточного зародыша *Xenopus*. Нейрулы, экспрессирующие дополнительный N-кадгерин, часто отличались плотными скоплениями клеток и утолщенными клеточными слоями. В некоторых случаях, когда и эпидермис, и нервная трубка экспрессировали этот дополнительный N-кадгерин, нервная трубка не отделялась от эпидермиса. Следовательно, можно полагать, что кадгеринам принадлежит ведущая роль при объединении клеток в ткани.

Молекулы кадгеринов имеют три главных домена: внеклеточный домен, который обусловливает адгезию, трансмембранный домен, пронизывающий мембрану клетки, и цитоплазматический домен. Сайт-специфический мутагенез клонированных генов Е-кадгерина показал, что для функционирования кадгерина критическое значение имеет цитоплазматический домен. Эта область связывает кадгерин с цитоскелетом (Nagafuchi, Takeichi, 1989), указывая на механизм, с помощью которого внеклеточное связывание может влиять на форму клетки и ее поведение.

Иммуноглобулиновое сверхсемейство МКА

Многие молекулы клеточной адгезии, не нуждающиеся для своего функционирования в ионах кальция, имеют очень сходную структуру (рис. 15.27). Эта структура с ее внеклеточными глобулярными доменами удерживается дисульфидными мостиками и напоминает структуру молекул иммуноглобулинов, что послужило основанием для предположения о происхождении иммуноглобулинов от этой группы молекул клеточной адгезии (Williams, Barclay, 1988; Lander, 1989). Поэтому такие гликопротеины и называют «иммуноглобулиновым сверхсемейством».

Из всех молекул клеточной адгезии наиболее полно охарактеризованы N-МКА. Несмотря на то что белок N-МКА кодируется одним геном на гаплоидный геном, он может быть представлен молекулами трех размеров, что объясняется дифференциальным сплайсингом РНК. Доминирующие формы – белки с молекулярной массой 180 000 дальтон и 140 000 дальтон, содержащие три домена:

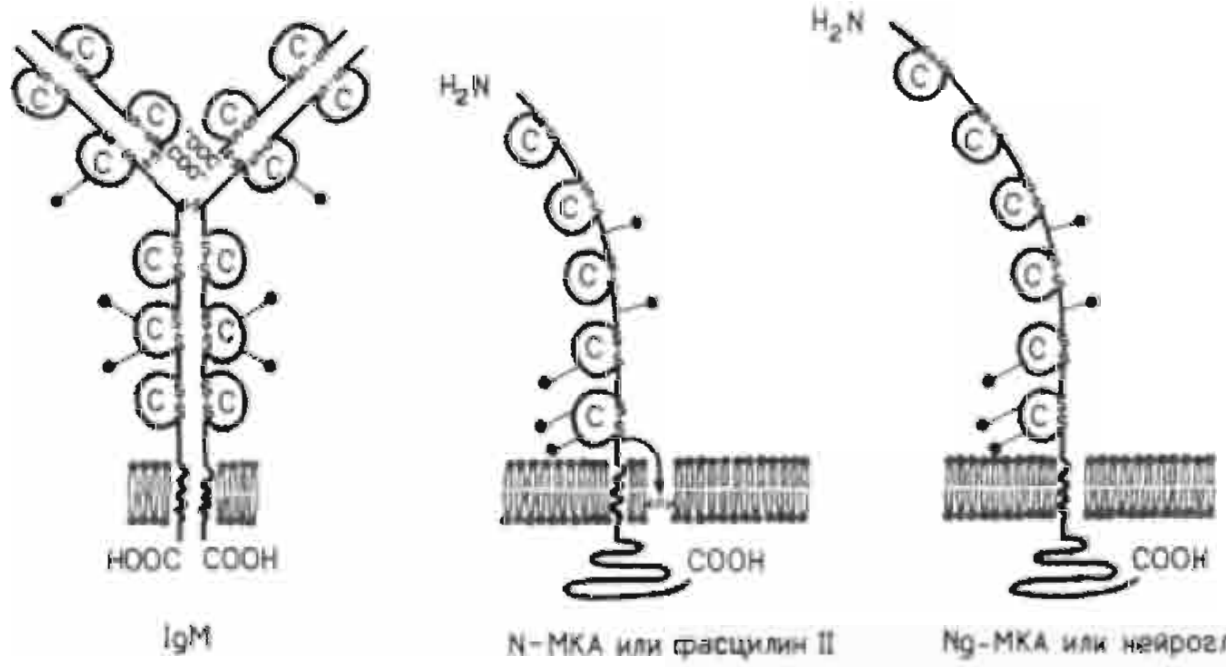


Рис. 15.27. Три члена «иммуноглобулинового сверхсемейства». Молекула IgM состоит из двух тяжелых цепей, каждая из которых включает пять доменов, и двух легких, включающих по два домена. N-МКА представлена единственной полипептидной цепью с пятью доменами. Ее заякоривание в мембране происходит либо с помощью трансмембранной аминокислотой последовательности белка, либо с помощью липида. Ng-МКА является трансмембранным белком с шестью глобулярными доменами. У насекомых молекула клеточной адгезии фасцилин II и нейроглиан представляют собой соответственно N-МКА и Ng-МКА.

внеклеточный домен; домен, пронизывающий мембрану, и цитоплазматический домен. (Белок с молекулярной массой 120 000 дальтон не проходит через мембрану и, по-видимому, представлен лишь внеклеточным доменом, ковалентно связанным с мембранным липидом.) Белок с молекулярной массой 180 000 дальтон может связываться с Ng-МКА, другие формы этим свойством не обладают (Edelman, 1986).

Полагают, что N-МКА соседних клеток взаимодействуют друг с другом, образуя мостики между клетками. Содержащие N-МКА клетки нейральной сетчатки могут связываться с липидными пузырьками, содержащими в своем бислое N-МКА. Если Fab'-фрагменты анти-N-МКА нанести на клетки сетчатки, то они оденут только N-МКА. В результате обработанные таким образом клетки сетчатки теряют способность связывать липидные пузырьки, содержащие в мембранах N-МКА (Rutishauser et al., 1982). Данные электронно-микроскопических исследований подтверждают, что N-МКА могут взаимодействовать друг с другом, образуя сложные многомерные структуры (Hall, Rutishauser, 1987). Таким образом, N-МКА обусловливают адгезию клеток лишь в том случае, когда все они несут на своей поверхности N-МКА. Каждый контакт между клетками опосредован многочисленными взаимодействиями N-МКА.

N-МКА могут выполнять различные функции в зависимости от содержания в них остатков сиаловой кислоты. Сиаловая кислота представляет собой сложный (10-углеродный) сахарид, образующийся при взаимодействии D-маннозы с пируватом и несущий отрицательный заряд. Высокогликозилированная N-МКА содержит по массе около 30% сиаловой кислоты, менее гликозилированная – около 10%. Различия между этими молекулами, по-видимому, обусловлены длиной полимеров сиаловой кислоты (Hoffman, Edelman, 1983). Молекулы сиаловой кислоты ковалентно связаны с белком N-МКА в трех сайтах по середине молекулы в пределах внеклеточного домена (Cunningham et al., 1983).

Сиаловые кислоты способны резко уменьшить адгезивность клеток в отношении друг друга. Клетки с относительно низким содержанием сиаловой кислоты на своих N-МКА агрегируют в четыре раза легче, чем клетки с высоким уровнем сиаловой кислоты (Hoffman, Edelman, 1983). По мере развития зародыша бóльшая часть белков N-МКА из форм с высоким содержанием сиаловой кислоты превращается в формы с ее низким содержанием (Rieger et al., 1985; Chuong, Edelman, 1985a, b).

Вероятно, морфогенетические процессы межклеточного взаимодействия обусловлены комбинациями молекул клеточной адгезии. Так, адгезию аксонов к культивируемым мышечным клеткам можно ингибировать добавлением только целой комбинации антител против N-МКА, N-кадгерина и интегрина (об этом фибронектиновом рецепторе речь пойдет ниже в этой главе). Миграция клеток-зерен по глиальным клеткам мозжечка также, по-видимому, контролируется специфическими комбинациями МКА, действующими на разных уровнях мозжечка (Bixby et al., 1987; Chuong et al., 1987). Таким образом N-МКА могут играть роль как в стимуляции двух соседних клеток к образованию областей контакта, так и в ингибировании таких контактов. Если обе соседние клетки экспрессируют

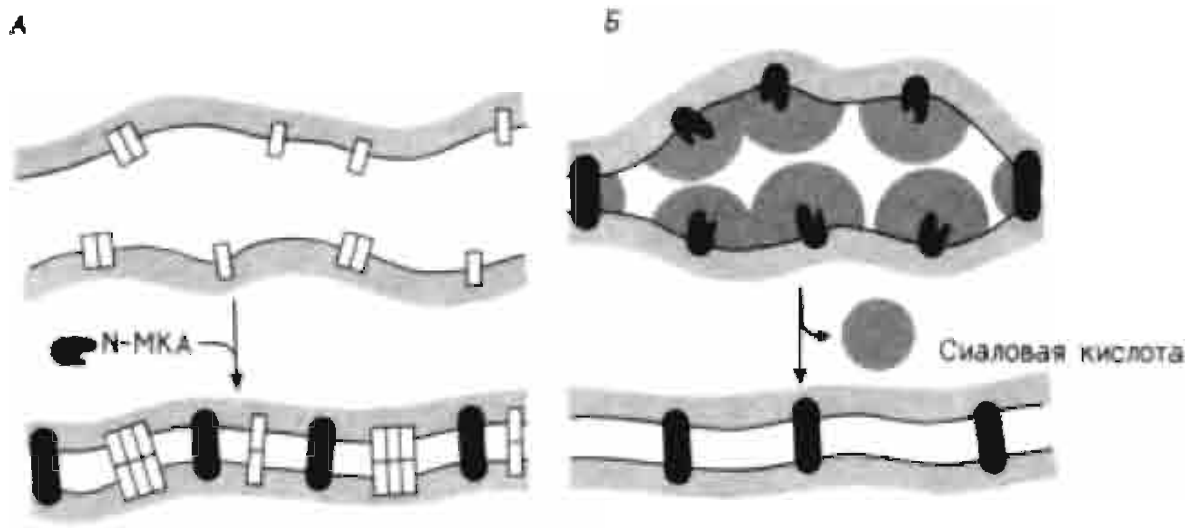


Рис. 15.28. Два механизма, с помощью которых N-МКА могут регулировать адгезию типа «клетка – клетка». *А*. Экспрессия N-МКА с низким содержанием сиаловой кислоты на соседних клеточных поверхностях ведет к образованию многочисленных мостиков между N-МКА, что способствует сборке специализированных клеточных контактов из соответствующих субъединиц (изображены в виде удлиненных овалов) на этих противолежащих клеточных поверхностях. *Б*. Высокосиализированные формы N-МКА могут ингибировать взаимодействие между клетками, возникающее благодаря каким-то другим адгезивным молекулам (представленным в виде сфер и фигур с сочленяющимися поверхностями) на противолежащих клеточных мембранах. Если удалить остатки сиаловой кислоты, то клетки слипаются. (По Rutischauser et al., 1988.)

N-МКА с низким содержанием сиаловой кислоты, то клеточная адгезия стимулируется. Если же клетки содержат высокосиализированные формы N-МКА, то клеточная адгезия подавляется (рис. 15.28; Rutishauser et al., 1988).

Распределение молекул клеточной адгезии

Пространственно-временное распределение МКА можно продемонстрировать с помощью флуоресцирующих антител. У куриного зародыша в начале гаструляции N-МКА и L-МКА экспрессируются на всех клетках. Однако при индукции нервной пластинки происходят резкие изменения. Клетки нервной пластинки экспрессируют N-МКА, а окружающие клетки эктодермы – только L-МКА (рис. 15.29; Edelman et al., 1983). При последующем развитии наблюдаются модуляции этих молекул в связи с индукцией или реорганизацией тканей. Так, клетки нервного гребня, изначально содержащие на своей поверхности N-МКА, при переходе к миграции утрачивают N-МКА и затем вновь их экспрессируют при формировании ганглиев (Crossin et al., 1985; Edelman, 1985). После того как нейральная индукция произойдет и на нейральных производных экспрессия L-МКА уменьшится, на клетках нервной трубки появляются N-МКА, а другая адгезионная молекула – Ng-МКА в изобилии экспрессируется на нейронах, миграция которых направляется по поверхности глии (Thiery et al., 1985; Daniloff et al., 1986).

Дифференциальная экспрессия МКА чрезвычайно важна на границах между двумя группами клеток. В этих местах организм распределяет разные клетки по разным областям. Клетки хорды не входят в состав нервной трубки, а клетки дермы не проникают в эпидермис. Такая сегрегация может сопровождаться экспрессией различных МКА клетками соседствующих клеточных популяций. Как будет показано в следующей главе, индукция перьев происходит в связи с конденсацией мезенхимных клеток мезодермального происхождения, которые образуют шарообразные клеточные скопления непосредственно под эпидермисом кожи куриного зародыша. Эктодермальные клетки связаны вместе L-МКА, а МКА-отрицательные клетки собираются в агрегат, экспрессирующий N-МКА (рис. 15.30). На протяжении всего развития пера разные группы клеток отделяются друг от друга в результате того, что они приобретают способность экспрессировать либо N-МКА, либо L-МКА, либо и тот, и другой белок вместе (Chuong, Edelman, 1985a, b).

В дополнение к тому, что МКА могут создавать и поддерживать границы между клетками разных типов, они могут служить и для объединения клеток разных типов. Эта их функция особенно важна при установлении связи аксона с соответствующим органом-мишенью, для чего также используются N-МКА. Было показано (Tosney et al., 1986), что мышечные клетки начинают экспрессировать на своих мембранах N-МКА ко времени появления вблизи них аксона, несущего N-МКА. Но как только между нервом и мышцей образуется синапс, единственным местом на мышце, где продолжается экспрессия N-МКА, останется нервно-мышечное соединение (Covault, Sanes, 1986). Если на специ-

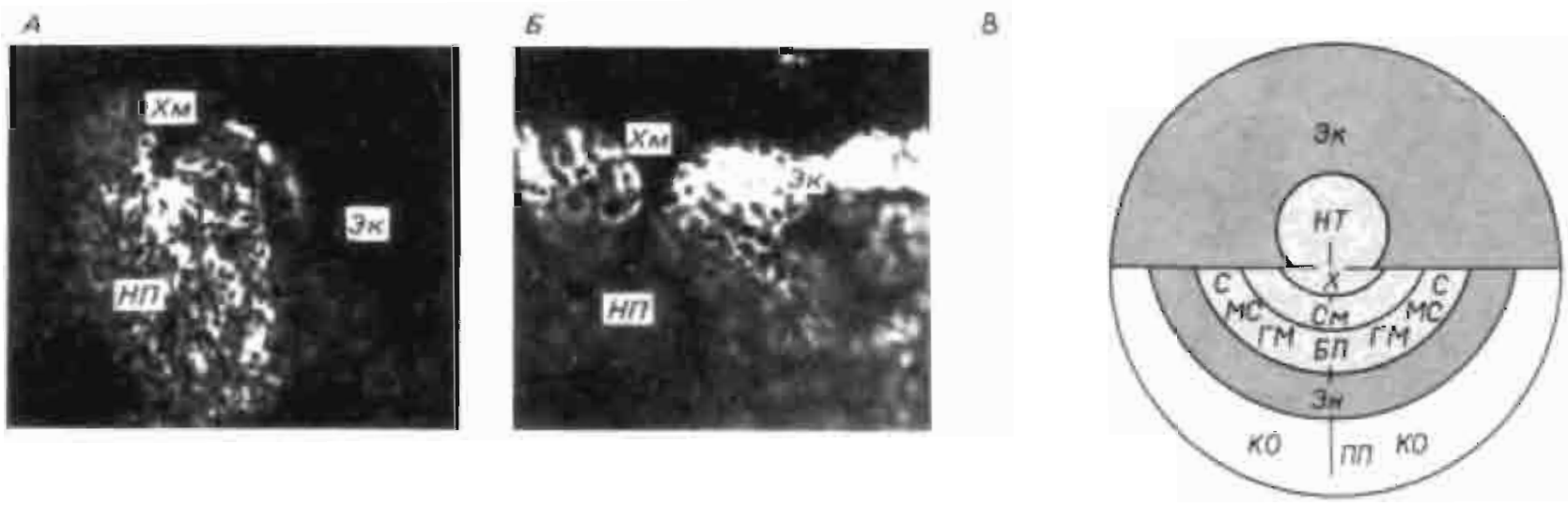


Рис. 15.29. Изменения в распределении МКА нейрулирующего куриного зародыша. Зародыши окрашены флуоресцирующими антителами к N-МКА (*А*) и L-МКА (*Б*). N-МКА представлен в больших количествах в хордомезодерме (*Хм*) и нервной пластинке (*НП*), но не обнаруживается в эпидермальной эктодерме. L-МКА, напротив, вначале выявляются в кожной эктодерме, но отсутствуют в нервной пластинке. Перед нейруляцией и N-МКА, и L-МКА присутствовали на каждой из клеток этих типов (не показано). *В*. Проспективная карта зачатков куриного зародыша, на которой обозначены области, экспрессирующие различные МКА. Более темным цветом выделены области, экспрессирующие L-МКА; светло-серым цветом обозначены области, экспрессирующие N-МКА. *Эк* – эктодерма; *Эн* – энтодерма; *С* – сердце; *КО* – кроветворная область; *БП* – боковая пластинка; *ПП* – первичная полоска; *НТ* – нервная трубка; *Х* – хорда; *См* – сомит; *ГМ* – гладкая мускулатура; *МС* – мочеполовая система. Для областей, из которых развивается гладкая мускулатура и кровь, пока нельзя привести каких-либо *известных* МКА, которые бы с ними связывались. (Из Edelman, 1985.)

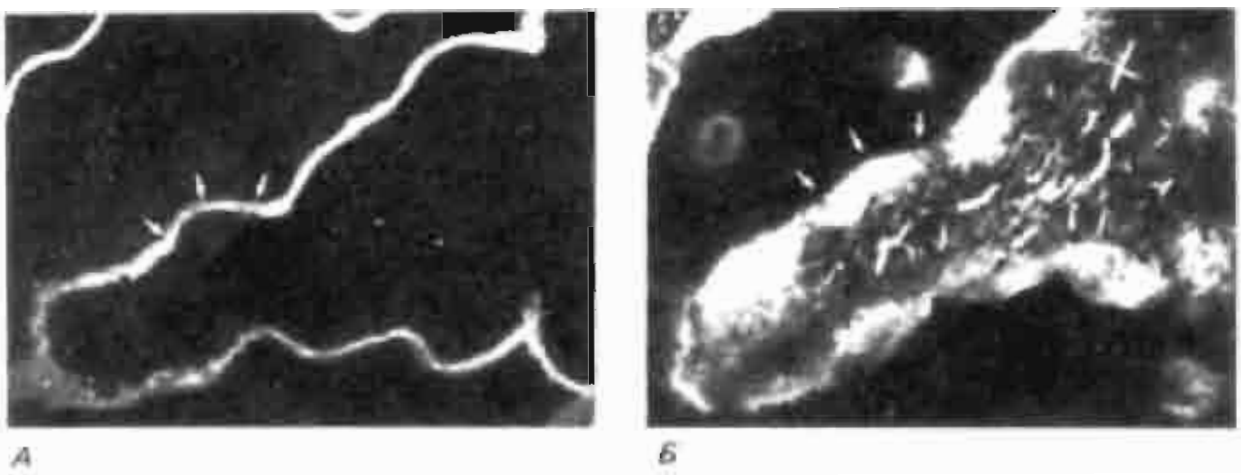


Рис. 15.30. Распределение различных молекул, обусловливающих адгезию клеток, на границах между тканями. *А*. Эпидермис кожи и плакоды пера окрашены антителами к L-МКА. *Б*. По мере того как мезодермальные клетки собираются для индукции в эктодерме зачатка пера, агрегирующие клетки мезенхимы экспрессируют N-МКА. (Из Chuong, Edelman, 1985a; фотография с любезного разрешения G. M. Edelman.)

фические области развивающегося зародыша по-

связыванию нейронов и поддержанию связей, уста-

действовать антителами против N-МКА, то связь между нейроном и его тканью-мишенью будет катастрофически нарушена. Фрейзер и др. (Fraser et al., 1988) показали, что антитела к N-МКА нарушают узнавание аксонами сетчатки лягушки их специфических мишеней в зрительном тектуме мозга. Ландмессер и др. (Landmesser et al., 1988) получили сходные результаты, свидетельствующие о воздействии антител против N-МКА на иннервацию скелетных мышц у куриного зародыша. В обоих случаях эффект антител можно объяснить тем, что они мешают N-МКА выполнить свою функцию по

новившихся между нейронами и их тканями-мишенями.

Если некоторые МКА распространены в зародыше практически повсеместно, то распространение других ограничено. Эти последние молекулы клеточной адгезии, как полагают, экспрессируются в течение очень ограниченного времени и в очень специфических областях зародыша, отчего их идентификация и описание свойств затруднены. Некоторые из этих МКА обусловливают миграцию аксонов в одном и том же направлении для совместного объединения. Процесс объединения аксонов назы-

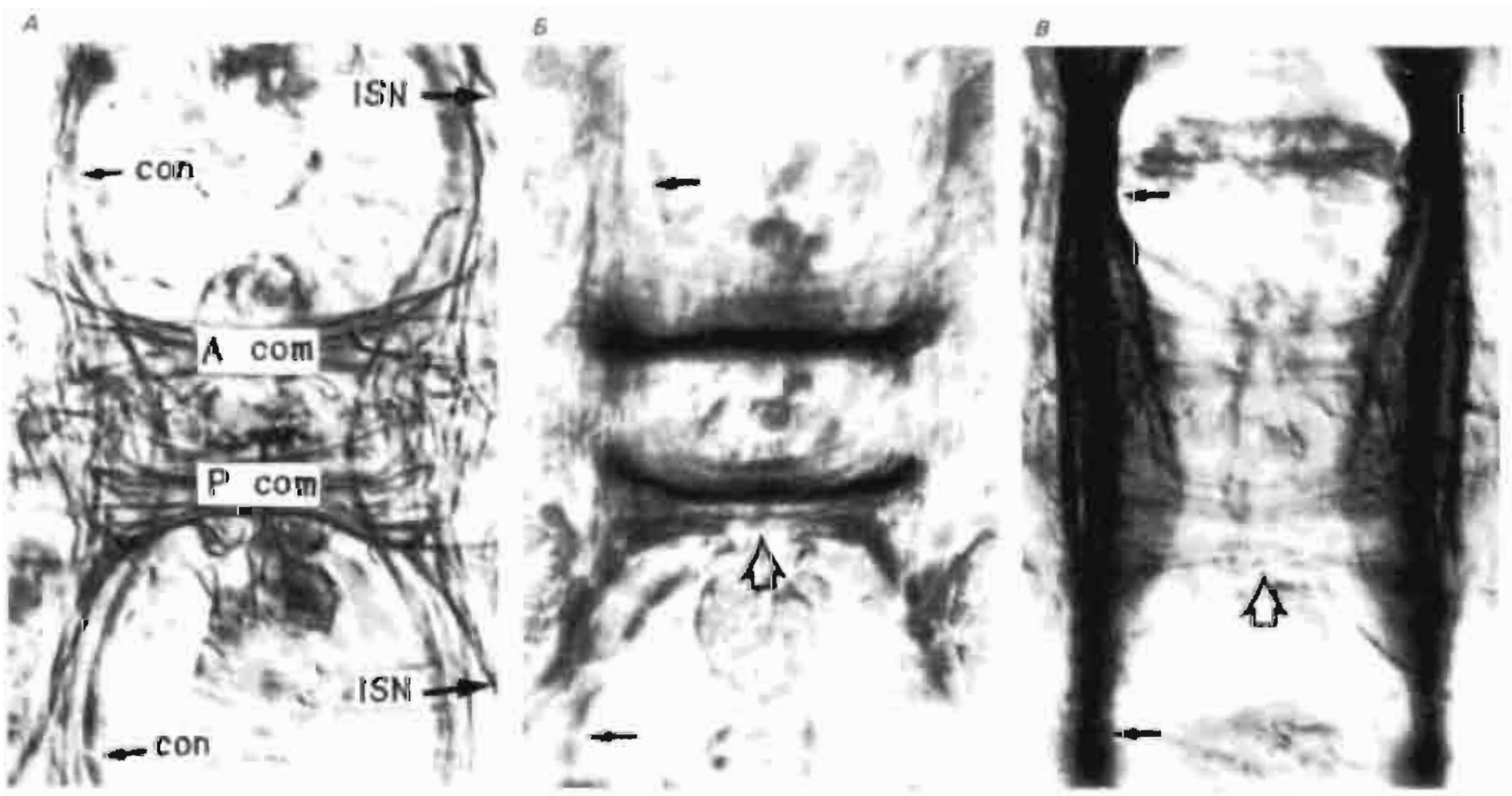


Рис. 15.31. Экспрессия фасцилина в развивающейся нервной системе кузнечика. *А*. Переплетение фасцилированных аксонов у зародыша кузнечика, выявляемое с помощью микроскопии по Номарскому. A com и P com – передняя и задняя комиссуры, аксоны которых пересекают сегмент; ISN – межсегментарный нейрон; con – связующий нейрон. *Б, В*. То же, что на *А*, но препарат окрашен моноклональными антителами против фасцилиновых гликопротеинов клеточной поверхности. Антитела на *Б* узнают набор аксонов в передней и задней комиссурах, тогда как антитела (на *В*) связываются с мембранным гликопротеином продольных пучков аксонов. Стрелки указывают на одни и те же структуры на *Б* и *В*. Обратите внимание на то, что антитела окрашивают только часть каждого аксона. (Из Bastiani et al., 1987; фотография с любезного разрешения C. Goodman.)

вается **фасцилляцией**; возникающий в результате этого процесса пучок аксонов образует нерв. (Зрительный нерв, например, представляет собой фасцилированный пучок аксонов, отходящих от ганглиозных клеток нейральной сетчатки.) Как будет описано в гл. 17, у насекомых аксон может менять направление роста, когда достигает другого аксона, и перемещаться по поверхности последнего. Это явление возможно лишь при условии, что оба аксона на поверхности своих клеточных мембран содержат одни и те же адгезивные молекулы. Полагают, что у насекомых на поверхности аксона имеется много таких молекул и что эти поверхностные молекулы различны в разных местах по длине аксона (Bastiani et al., 1985, 1987). Такие поверхностные компоненты названы **фасцилинами** (рис. 15.31); некоторые из них относятся к иммуноглобулиновому сверхсемейству (Harrelson, Goodman, 1988).

Клеточная адгезия, обусловленная сахаридами

В середине сороковых годов Вейс (Weiss) и Тайлер (Tyler) независимо друг от друга высказали предположение, что поверхностные молекулы соседних клеток взаимодействуют друг с другом по типу «ключ–замок», передавая таким образом пространственную информацию для дальнейшего развития. Оба этих автора считали, что взаимодействия между специфическими комплементарными молекулами отвечают за связи, устанавливающиеся между движущимися клетками при формировании органов. В 1970 г. Роузмен (Roseman) постулировал, что молекулы, ответственные за эти взаимодействия, относятся к подклассу ферментов, называемых **гликозилтрансферазами**. Эти связанные с мембраной ферменты обычно обнаруживаются в эндоплазматическом ретикулуме и в пузырьках Гольджи, где они катализируют присоединение остатков сахаров к пептидам, в результате чего образуются гликопротеины. Существует огромное число гликозилтрансфераз, причем каждая специфична в отношении определенного сахара; некоторые трансферазы специфичны и в отношении субстрата. Например, галактозилтрансфераза – это фермент, способный переносить галактозу от активированной донорской молекулы (УДФ-галактозы) к акцептору. Сродством к различным акцепторным молекулам может обладать несколько галактозилтрансфераз.

Присутствие галактозилтрансфераз на клеточной поверхности можно обнаружить несколькими способами. Один из них заключается в добавлении меченого сахара в активированной форме. Меченый сахар будет перенесен на поверхность клетки и станет нерастворимым, после чего его можно выявить с помощью радиоавтографии (рис. 15.32) (Roth et al., 1971b; Shur, 1977a). После инкубации клеток нейральной сетчатки с радиоактивным УДФ-галактозамином около 90% меченого галактозамина было обнаружено на клеточных поверхностях (Balsamo et al., 1986). Другой способ выявления галактозилтрансферазы связан с использованием флуоресцирующих антител, полученных против этого фермента. Этот метод позволил обнаружить, что галактозилтрансфераза нейральной сетчатки сначала распределяется по всей нейральной сетчатке зародыша, а затем ограничивается лишь ее наружными слоями (рис. 15.33).

На рис. 15.34 представлены два типа возможных реакций с участием галактозилтрансфераз клеточной поверхности. В первом случае связывание между двумя клетками достигается путем взаимного узнавания галактозилтрансфераз и остатков сахара (акцепторов). Эта реакция и представляет собой адгезию, о которой шла речь в гл. 2 при обсуждении взаимодействий между галактозилтрансферазой клеточной поверхности спермия и углеводными компонентами zona pellucida (являющейся внеклеточным матриксом яйца млекопитающих). В дополнение к адгезионным реакциям следует упомянуть и о временном связывании клетки с субстратом (т.е. об узнавании субстрата мигрирующими клетками) благодаря наличию активированного сахара. Такая адгезия и катализ могут происходить как между двумя клетками, так и между галактозилтрансферазой клеточной поверхности и субстратом, например базальной пластинкой, по которой мигрируют клетки.

Накапливается все больше данных о том, что гликозилтрансферазы опосредуют перемещение клеток, характерное для гаструляции и морфогене-



Рис. 15.32. Радиоавтограмма куриного зародыша на стадии 10 сомитов, инкубированного с УДФ-[^{3}H]-галактозой (служащей донором сахара). Нерастворимая радиоактивность (черные зерна) означает, что радиоактивный сахар был перенесен на поверхностях мигрирующих клеток на другие клетки или на окружающий их матрикс. (Из Shur, 1977a; фотография с любезного разрешения B. D. Shur.)

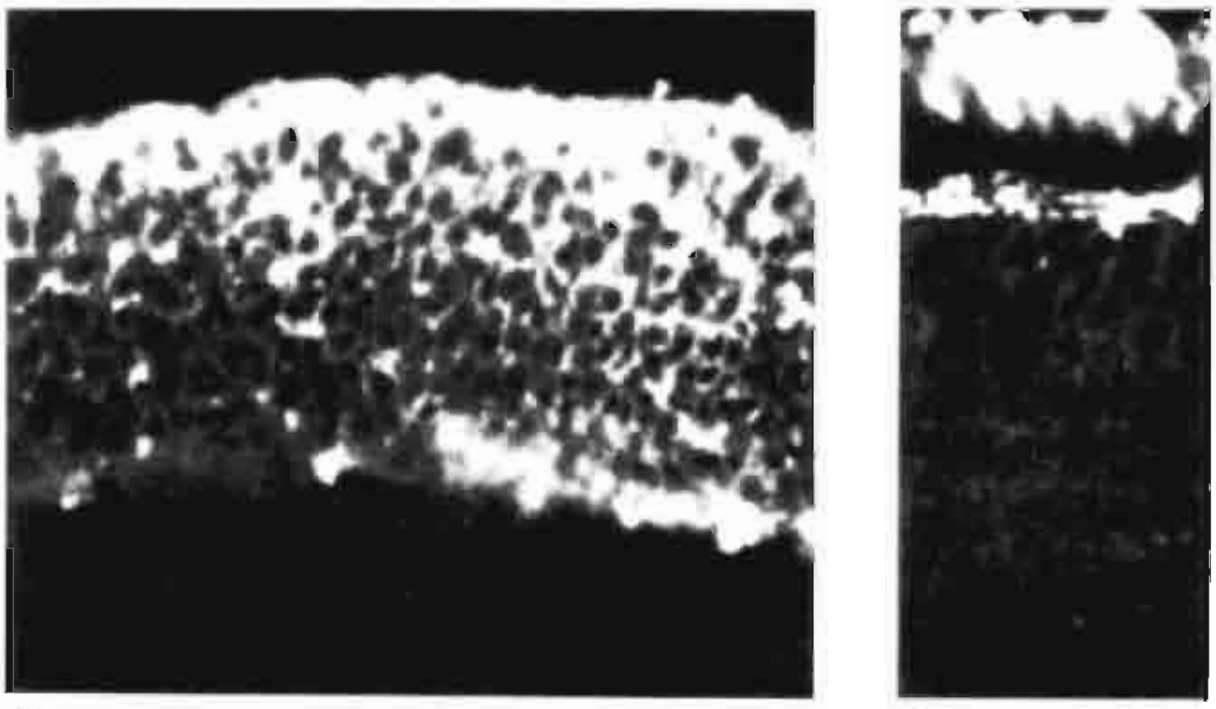


Рис. 15.33. *А.* Моноклональные антитела к галактозилтрансферазе клеточной поверхности (эта галактозилтрансфераза способна переносить N-ацетилгалактозаминфосфат) связываются с мембранами клеток нейральной сетчатки 10-дневного куриного зародыша. *Б.* После вылупления цыпленка галактозилтрансфераза локализуется в наружных слоях. (Из Balsamo et al., 1986a; фотография с любезного разрешения G. Grunwald.)

за. В ходе этих процессов клетки мигрируют по углеводным субстратам, в частности по гликозаминогликанам (Toole, 1976). Шур (Shur, 1977a, b) показал, что на поверхности мигрирующих клеток гаструлирующего куриного зародыша наблюдается высокая активность гликозилтрансферазы (рис. 15.32). Мигрирующие клетки первичной полоски и клетки нервного гребня включают в состав своей поверхности некоторые сахара от сахарсодержащих нуклеотидов (о чем свидетельствовали данные радиоавтографии). Шур полагает, что мигрирующие клетки используют свои гликозилтрансферазы в качестве рецепторов для олигосахаридов субстрата. Адгезия в таком случае, вероятнее всего, осуществляется путем специфических взаимодействий типа ключ–замок между субстратом и гликозилтрансферазой. По мере продвижения клетки эти мостики разрушаются в результате каталитического включения нового углеводного остатка (рис. 15.35). Такие гликозилтрансферазные белки обнаружены на ламеллоподиях мигрирующих клеток мезенхимы и на конусах роста удлиняющихся аксонов (Eckstein, Shur, 1989; Begovac, Shur, 1990). Эта гликозилтрансфераза узнает специфические олигосахариды на ламинине базальной пластинки. Если этот фермент удалить или изменить его специфичность, то нейроны не простирают своих отростков по ламинину, и мезенхимные клетки перестают мигрировать.

Из этой модели следуют два вывода: 1) добавление активированных сахаров должно нарушать нормальное развитие и 2) мигрирующие клетки должны оставлять на субстрате, по которому миг-

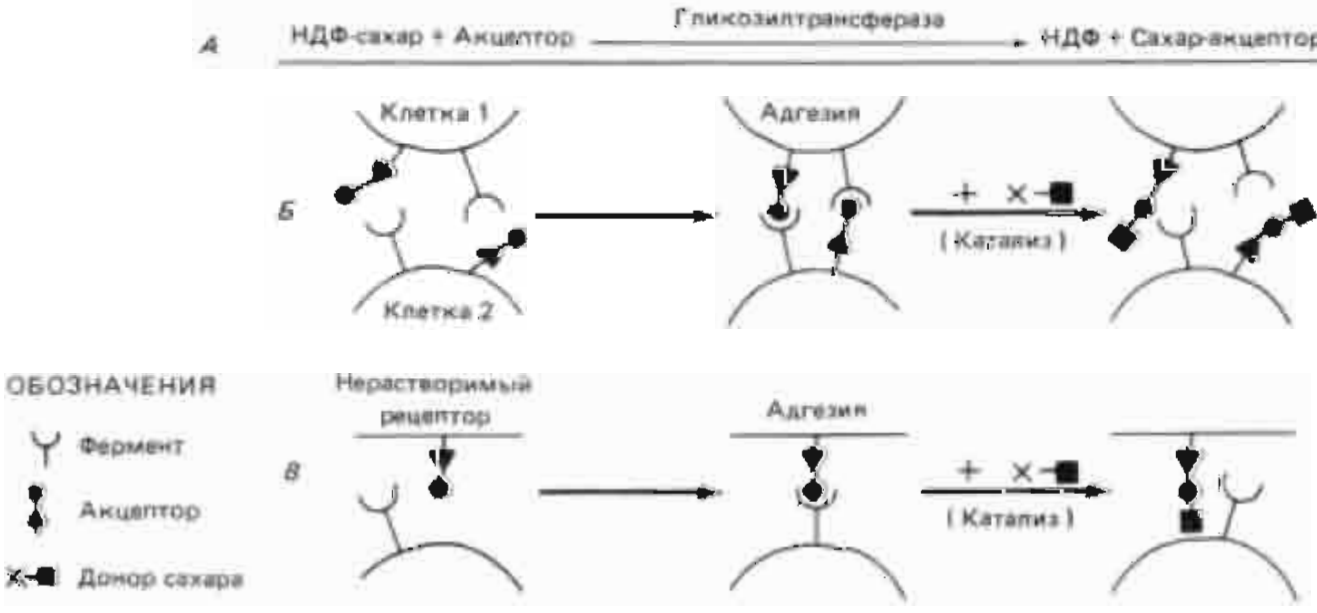


Рис. 15.34. Реакции с участием гликозилтрансферазы. *А.* Стандартная гликозилтрансферазная реакция, при которой происходит перенос сахара от нуклеотидного носителя (НДФ) к акцептору. *Б, В.* Межклеточные реакции, которые могут быть опосредованы гликозилтрансферазами клеточной поверхности (см. текст). В отсутствие активированного сахара произойдет адгезия (полагают, что этот процесс имеет место при оплодотворении). (По Pierce et al., 1980.)

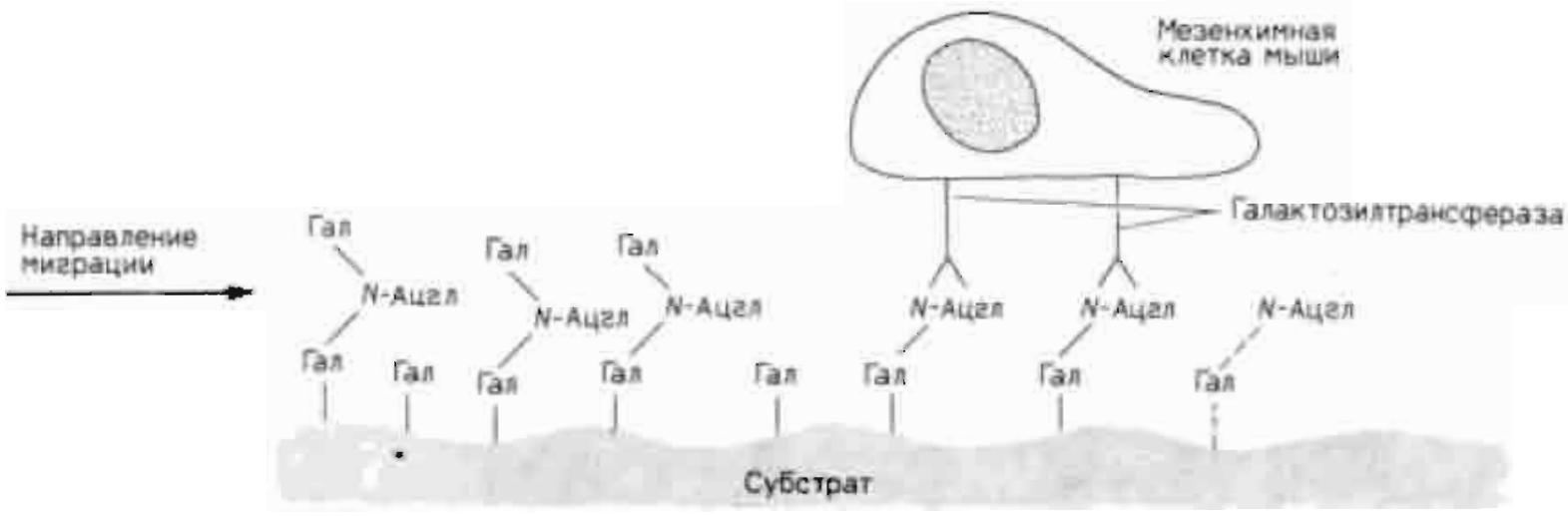


Рис. 15.35. Модель механизма миграции мезенхимных клеток зародыша мыши. Клетка мигрирует по субстрату, содержащему экспонированные остатки галактозо-N-ацетилглюкозамина. Узнавание клетками субстрата и присоединение к нему осуществляется с помощью галактозилтрансферазы, локализующейся на клеточной поверхности. Клетки перемещаются в результате ферментативного присоединения галактозы к этим экспонированным на субстрате остаткам, что приводит к отделению клетки от субстрата и дает возможность ферментам клеточной поверхности находить на субстрате новые негалактозилированные сайты. (Из Shur, 1982.)

рируют, новые углеводные группы. И в самом деле, добавление больших количеств углеводсодержащих нуклеотидов к развивающимся зародышам нарушает нормальное развитие (Shur, 1977a, b; Shur et al., 1979). Непосредственная причина этих аномалий не выявлена, однако самое простое объяснение может заключаться в том, что сахара нуклеотидов взаимодействуют с гликозилтрансферазами клеточной поверхности. Если клетки предварительно пометить радиоактивной галактозой, то при миграции по субстрату, содержащему гликозаминогликаны, они оставляют на нем углеводные группы (Turley, Roth, 1979). При использовании различных гликозаминогликанов было показано, что чем сильнее метятся клетки, тем менее активной становится миграция. Степень миграции, кроме того, зависит от количества экспонированных на субстрате углеводных групп. Большое число сайтов связывания может давать прочную адгезию, замедляя тем самым миграцию. Некоторые мигрирующие клетки (например, клетки нервного гребня) могут использовать свои гликозилтрансферазы для связывания гликопротеиновых компонентов естественных базальных пластинок (Runyan et al., 1986a, b).

Гликозилтрансферазы могут обеспечивать как адгезию, так и миграцию. В гл. 2 упоминалось о том, что гликозилтрансфераза клеточной мембраны спермия мыши узнает лактозаминовые последовательности zona pellucida яйца. Во время дробления связывание гликозилтрансферазы и лактозамина обусловливает адгезию ранних бластомеров (Bayna et al., 1986) и частично адгезию между клетками матки (Dutt et al., 1987).

Таким образом, клеточная мембрана располагает несколькими механизмами, позволяющими ей прикрепляться к мембранам других клеток. Она может использовать кальций-независимые молекулы клеточной адгезии, кальций-зависимые молекулы клеточной адгезии, адгезионные молекулы ограниченного действия и гликозилтрансферазы. И этим число механизмов не исчерпывается. Как уже кратко упоминалось выше, клетки могут специфически связываться с особыми компонентами внеклеточного матрикса. К рассмотрению этих компонентов мы и перейдем в следующем разделе.

Морфогенез путем взаимодействия между клеткой и субстратом

Внеклеточный матрикс

Помимо всего прочего, клетки синтезируют макромолекулы, которые выделяются во внеклеточные пространства и обусловливают взаимодействия между клетками и их окружением. Такие молекулы называют **адгезионными молекулами субстрата**; они формируют **внеклеточный матрикс**. Роль различных видов матрикса в развитии многообразна. В одних случаях матрикс разделяет две соседние группы клеток и препятствует любым взаимодействиям между ними. В других случаях внеклеточный матрикс может служить субстратом, по которому клетки мигрируют, или даже индуцировать дифференцировку клеток некоторых типов. Один из видов матрикса представлен на рис. 15.36. Здесь пласт эпителиальных клеток лежит на слое рыхлой мезенхимной ткани. Эпителиальные клетки образовали плотный внеклеточный слой, называемый **базальной пластинкой**, а мезенхимные клетки образовали рыхлую **ретикулярную пластинку**. Оба этих слоя вместе составляют **базальную мембрану** пласта эпителиальных клеток. В состав внеклеточного матрикса вхо-



Рис. 15.36. Локализация и формирование внеклеточного матрикса у куриного зародыша. Внеклеточный матрикс в месте соединения эпителиальных (*вверху*) и мезенхимных клеток (*внизу*). Эпителиальные клетки секретируют базальную пластинку, а мезенхимные клетки – ретикулярную пластинку, образованную преимущественно из коллагена. (Фотография с любезного разрешения R. L. Trelsted.)

дят три основных компонента: коллаген, протеогликаны и гликопротеины.

Коллаген – это семейство гликопротеинов, содержащих в большом количестве остатки глицина и пролина. Выше мы уже говорили о том, что многие пролиновые и лизиновые группы подвергаются посттрансляционной модификации с образованием гидроксипролина и гидроксилизина. Являясь главной структурной опорой почти любого органа животных, коллаген составляет примерно половину общего белка тела. Бóльшая часть коллагена (до 90%) обнаруживается во внеклеточном матриксе кожи, сухожилий и костей; этот коллаген относят к типу I. Существуют многочисленные иные типы коллагена, которые выполняют особые функции (табл. 15.2). Коллаген типа II секретируется главным образом хрящевыми клетками, но его обнаруживают также в хорде и в стекловидном теле глаза. Коллаген типа III в основном содержится в кровеносных сосудах, а IV и V обнаруживается в различных базальных пластинках, выделяемых эпителиальными клетками (Vuorio, 1986). В последующих главах будет рассмотрена морфогенетическая роль различных типов коллагена при ветвлении зачатков органов и в процессе дифференцировки роговицы.

Протеогликаны – особый тип гликопротеинов, у которых: 1) масса углеводных остатков значительно превосходит массу белка и 2) углеводы представлены линейными цепями повторяющихся дисахаридов. Обычно один из сахаров дисахарида имеет аминогруппу, поэтому повторяющуюся единицу называют **гликозаминогликаном**. В табл. 15.3 дан перечень обычных гликозаминогликанов, а основная структура протеогликана показана на рис. 15.37. Взаимосвязанные белок и углевод формируют напоминающий паутину матрикс, и во многих случаях протеогликаны, окружая подвижные клетки, препятствуют их сближению (рис. 15.38). Консистенция внеклеточного матрикса зависит от соотношения коллагена и протеогликана. Хрящ, характеризующийся высоким содержанием протеогликанов, мягок, тогда как связки, в которых преобладают коллагеновые волокна, достаточно жестки. В базальных пластинках доминируют протеогликаны; образуя структурную опору, они выполняют здесь еще и роль молекулярного сита.

Один из таких протеогликанов – **синдекан** – представляет собой белок с молекулярной массой 33 000 дальтон, несущий хондроитинсульфатные и гепарансульфатные гликозаминогликаны. Он обнаружен в клеточной мембране и особенно выражен на базальной поверхности эпителиальных клеток в местах их контакта с базальной пластинкой. Заякоренный в клеточной мембране, синдекан может прикрепляться к фибронектину и к коллагену разных

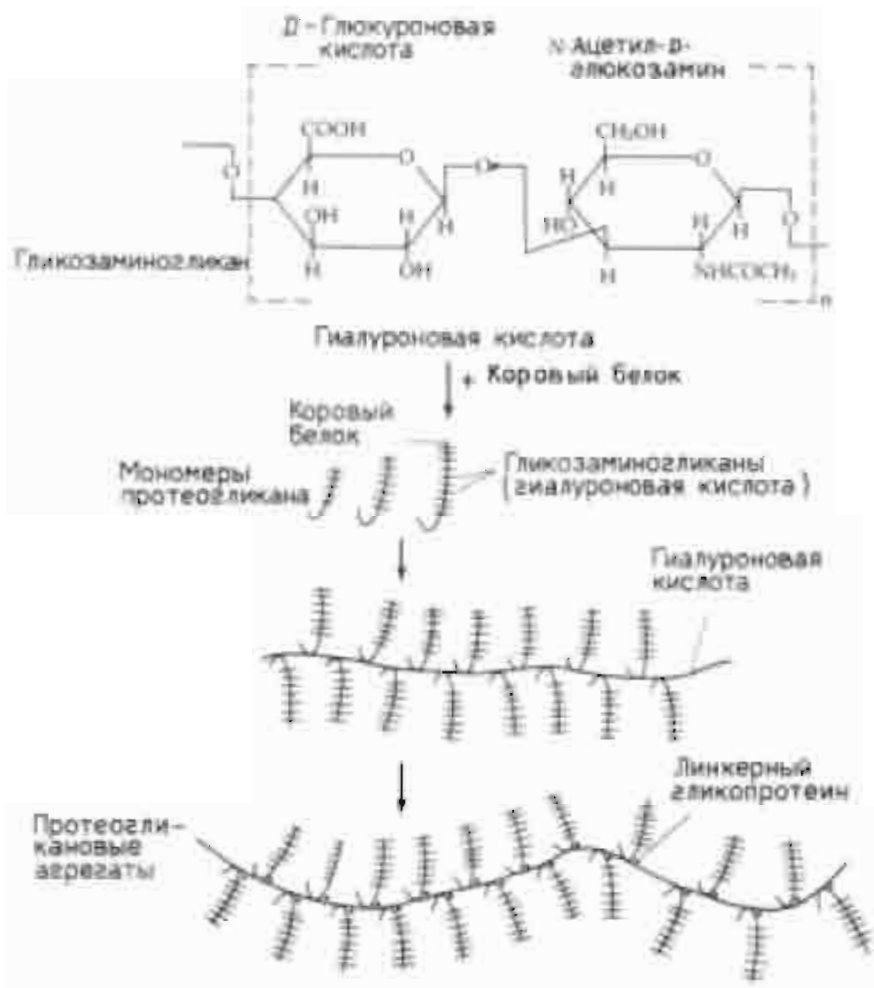


Рис. 15.37. Строение субъединицы и сборка сложного протеогликана. Повторяющийся дисахарид гликозаминогликан (в данном случае гиалуроновая кислота; см. табл. 15.2) прикрепляется к относительно небольшому коровому белку, образуя протеогликановые цепи. Эти цепи могут связываться друг с другом в более длинные гликозаминогликаны (в данном случае также гиалуроновая кислота), формируя сложные сети, которые стабилизируются линкерными гликопротеинами. (По Cheney, Lash, 1981.)

Таблица 15.2. Структурная и функциональная гетерогенность коллагена

Тип коллагена	Признаки и функция	Локализация
I	Низкое содержание углеводов Толстые, плотно упакованные, с периодичностью 67 нм фибриллы, обусловливающие натяжения высокой силы; наиболее распространенный коллаген	Кожа, кость, сухожилия
II	Высокое содержание углеводов Небольшие, с периодичностью 67 нм фибриллы образуют упругий, эластичный матрикс	Хрящ, стекловидное тело
III	Высокое содержание углеводов Трехспиральные, с дисульфидными мостиками Небольшие, с периодичностью 67 нм фибриллы, обеспечивающие опору и эластичность	Кожа, кровеносные сосуды, внутренние органы Базальные мембраны
IV	Образуют сети, служащие для прикрепления клеток; обеспечивают избирательную проницаемость. Связываются с ламинином Фибриллы отсутствуют	
V	Содержит большое количество коллагена Гибкие, с периодичностью 67 нм фибриллы Функция не известна	Перицеллюлярное пространство
VI	Микрофибриллы с периодичностью от 105 до 110 нм; фибрилл нет Заякоривает нервы и кровеносные сосуды в тканях	Кровеносные сосуды, почки, кожа, плацента, мышцы, печень
VII	Длинные цепи коллагена Участвует в заякоривании фибрилл	Хориоамниотические оболочки
VIII	Три коллагеновых домена, связанные в виде тандема двумя неколлагеновыми доменами; фибрилл нет Функция не известна	Эндотелиальные клетки, внеклеточный матрикс различных типов, образуемый клетками нервного гребня
IX	Содержит три коллагеновых, четыре неколлагеновых домена и прикрепляет гликозаминогликаны Функция не известна; цепи короткие	Подразделения коллагена типа II в хряще
X	Короткие коллагеновые цепи Функции в минерализации коллагена	Гипертрофированный (зона роста) хрящ
XI	Три цепи Функция не известна	Хрящ
XII	Обнаружен путем клонирования кДНК Функция не известна	Хрящ
XIII	Обнаружен путем клонирования кДНК Функция не известна	Хрящ, кость, эпидермис, скелетная мускулатура

Источники: Vuorio, 1986; Hoshikka, 1990.

Таблица 15.3. Повторяющиеся дисахаридные единицы наиболее обычных гликозаминогликанов (ГАГ) в протеогликанах матрикса

ГАГ	Повторяющаяся дисахаридная единица	Распространение
Гиалуроновая кислота	Гиалуроновая кислота-*N*-ацетилглюкозамин	Соединительные ткани, кость, стекловидное тело
Хондроитинсульфат	Глюкуроновая кислота-*N*-ацетилглюкозаминсульфат	Хрящ, роговица, артерии
Дерматансульфат	[Глюкуроновая или идуроновая кислота]-*N*-ацетилгалактозаминсульфат	Кожа, сердце, кровеносные сосуды
Кератансульфат	Галактоза-*N*-ацетилглюкозаминсульфат	Хрящ, роговица
Гепарансульфат	[Глюкуроновая или идуроновая кислота]-*N*-ацетилгалактозаминсульфат	Легкое, артерии, клеточные поверхности

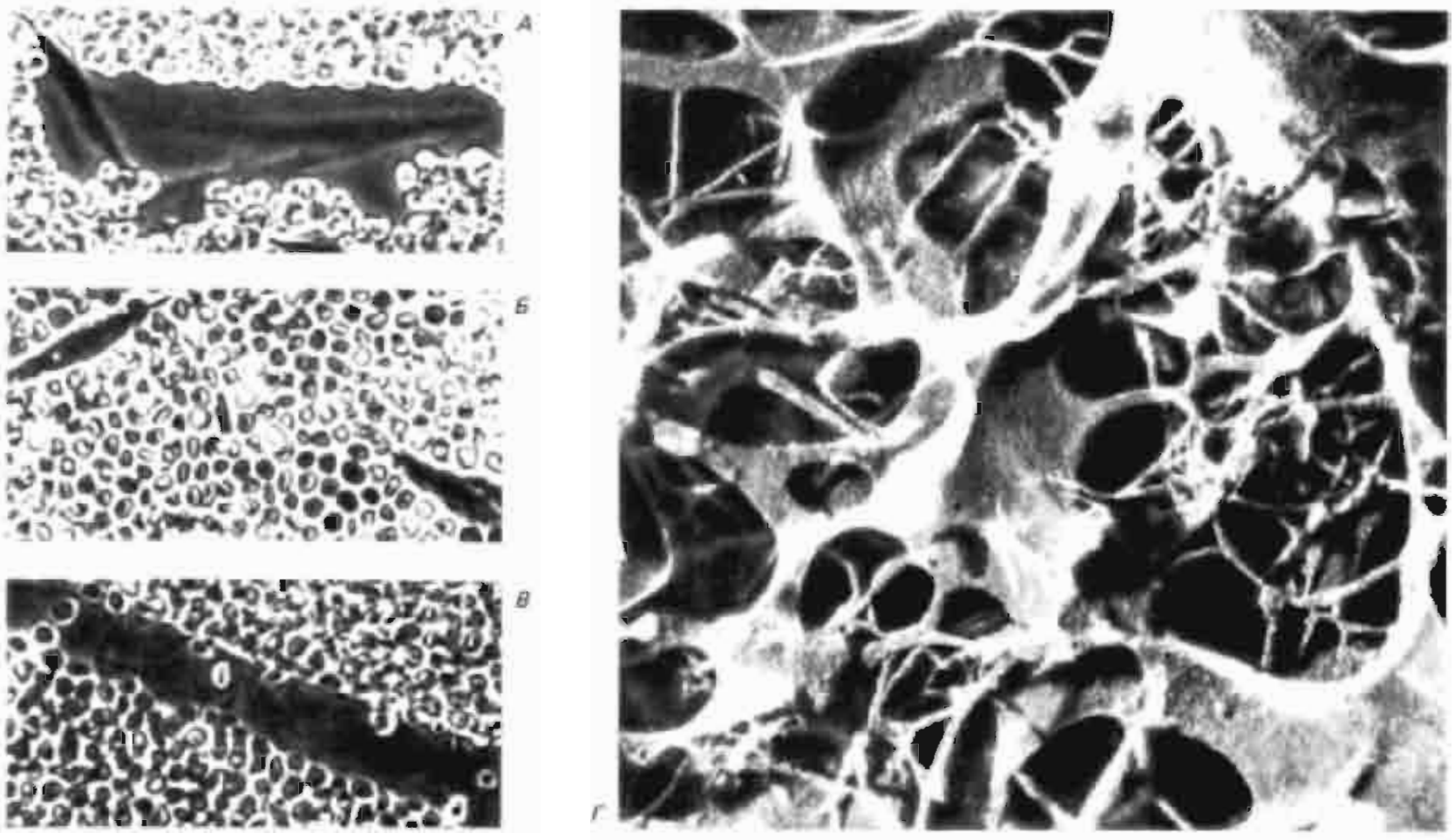


Рис. 15.38. Протеогликановая оболочка, окружающая подвижные клетки. *А*. Гиалуронидатная оболочка одевает миобласты цыпленка. Вокруг культивируемых миобластов на значительном расстоянии от клеточной границы отсутствуют какие-либо мелкие частицы (в данном случае фиксированные эритроциты). *Б*. После обработки миобластов гиалуронидазой (растворяющей гиалуроновую кислоту) эта внеклеточная оболочка исчезает. *В*. Оболочка исчезает также после того, как миобласты прекращают делиться, объединяются и начинают дифференцироваться. *Г*. Электронная микрофотография гиалуронидата в водном растворе, демонстрирующая разветвленную фибриллярную сеть. (*А*–*В* из Orkin et al., 1985; фотографии с любезного разрешения B. Toole. *Г* из Hadler et al., 1982; фотография с любезного разрешения N. M. Hadler.)

типов; по-видимому, он необходим для установления и(или) поддержания структуры эпителиальных клеточных пластов. Если его синтез в эпителиальных клетках ингибировать (трансфекцией в них несмысловой мРНК), то эти клетки утрачивают адгезивность к базальной пластинке и приобретают вид мезенхимных клеток. Если же ДНК синдекана, связанную с активным промотором, трансфицировать в фибробласты, то они конденсируются в плотные агрегаты. Как мы увидим в гл. 16, синдекан может играть очень важную роль в развитии: он синтезируется в мезенхимных клетках почки, зуба, зачатка конечности, когда происходит индукция конденсации этих клеток (Vainio et al., 1989; Thesleff et al., 1989; Bernfield, Sanderson, 1990).

Одни и те же гликозаминогликаны в разных тканях могут выполнять различные функции. Гепарансульфатные протеогликаны, например, являются универсальными компонентами базальной мембраны, но в нервной системе они стимулируют пролиферацию шванновских клеток. Аксоны ганглиев спинных корешков на некоторых белках клеточной поверхности содержат гепарансульфат; удаление этого протеогликана ингибирует пролиферацию окружающих шванновских клеток (Rattner et al., 1985). В развивающейся почке конечности гепарансульфат (но не хондроитинсульфат) способствует индукции хрящевого фенотипа и росту хрящевых узелков (San Antonio et al., 1987).

Внеклеточные гликопротеины

Внеклеточный матрикс содержит и много других специализированных молекул, таких, как фибронектин, ламинин и энтактин. Эти крупные гликопротеины, по всей вероятности, обеспечивают организацию коллагена, протеогликана и клеток в упорядоченную структуру. **Фибронектин** – это очень крупный (молекулярная масса – 460 000 дальтон) гликопротеиновый димер, синтезируемый фибробластами, хондроцитами, эндотелиальными клетками, макрофагами и некоторыми эпителиальными клетками, в частности гепатоцитами и амниоцитами. Одна из функций фибронектина состоит в том, что он служит общей адгезивной молекулой, связывая клетки с различными субстратами, такими, как коллаген и протеогликаны. Помимо этого, фибронектин организует внеклеточный матрикс при помощи



Рис. 15.39. Структурные и связывающие домены фибронектина. В виде прямоугольников представлены домены, устойчивые к действию протеаз. Домены для связывания фибробластов состоят из двух субъединиц – сайта RGDS и сайта высокой аффинности; оба этих сайта необходимы для связывания клетки. Клетки нервного гребня птиц имеют другой сайт, обусловливающий их движение по фибронектиновому субстрату. Связь с коллагеном, гепарином[1] и другими молекулами внеклеточного матрикса обеспечивают другие области фибронектина. (По Dufour et al., 1988.)

нескольких особых сайтов связывания, взаимодействие которых с определенными молекулами обусловливает объединение клеток со своим внеклеточным матриксом (рис. 15.39).

Как уже упоминалось в предыдущих главах, фибронектин играет важную роль в миграции клеток, выстилая путь, по которому клетки мигрируют. У многих видов мезодермальные клетки в процессе гаструляции мигрируют по фибронектиновым поверхностям и при локальном удалении фибронектина движение их прекращается. Например, одна из групп мезодермальных клеток куриного зародыша – прекардиальные клетки, – перемещаясь с боковых сторон на среднюю линию, мигрирует по фибронектину. Если зародышам инъецировать антитела к фибронектину или растворимые аминокислоты фибронектина, отвечающие за связывание клеток, то миграция прекардиальных клеток к средней линии прекращается, вследствие чего формируются два сердца. Результаты исследований с применением флуоресцирующих антител к фибронектину показали, что на пути миграции клеток между энтодермой и мезодермой существует градиент фибронектина. Если сделать пересадку этой области, перевернув ее при этом на 180°, то клетки сердца будут следовать градиенту к новым положениям, удаляясь от средней линии (Linask, Lash, 1988a, b). Следовательно, фибронектин играет важнейшую роль в миграции прекардиальных клеток к средней линии зародыша. Клетки других типов, например предшественники половых клеток у зародышей лягушки, также мигрируют по поверхности клеток, секретирующих фибронектин (Heasman et al., 1981).

Сайты молекулы фибронектина, обусловливающие ее связь с клетками, локализованы на расстоянии 3/4 длины от N-конца. Путем тестирования все более коротких фрагментов фибронектина, все еще сохраняющих способность связывать клетки, было показано (Pierschbacher, Ruoslahti, 1984), что прикрепление клеток к субстрату зависит от простого тетрапептида – аргинин-глицин-аспартат-серина (или по сокращениям в однобуквенной системе RGDS). Замены в пределах первых трех аминокислот существенно снижают способность клеток к связыванию (Yamada, Kennedy, 1985), свидетельствуя о том, что трипептид RGD играет важную роль в узнавании клеткой фибронектина. Кроме того, если последовательности RGD инъецировать в зародыш, то фибронектин-зависимая миграция прекращается, так как клетки связываются с синтетическим пептидом (Boucaut et al., 1984; Linask, Lash, 1988a).

Некоторые клетки, кроме сайта RGD, могут узнавать и другие последовательности молекулы фибронектина. Второй сайт связывания клетки, называемый «высокоаффинным сайтом», располагается на расстоянии около 300 аминокислот от N-концевой части молекулы (рис. 15.39). Оба сайта – RGD и высокоаффинный – необходимы для адгезии фибробластов к внеклеточному матриксу (Obara et al., 1988). Клетки нервного гребня птиц связываются и с RGD-сайтом, и с высокоаффинным сайтом, а кроме того, они способны связываться с еще одним участком молекулы фибронектина – сайтом CS1. Этот последний сайт может способствовать прикреплению клеток нервного гребня к матриксу, но RGD, высокоаффинный сайт и сайт CS1 в полном составе должны присутствовать для того, чтобы происходила миграция клеток (Dufour et al., 1988). Сайт CS1 имеется не во всех молекулах фибронектина, так как представляет собой экзон, удаляемый у некоторых типов фибронектина при сплайсинге. Таким образом, не все типы фибронектина способствуют миграции клеток нервного гребня.

Помимо участия в клеточной миграции, фибро-

[1] Гепарин представляет собой часть гепаринового протеогликана, секретируемого тучными клетками и базофилами. Гепарин и гепарансульфат – названия сходных гликозаминогликанов, обнаруженных во внеклеточном матриксе или на клеточной поверхности. Предполагается, что сайты связывания для гепарина те же, что и для гепарансульфата (Bernfield, Sanderson, 1990).

нектин, очевидно, играет определенную роль и в других процессах развития, функционируя в качестве регулятора. На поверхности мезенхимных клеток и миобластов содержится значительное количество фибронектина, но это количество уменьшается по мере дифференцировки клеток соответственно в хондроциты и мышечные трубочки (Lewis et al., 1978; Chen, 1977; Furcht et al., 1978). Удаление фибронектина с поверхности миобластов оказывается необходимым для слияния этих клеток в мышечные трубочки (Podleski et al., 1979).

Ламинин является основным компонентом базальных пластинок. Он образован тремя пептидными цепями и, как фибронектин, может связываться с коллагеном, гликозаминогликанами и клетками (рис. 15.40). С ламинином связывается коллаген типа IV (специфичный для базальной пластинки), и связывающая клетки область ламинина узнает главным образом эпителиальные клетки и нейроны. Адгезия эпителиальных клеток к ламинину (на котором они сидят и который утилизируют) значительно выше, чем сродство мезенхимных клеток к фибронектину (который они должны связывать и выделять, если им предстоит миграция). Известно, что, как и фибронектин, ламинин играет роль в организации внеклеточного матрикса, способствует адгезии и росту клеток, изменяет форму клеток и позволяет клеткам мигрировать (Hakamori, 1984).

Однако не все крупные внеклеточные гликопротеины служат субстратами для адгезии клеток. В некоторых типах внеклеточного матрикса по ходу развития с определенной закономерностью появляется **тенасцин** (называемый также цитотактином), молекулы которого примерно до половины своей длины представлены фибронектином. Различные клетки реагируют на него по-разному: одни клетки к нему прилипают, другие же, напротив, округляясь, отделяются от него (рис. 15.41; Spring et al., 1989). Фибронектин и тенасцин в разных относительных количествах могут создавать субстраты с различной степенью адгезивности. Кроме того, тенасцин стимулирует у располагающихся на нем клеток синтез и секрецию протеаз (Werb et al., 1990). Оба этих признака играют важную роль в создании путей миграции клеток и в перестройке внеклеточных матриксов во время эмбрионального развития (Tan et al., 1987; Bronner-Fraser, 1988; Wehrle, Chiquet, 1990).



Рис. 15.41. Ингибирование клеточной адгезии тенасцином. Фибронектин и тенасцин наносили на культуральную чашку. Затем на субстрат помещали фибробласты, которые, прикрепившись, начинали мигрировать. Результат эксперимента демонстрирует преимущество фибронектинового субстрата: поверхность, покрытая тенасцином, свободна от фибробластов; они к ней не прикрепляются и не мигрируют по ней. (Фотография с любезного разрешения R. Chiquet.)

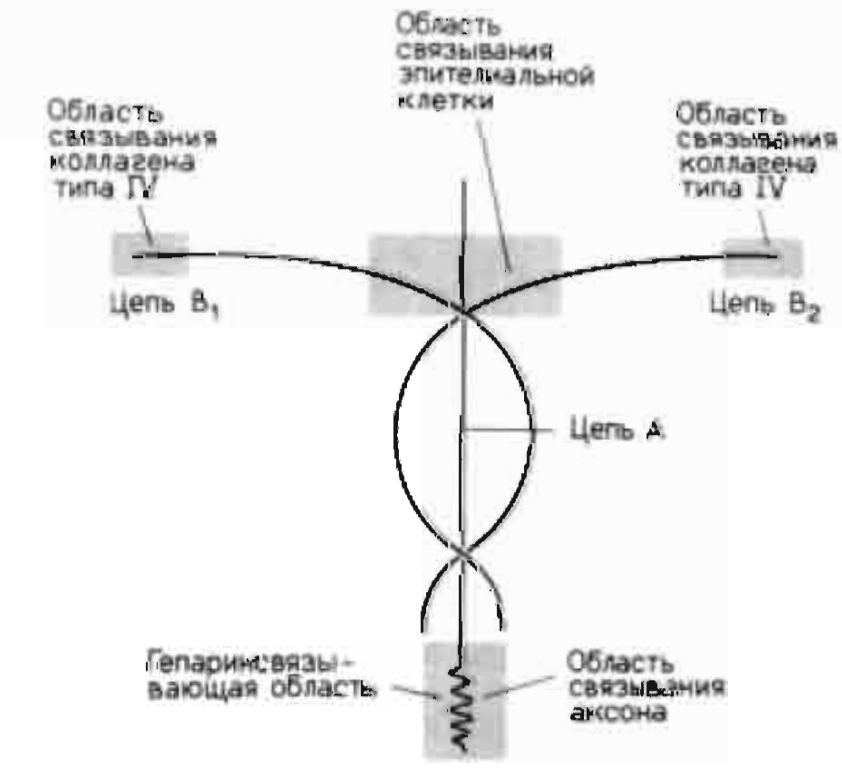


Рис. 15.40. Строение ламинина и предполагаемые области связывания.

Интегрины – рецепторы клеток к фибронектину и ламинину

Способность клеток связываться с перечисленными выше гликопротеинами зависит от экспрессии на поверхности клеток рецепторов клеточной мембраны для «сайта связывания клетки» этих крупных молекул. Основные рецепторы фибронектина были выделены с помощью моноклональных антител, блокирующих прикрепление клеток к фибронектину, и путем выделения тех мембранных белков, которые связываются с последовательностью RGD (Leptin, 1986), а также посредством выделения белков, связываемых антителами, ингибирующими адгезию «клетка – фибронектин» (Knudsen et al., 1985; Chen et al., 1985).

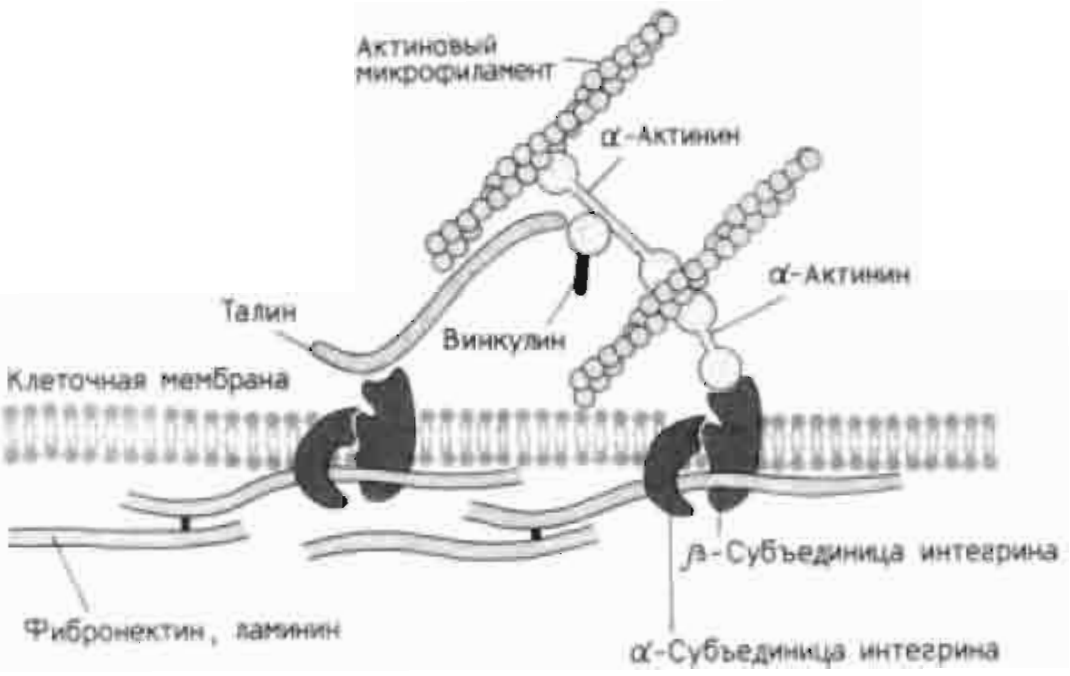


Рис. 15.42. Предполагаемая схема связывания цитоскелета с внеклеточным матриксом посредством молекулы интегрина. (По Burridge et al., 1990.)

Было обнаружено, что рецепторный комплекс к фибронектину не только связывает фибронектин на *наружной* поверхности клетки, но одновременно и связывает белки цитоскелета *изнутри*. Таким образом, фибронектиновый рецепторный комплекс пронизывает клеточную мембрану, соединяя два типа матрикса. На внутренней поверхности клеточной мембраны он служит местом заякоривания актиновых микрофиламентов, обусловливающих движение клетки, а на внешней ее поверхности он связывается с фибронектином внеклеточного матрикса (рис. 15.42). Это семейство рецепторных белков было названо **интегринами** (Horwitz et al., 1986; Tamkun et al., 1986), поскольку они интегрируют внутриклеточные и внеклеточные конструкции, позволяя им работать вместе. Оказалось, что интегриновые белки пронизывают клеточные мембраны клеток многих типов, связываясь с RGD-последовательностями нескольких адгезионных белков внеклеточного матрикса, в том числе витронектина (обнаруженного в базальной пластинке глаза), фибронектина и ламинина (Ruoslahti; Pierschbacher, 1987). Не исключено, что такое двойное связывание дает клетке возможность двигаться посредством сокращения актиновых микрофиламентов относительно неподвижного внеклеточного матрикса (рис. 15.43).

Интегрины содержат одну α-субъединицу и одну β-субъединицу; специфичность связывания интегрина зависит от комбинации субъединиц и от условий клеточного окружения (Hemler et al., 1987; Hemler, 1990). Как показано в табл. 15.4, различные бинарные сочетания α- и β-субъединиц позволяют интегрину связываться с определенными внеклеточными молекулами. Следует заметить, однако, что интегрин

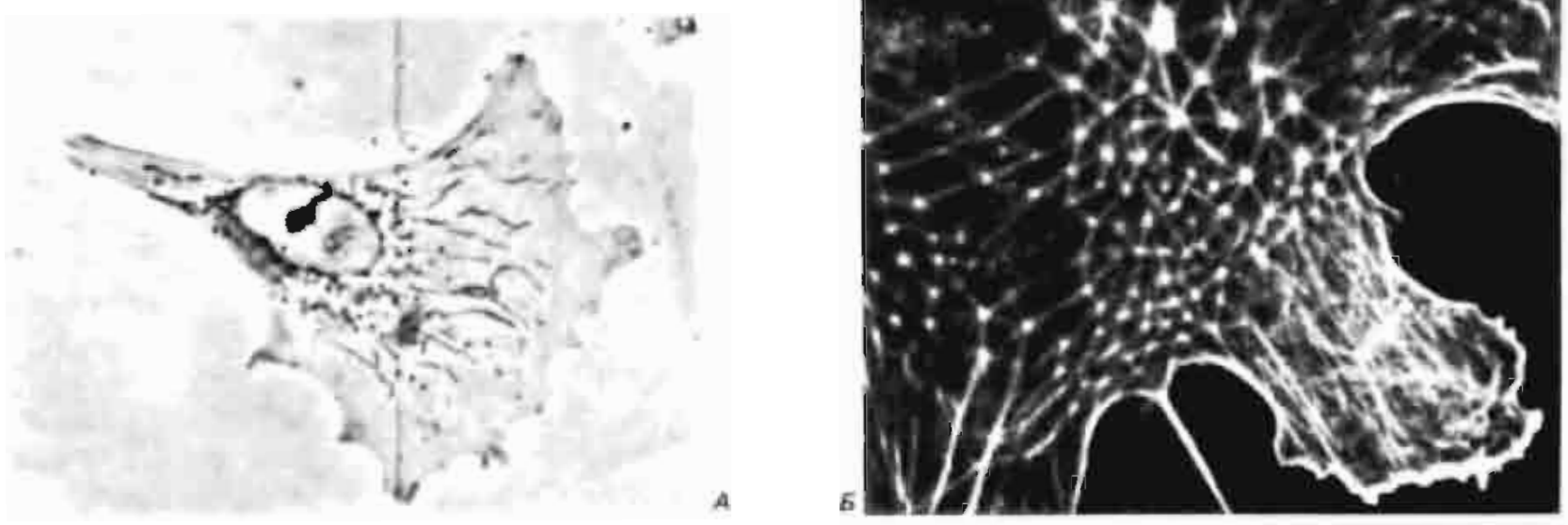


Рис. 15.43. Миграция клеток. *А*. Фазоконтрастная микрофотография фибробласта в движении. Тонкий гофрированный конец (ламеллоподия) прокладывает путь, прикрепляясь к матриксу и подтягивая к нему остальную часть клетки. *Б*. Актиновые микрофиламенты клетки, выявленные с помощью непрямой иммунофлуоресценции. Эти микрофиламенты выходят из упорядоченной цитоскелетной решетки и простираются в гофрированную мембрану ламеллоподии. (*А* – с любезного разрешения N. Wessells; *В* – из Lazarides, 1976; фотография с любезного разрешения E. Lazarides.)

Таблица 15.4. Комбинации субъединиц интегринов и лигандов[1]

Основные β субъединицы[2] и интегрины	α-Субъединицы										
	α1	α2	α3	α4	α5	α6	αV	αIIb	α2L	α2M	αX
β1 (ИНТЕГРИНЫ VLA)											
Коллаген	■	■	■								
Ламинин	■	■	■			■					
Фибронектин			■	■	■		■				
Витронектин							■				
β2 (ЛЕЙКАНОВЫЕ ИНТЕГРИНЫ)											
I-МКА									■	■	
Фибронектин										■	
Фактор свертывания X										■	
C3B										■	■
β3 (ИНТЕГРИНЫ ЦИТОАДГЕЗИИ)											
Витронектин							■	■			
Фибриноген							■	■			
Фактор фон Виллибранда							■	■			
Костный сиалобелок							■				
Фибронектин							■	■			
β4 (ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ ИНТЕГРИНЫ)											
Компонент десмосом						■					
Базальная пластинка разных типов эпителия и шванновских клеток						■					

[1] Пустые клетки в таблице означают комбинации субъединиц, которые не наблюдались.
[2] В таблице приведены только 4 основные β-субъединицы. Теперь известно, что существует по крайней мере 8 β-субъединиц.

часто связывает более, чем одну молекулу, и его специфичность определяется клеточным окружением. Например, интегрин α2β1 способен связывать и коллаген, и ламинин. На одних клетках он действительно связывается обеими молекулами, но на других тот же самый интегрин связывается либо с ламинином, либо с коллагеном. В некоторых случаях предпочтение того или иного субстрата объясняется ионными условиями. Часто в одном и том же органе можно встретить различные интегрины. Так, например, клетки почечных канальцев происходят из агрегата мезенхимных клеток. Однако по мере развития клетки, дающие начало эпителию боуменовой капсулы, экспрессируют интегрин α3β1, тогда как все клетки канальца экспрессируют интегрин α6β1. Связывание А-цепи ламинина интегрином α6β1, по-видимому, имеет существенное значение для формирования поляризованного эпителия почечных канальцев (Korhonen et al., 1990; Sorokin et al., 1990).

Значение интегринов для морфогенеза очень ярко иллюстрирует пример, относящийся к развитию дрозофилы. Как и интегрины позвоночных, интегрины дрозофилы состоят из двух субъединиц (α и β), пронизывающих клеточную мембрану. У двух известных интегринов дрозофилы β-субъединицы идентичны, а α-субъединицы различаются. Оба этих интегрина действуют на тканевую и клеточную адгезию во время развития совместно. При развитии крыла приводятся в контакт два эпителиальных слоя. При этом интегрин PS1 обнаруживается на базальной поверхности презумптивного *дорсального* эпителия крыла, тогда как интегрин PS2 находится на верхней поверхности презумптивного *вентрального* эпителия крыла. В процессе метаморфоза и тот и другой эпителий встречаются и слипаются, формируя двуслойную пластинку крыла. Мутации в интегринах приводят к тому, что в некоторых участках крыло расслаивается, о чем свидетельствуют пузырьки между двумя пластинками (Wilcox et al., 1989; Brower, Jaffe, 1989). Поскольку интегрины необходимы для прикрепления мышц к эпидермису и к стенке кишки, некоторые мутации, приводящие к синтезу аномальных интегринов, летальны. В случае летальной мутации *lethal (1) myospheroid* наблюдается недостаток генов, кодирующих β-субъединицу интегринов дрозофилы. Без этой субъединицы интегрины не образуются. Соматические мышцы, сокращаясь, становятся шарообразными и не прикрепляются к стенке тела или кишке (Leptin et al., 1989).

Если для связывания молекул внеклеточного мат-

рикса необходимы обе субъединицы интегрина, то в трансмембранной связи с внутренним цитоскелетом решающее значение имеет цитоплазматическая область β-субъединицы. Клетки с мутантной субъединицей β1, лишенной именно этой области, не могут связываться с цитоскелетом, несмотря на то, что их внеклеточные домены могут связывать фибронектин (Solowska et al., 1989; Hayashi et al., 1990). Связывание цитоплазматического домена с талином и фибулином также показано биохимически (Horwitz et al., 1986; Argraves et al., 1989). Как видно из рис. 15.42, с каждой стороны молекулы интегрина находится ансамбль белков. С наружной стороны – это сложный набор белков внеклеточного матрикса. С внутренней – это компоненты цитоскелета, особенно те, что связаны с движением клетки. Полагают, что связывание актиновых филаментов осуществляется посредством талина или α-актинина (Burridge, 1990).

Продвижение клетки во время миграции с помощью актиновых микрофиламентов требует прикрепления их к субстрату. Это прикрепление обеспечивает интегрин. Однако в отличие от эпителиальных клеток, плотно прикрепляющихся к базальной мембране, прикрепление мигрирующих клеток к базальной пластинке при их миграции должно постоянно прерываться и возобновляться. Было показано (Beckerle et al., 1987), что в местах связывания интегрина с субстратом специфически локализуется кальций-зависимая протеаза, расщепляющая талин. Возможно, что эта протеаза разрушает мостики между рецептором фибронектина и цитоскелетом. При разрыве контакта между интегрином и фибронектином синтетическими пептидами из участков, где происходит адгезия, выделяются α-актинин и винкулин.

Интегрины – не единственные молекулы, способные связываться с ламинином и фибронектином. Если рецептор интегрина связывается с RGD-последовательностью в А-цепи ламинина, то два других ламининовых белка связываются с различными последовательностями (YIGSR) в В1-цепи (Graf et al., 1987; Yow et al., 1988). Как уже упоминалось, углеводные группы молекулы ламинина узнаются и другими белками. Эти рецепторы обладают различным сродством к ламинину, что имеет большое значение для их функционирования (Horwitz et al., 1985). Так, например, интегрин α3β1 фибробластов имеет относительно низкое сродство к ламинину ($K_d = 10^{-6}$ М), тогда как сродство к ламинину рецептора ламинина эпителиальных клеток значительно выше ($K_d = 2 \cdot 10^{-9}$ М). Соответствующий рецептор может иметь существенное значение при использовании клеткой ламинина либо в составе базальной мембраны (при этом сродство рецептора должно быть высоким), либо в качестве субстрата для миграции (при этом используются рецепторы с низким сродством).

Дифференциальная адгезия как результат действия множественных адгезионных систем

Каждую из перечисленных выше адгезионных систем мы обсуждали как отдельную самостоятельную единицу, однако, судя по всему, морфогенетические процессы взаимодействия между клетками осуществляются в результате совместного действия разных молекул клеточной адгезии. Адгезию аксонов к культивируемым мышечным клеткам можно ингибировать только при внесении целого комплекса антител, направленных против N-МКА, N-кадгерина и интегрина (Chuong et al., 1987). Было также обнаружено (Bixby et al., 1987, 1988), что миграция нейронов по клеткам мозжечка регулируется специфическими комбинациями Ng-МКА, N-кадгерина и интегрина, действие которых проявляется на разных уровнях мозжечка. Первичное прикрепление бластоцисты мыши к стенке матки, по-видимому, также опосредовано несколькими адгезионными системами. Во-первых, клетки трофобласта несут рецепторы коллагена и гепарансульфатных протеогликанов эндометрия матки, и нарушение какого-либо одного из этих типов связывания может затруднить имплантацию (Carson et al., 1988; Farach et al., 1987). Во-вторых, было показано (Dutt et al., 1987), что трофобласт может прилипать к клеткам матки благодаря галактозилтрансферазам клеточной поверхности. Субстрат для этой сахаридной МКА – лактозаминогликан – появляется на клетках матки, индуцированных эстрогеном. В-третьих, Кадокава и др. (Kadokawa et al., 1989) обнаружили, что в области имплантации Р- и Е-кадгерины присутствуют и на трофобласте, и на ткани матки.

Значение внеклеточного матрикса для дифференцировки

Для многих клеток процессы морфогенеза коррелируют с экспрессией генов. Возможно, это происходит при участии внеклеточного матрикса. Если клетки Сертоли у крыс, являющиеся основным структурным элементом семенников, культивировать в пластиковых чашках Петри, то они дедифференцируются, образуя плоский монослой клеток. Однако если эти клетки культивируют поверх базальной мембраны (содержащей ламинин, коллаген типа IV, гепарансульфат, нидоген и энтактин), то они образуют монослой цилиндрических клеток, идентичных нормальным клеткам Сертоли семенников (рис. 15.44). Такие клетки Сертоли содержат хорошо сформированный цитоскелет и базально расположенные контакты, что характерно для клеток in vivo; кроме того, уровень

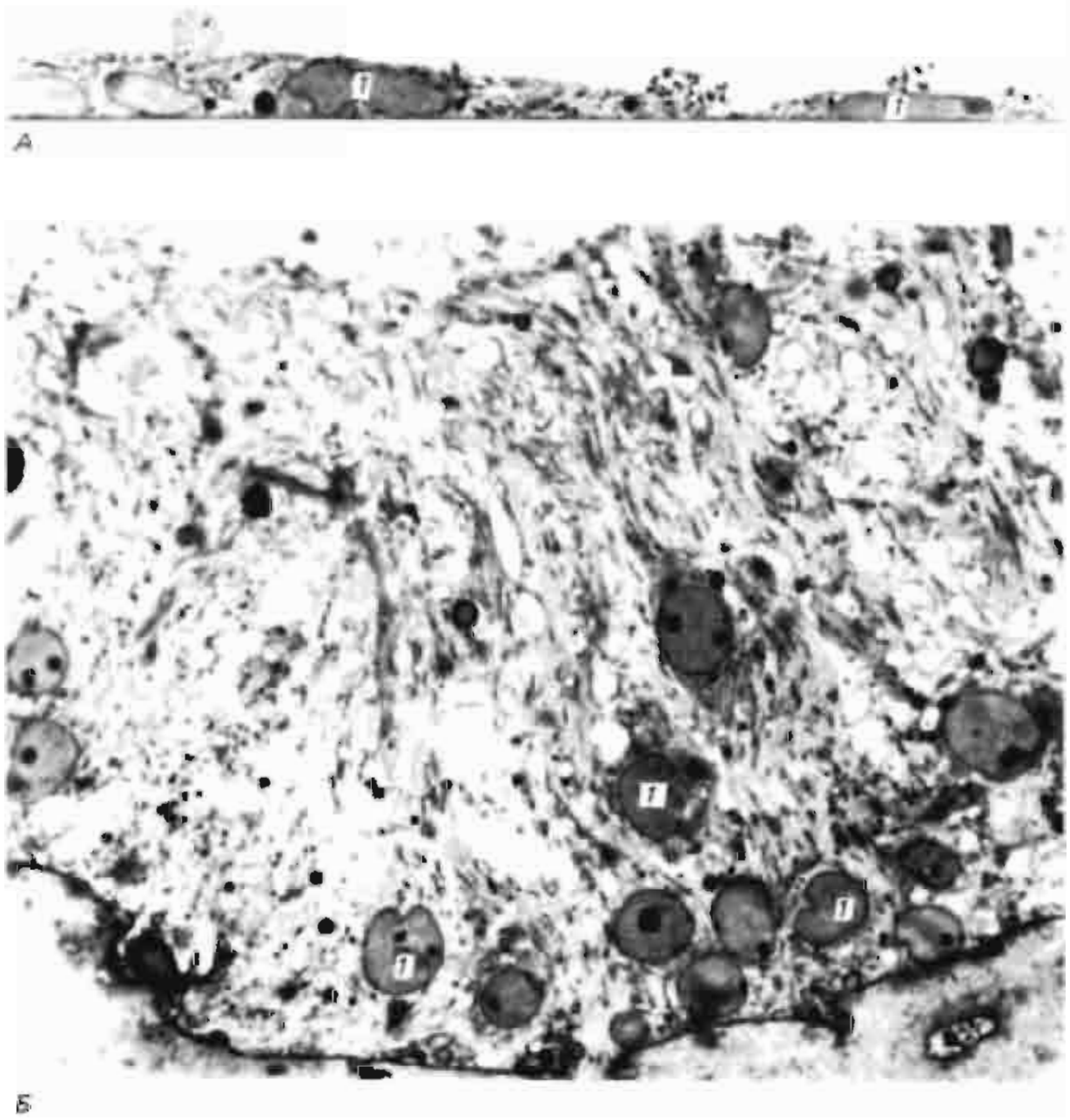


Рис. 15.44. Базальная пластинка и клеточная дифференцировка. Микрофотография, полученная с помощью светового микроскопа, клеток Сертоли мыши (*1*), растущих в течение двух недель (*А*) на пластиковых чашках, и (*Б*) на таких же чашках, покрытых веществом базальной пластинки. Фотографии сделаны при одном и том же увеличении – 1200. (Из Hadley et al., 1985; фотографии с любезного разрешения M. Dym.)

синтеза андроген-связывающего белка и трансферрина в клетках, растущих на базальной мембране, значительно выше (Hadley et al., 1985).

Такой тип дифференцировки, индуцированный матриксом, обнаружен и в некоторых других случаях и может быть вызван фиксацией рецепторов клеточной поверхности на одной стороне клетки. Как будет показано в следующем разделе, изменение положения этих молекул клеточной мембраны может повлечь за собой глубокие изменения внутри клетки.

Контактные модификации и морфогенез

Наличие внеклеточного матрикса может приводить либо к разъединению клеток, либо к их объединению. Если связь клеток осуществляется посредством внеклеточного матрикса, то базальная пластинка обычно формируется только на одной стороне. Такое расположение позволяет прилежащим клеткам контактировать и взаимодействовать посредством своих боковых поверхностей. Существуют три основных типа специализированных клеточных контактов: плотные контакты, десмосомы и щелевые контакты.

Плотные контакты обеспечивают наиболее тесные клеточные взаимодействия (рис. 15.45, *А*); они используются для разделения внеклеточного пространства на отдельные отсеки, или компартменты. Эту способность формировать компартменты мы уже отмечали ранее, когда речь шла о плотных контактах, образуемых наружными клетками бластоцисты млекопитающих.

Плотный контакт (иногда он называется зоной замыкания) может разделить плазматическую мембрану на функциональные области. В эпителии почки и кишки, например, имеет место асимметричное распределение интегральных мембранных белков. Пищеварительные гидролазы и фосфатазы локализованы на апикальной поверхности просвета, тогда как кальциевые и натриевые насосы локализуются на базальной клеточной мембране. Если разрушить плотные контакты понижением концентрации ионов кальция при культивировании этих клеток, то апикальные и базальные белки мембран получат возможность смешиваться (Ziomek et al., 1980; Palade, 1985).

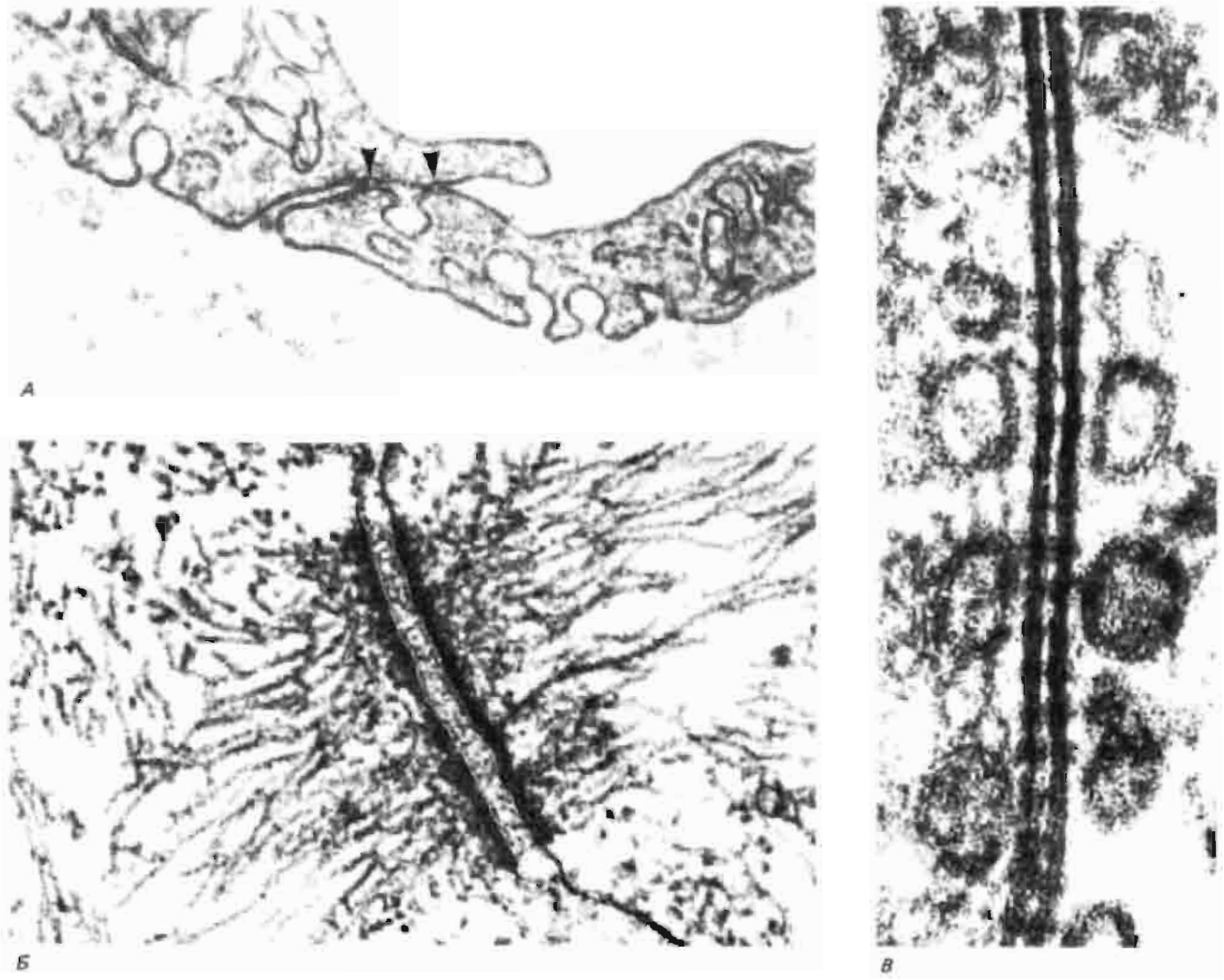


Рис. 15.45. Специализация мембраны в месте контакта двух клеток. *А*. Плотные контакты. Две соседние эндотелиальные клетки сближаются и их мембраны сливаются (стрелки), образуя плотное соединение. *Б*. Десмосомы. Электронная микрофотография десмосом двух соседних клеток из эпидермиса тритона. В обеих клетках можно видеть белковое утолщение, межклеточное пространство заполнено гликопротеиновым матриксом. *В*. Щелевые контакты. Электронная микрофотография области щелевого контакта между двумя противолежащими клетками. Структуры, напоминающие бусины, образованы рядами контактных белков, формирующих туннели между клетками. (*А* – с любезного разрешения J. Rash; *Б* – из Kelly, 1966; *В* – из Peracchia, Dulhunty, 1976.)

Десмосомы часто встречаются в тех случаях, когда клетки соединяются для формирования непроницаемой ткани. В цитоплазме прилежащих клеток обнаруживаются локальные утолщения, образованные фибриллярным белком. Ширина промежутка между клетками составляет 200–350 нм и заполнено гликопротеиновым цементом (рис. 15.45, *Б*). Клетки, соединенные посредством десмосом, отделить друг от друга очень трудно.

Щелевые контакты можно обнаружить между прилежащими клетками многих типов, находящимися на расстоянии от 20 до 40 нм. Это пространство пересекают тончайшие отростки (рис. 15.45, *В*), которые служат не для разделения компартментов, а для коммуникации клеток друг с другом. Клетки, связанные коммуникационными каналами, называются «сопряженными»; они могут обмениваться друг с другом небольшими молекулами и ионами. У большинства зародышей по крайней мере ранние бластомеры связаны щелевыми контактами, в результате чего небольшие растворимые молекулы и ионы свободно проходят между ними. И снова мы можем обратиться к уже обсуждавшимся примерам: так, клетки внутренней клеточной массы зародышей мле-

копитающих сопряжены посредством щелевых контактов, а в ходе развития некоторых моллюсков щелевые контакты формируются в точно определенное время, когда возникает необходимость передачи информации от одного бластомера к другому.

О значении щелевых контактов в развитии можно судить по результатам сравнительно недавно проведенных опытов на зародышах амфибий и млекопитающих. Когда в один из бластомеров 8-клеточной бластулы *Xenopus* путем микроинъекции вводили антитела к белкам щелевых контактов, то потомки этой клетки, обычно связанные посредством щелевых контактов, не могли больше обмениваться ионами и малыми молекулами. Головастики, развившиеся из обработанных таким способом бластул, оказались дефектными, и эти дефекты развития были специфически связаны с судьбой инъецированной клетки (рис. 15.46). Потомство такой клетки не погибало, но оказывалось не способно следовать по нормальному пути развития (Warner et al., 1984). В некомпактизованном и в компактизованном зародыше мыши все 8 бластомеров связаны друг с другом посредством щелевых контактов. Если контакты некомпактизованных зародышей блокировать соответствующими антителами, то клетки продолжат деления, но компактизации не произойдет (Lo, Gilula, 1979; Lee et al., 1987). Таким образом, щелевые контакты, по-видимому, играют существенную роль в сообщении клеткам важной для развития информации.

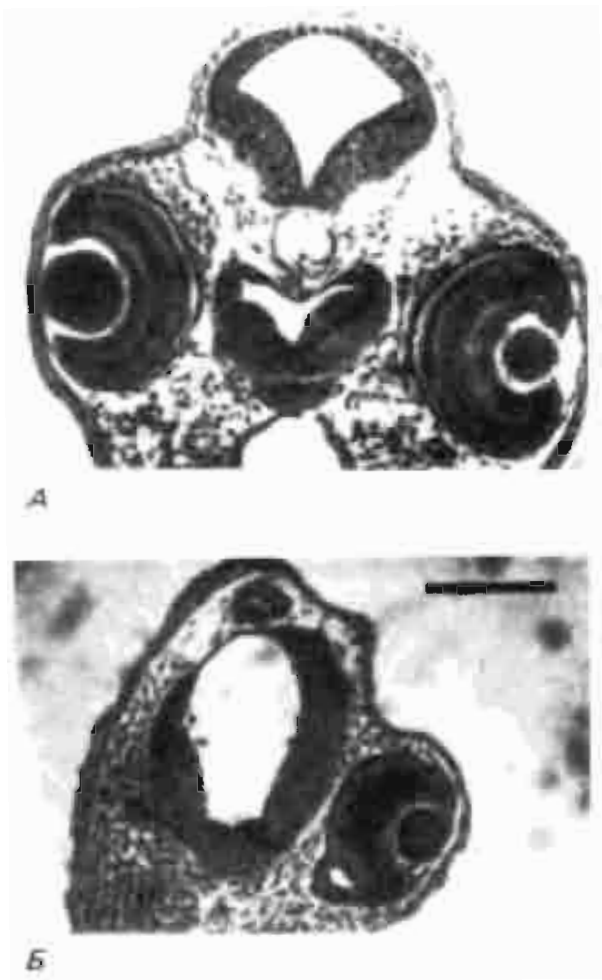


Рис. 15.46. Влияние щелевых контактов на развитие. Срез через головастика *Xenopus*, у которого в один из бластомеров на 8-клеточной стадии инъецировали (*А*) контрольные антитела или (*Б*) антитела против белка щелевого контакта. Сторона, образованная потомками этого бластомера, не имеет глаза и характеризуется аномальным строением мозга. (Из Warner et al., 1984; фотографии с любезного разрешения A. E. Warner.)

В 1782 году французский эссеист Дени Дидро описал проблему морфогенеза, возникшую в горячечном бреду у известного физика, которому казалось, что тело образовано мириадами «крошечных чувствительных телец», но который никак не мог понять, каким образом этот агрегат может стать организмом. Результаты современных исследований показали, что упорядоченность обусловлена молекулами на поверхности самих клеток. В следующих главах мы более подробно рассмотрим некоторые из этих морфогенетических взаимодействий.

ЛИТЕРАТУРА

Abercrombie M., Ambrose E. J. (1958). Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. Exp. Cell Res., **15,** 332–345.

Armstrong P. B. (1985). The control of cell motility during embriogenesis. Cancer Metas. Rev., **4,** 59–80.

Balsamo J., Lilien J. (1974). Functional identification of three components which mediate tissue-type specific embryonic cell adhesion. Nature, **251,** 522–524.

Balsamo J., Lilien J. (1975). The binding of tissue-specific adhesive molecules to the cell surface. A Molecular basis for specificity. Biochemistry, **14,** 167–171.

Balsamo J., Lilien J. (1980). Properties of a β-N-acetylgalactosaminyltransferase and its mobilization from an endogenous pool to cell surface of embryonic chick neural retina cells. Biochemistry, **19,** 2479–2484.

Balsamo J., Pratt R. S., Emmerling M. R., Grunwald G. B., Lilien J. (1986a). Identification of the chick neural retina cell surface N-acetylgalactosaminyltransferase using monoclonal antibodies. J. Cell Biochem., **32,** 125–141.

Balsamo J., Pratt R. S., Lilien J. (1986b). Chick neural retina N-acetylgalactosaminyltransferase/acceptor complex: Catalysis involves transfer of N-acetylgalactosamine phosphate to endogenous acceptors. Biochemistry, **25,** 5402–5407.

Bastiani M. J., Doe C. Q., Helfand S. L., Goodman C. S. (1985). Neuronal specificity and growth cone guidance in the grasshopper and *Drosophila* embryos. Trends Neurosci., **8,** 257–266.

Bastiani M. J., Harrelson A. L., Snow P. M., Goodman C. S. (1987). Expression of fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper. Cell, **48,** 745–755.

Bayna E. M., Runyan R. B., Scully N. F., Lopez L. C., Reichner J., Shur B. D. (1986). Cell surface receptors during mammalian fertilization and development. Mol. Cell. Biochem., **72,** 141–151.

Beckerle M. C., Burridge K., DeMartino G. N., Croall D. E. (1987). Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates and sites of adhesion. Cell, **51,** 569–577.

Bendori R., Salomon D., Geiger B. (1987). Contact-dependent regulation of vinculin expression in cultured fibroblasts: A study with vinculin-specific cDNA probes. EMBO J., **6,** 2897–2905.

Berman P. and 8 others. (1987). Sequence analysis, cellular

localization, and expression of a neuroretina adhesion cell survival molecule, Cell, **51,** 135–142.
Bixby J., Pratt R., Lilien J., Reichardt L. F. (1987). Neurite outgrowth on muscle cell surfaces involves extracellular matrix receptors as well as Ca^{2+}-dependent and -independent cell adhesion molecules, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84,** 2555–2559.
Borgens R. B. (1982). What is the role of naturally produced electric current in vertebrate regeneration and healing? Int. Rev. Cytol., **76,** 245–300.
Boucaut J. C. (1974). Etude autoradiographique de la distribution de cellules embryonnaires isolées, transplantées dans le blastocèle chez *Pleurodeles waltii* Michah (Amphibien, Urodele), Ann. Embryol. Morphol., **7,** 7–50.
Boucaut J. C., Darribère T., Poole T. J., Aoyama H., Yamada K. M., Thiery J.-P. (1984). Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: A competitive peptide inhibitor of fibronectin function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryos, J. Cell Biol., **99,** 1822–1830.
Boyse E. A., Old L. J. (1969). Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics, Annu. Rev. Genet., **3,** 269–289.
Brackenbury R., Thiery J.-P., Rutishauser U., Edelman G. M. (1977). Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. Immunological assay for molecules involved in cell-cell binding, J. Biol. Chem., **252,** 6835–6840.
Carter S. B. (1967). Haptotaxis and the mechanism of cell motility, Nature, **213,** 256–260.
Champion S., Imhof B. A., Savagnier P., Thiery J.-P. (1986). The embryonic thymus produces chemotactic peptides involved in the homing of hemopoietic precursors, Cell, **44,** 781–790.
Chen L. B. (1977). Alteration in cell surface LETS protein during myogenesis, Cell, **10,** 393–400.
Chen W.-T., Hasegawa E., Hasegawa T., Weinstock C., Yamada K. M. (1985). Development of cell surface linkage complexes in cultured fibroblasts, J. Cell Biol., **100,** 1103–1114.
Cheney C. M., Lash J. W. (1981). Diversification within embryonic chick somites: Differential response to notochord, Dev. Biol., **81,** 288–298.
Chuong C.-M., Crossin K. L., Edelman G. M. (1987). Sequential expression and differential function of multiple adhesion molecules during the formation of cerebellar cortical layers, J. Cell Biol., **104,** 331–342.
Chuong C.-M., Edelman G. M. (1985a). Expression of cell adhesion molecules in embryonic induction: I. Morphogenesis of nestling feathers, J. Cell Biol., **101,** 1009–1026.
Chuong C.-M., Edelman G. M. (1985b). Expression of cell adhesion molecule in embryonic induction: II. Morphogenesis of adult feathers, J. Cell Biol., **101,** 1027–1043.
Cooper M. S., Schliwa M. (1985). Electrical and ionic controls of tissue cell locomotion in DC electric fields, J. Neurosci. Res., **13,** 223–244.
Crawford K., Stocum D. L. (in press). Retinoic acid coordinately proximalizes regenerate pattern and blastema differential affinity in axolotl limbs, Dev. Biol.
Crossin K. L., Chuong C.-M., Edelman G. M. (1985). Expression sequences of cell adhesion molecules, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82,** 6942–6946.
Cummings R. D., Cebula T. A., Roth S. (1979). Characterization of a galactosyltransferase in plasma membrane-enriched fractions from BALB/c 3T12 cells, J. Biol. Chem., **254,** 1233–1240.
Cunningham B. A., Hoffman S., Rutishauser U., Hemperly J. J., Edelman G. M. (1982). Molecular topography of the neural cell adhesion molecule N-CAM: Surface orientation and location of sialic acid-rich and binding regions, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80,** 3116–3120.
Curtis A. S. G. (1969). The measurement of cell adhesiveness by an absolute method, J. Embryol. Exp. Morphol., **22,** 305–325.
Damsky C. H., Knudsen K. A., Bradley D., Buck C., Horwitz A. F. (1985). Distribution of the cell substratum attachment (CSAT) antigen on myogenic and fibroblastic cells culture, J. Cell Biol., **100,** 1528–1539.
Daniloff J. K., Chuong C.-M., Levi G., Edelman G. M. (1986). Differential distribution of cell adhesion molecules during histogenesis of the chick nervous system, J. Neurosci., **6,** 739–758.
DePetris S. (1974). Inhibition and reversal of capping by cytochalasin B, vinblastine, and colchicine, Nature, **250,** 54–56.
Diderot D. (1782). D'Alembert's Dream. In: J. Barzun and R. H. Bowen (eds.), Rameau's Nephew and Other Works (1956). Doubleday, Garden City, NY, p. 114.
Dufour S., Duband J.-L., Thiery J.-P. (1986). Role of a major cell-substratum adhesion system in cell behavior and morphogenesis, Biol. cell, **58,** 1–14.
Dutt A., Tang T.-P., Carson D. D. (1987). Lactosaminoglycans are involved in uterine epithelial cell adhesion in vitro, Dev. Biol., **119,** 27–37.
Edelman G. M. (1976). Surface modulation in cell recognition and growth, Science, **192,** 218–226.
Edelman G. M. (1985). Expression of cell adhesion molecules during embryogenesis and regeneration, Exp. Cell Res., **161,** 1–16.
Edelman G. M. (1986a). Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and pattern, Annu. Rev. Cell Biol., **2,** 81–116.
Edelman G. M. (1986b). Cell adhesion molecules in neural histogenesis, Annu. Rev. Physiol., **48,** 417–430.
Edelman G. M., Gallin W. J., Delouvée A., Cunningham B. A., Thiery J.-P. (1983). Early epochal maps of two different cell adhesion molecules, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80,** 4384–4388.
Edelman G. M., Thiery J.-P. (1985). The Cell in Contact: Adhesions and Junctions as Morphogenic Determinants, Wiley, New York.
Erikson C. A., Tosney K. W., Weston J. A. (1980). Analysis of migratory behavior of neural crest and fibroblastic tissues, Dev. Biol., **77,** 142–156.
Fink R., McClay D. R. (1985). Three cell recognition changes accompany the ingression of sea urchin primary mesenchyme cells, Dev. Biol., **107,** 66–74.
Frye L. D., Edidin M. J. (1970). The rapid intermixing of cell surface antigens after the formation of mouse–human heterokaryons, J. Cell Sci., **7,** 319–335.
Furcht L. T., Mosher D. F., Wendelschafer-Crabb G. (1978). Immunocytochemical localization of fibronectin (LETS protein) on the surface of L6 myoblasts: Light and electron microscope studies, Cell, **13,** 263–271.
Giudice G. (1962). Restitution of whole larvae from disaggregated cells of sea urchin embryos, Dev. Biol., **5,** 402–411.
Gordon M. K., Gerecke D. R., Olsr B. R. (1987). Type XII collagen: Distinct extracellular matrix component discovered by DNA cloning, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84,** 6040–6044.
Grunwald G. B., Kornguth S. E., Towfighi J., Sassani J., Simmonds M. A., Housman C. M., Papadopoulos N. (1987). Autoimmune basis for visual paraneoplastic syndrome in patients with small cell lung carcinoma, Cancer, **60,** 780–786.
Grunwald G. B., Simmonds M. A., Klein R., Kornguth S. E. (1985). Autoimmune basis for visual paraneoplastic syndrome in patients with small-cell lung carcinoma, Lancet 1985, 658–661.
Hadler N. M., Dourmash R. R., Nermut M. V., Williams L. D. (1982). Ultrastructure of a hyaluronic acid matrix, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79,** 307–309.
Hadley M. A., Byers S. W., Suárez-Quian C. A., Kleinman H. K., Dym M. (1985). Extracellular matrix regulates Sertoli cell differentiation, testicular cord formation, and germ cell development in vitro, J. Cell Biol., **101,** 1511–1522.
Hakamori S., Fukuda M., Sekiguchi K., Carter W. G. (1984). Fibronectin, laminin, and other extracellular glycoproteins.

In: K. A. Piez and A. H. Reddi (eds.), Extracellular Matrix Biochemistry, Elsevier, New York, pp. 229–275.
Hall A. K., Rutishauser U. (1987). Visualization of neural cell adhesion molecule by electron microscopy, J. Cell Biol., **104,** 1579–1586.
Harris A. K. (1973). Behavior of cultured cells on substrate of various adhesiveness, Exp. Cell Res., **77,** 285–297.
Harris A. K. (1980). Silicone rubber substrate: A new wrinkle in the study of cell locomotion, Science, **208,** 176–179.
Harris A. K. (1984). In: W. Jager, J. D. Murray (eds.), Modeling of Patterns in Time and Space, Springer-Verlag, Berlin, p. 104.
Harris H. (1954). Role of chemotaxis in inflammation, Physiol. Rev., **34,** 529–562.
Hatta K., Takeichi M. (1986). Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development, Nature, **320,** 447–449.
Hatta K., Takagi S., Fujisawa H., Takeichi M. (1987). Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos, Dev. Biol., **120,** 215–227.
Hausman R. E., Moscona A. A. (1976). Purification and characterization of the retina-specific cell-aggregation factor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72,** 916–920.
Heasman J., Hines R. D., Swan A. P., Thomas V., Wylie C. C. (1981). Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: The role of fibronectin in their adhesion during migration, Cell, **27,** 437–447.
Hinkle L., McCaig C. D., Robinson K. R. (1981). The direction of growth of differentiating neurons and myoblasts from frog embryos in an applied electric field, J. Physiol., **314,** 121–135.
Hirokawa N., Cheney R. E., Willard M. (1983). Localization of a protein of the fodrin-spectrin-TW260/240 family on the mouse intestinal brush border, Cell, **32,** 953–965.
Hoffman S. B., Edelman G. M. (1983). Kinetics of homophilic binding by E and A forms of the neural cell adhesion molecule, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80,** 5762–5766.
Horwitz A., Duggan K., Buck C., Beckerle M. C., Burridge K. (1986). Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-A transmembrane linkage, Nature, **320,** 531–533.
Horwitz A., Duggan K., Greggs R., Decker C., Buck C. (1985). The cell substrate attachment (CSAT) antigen has properties of a receptor for laminin and fibronectin, J. Cell Biol., **101,** 2134–2144.
Humphries M. J., Akiyama S. K., Komoriya A., Olden K., Yamada K. M. (1986). Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediates cell-type specific binding, J. Cell Biol., **103,** 2637–2647.
Ingvar S. (1920). Reactions of cells to galvanic current in tissue cultures, Proc. Am. Soc. Exp. Biol. Med., **17,** 198–199.
Jaffe L. F. (1981). The role of ionic current in establishing developmental pattern, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, **295,** 553–566.
Jaffe L. F., Poo M.-M. (1979). Neurites grow faster toward the cathode than the anode in a steady field, J. Exp. Zool., **209,** 115–128.
Jaffe L. F., Stern C. D. (1979). Strong electrical currents leave the primitive streak of chick embryos, Science, **206,** 569–571.
Kelly D. E. (1966). Fin structure of desmosomes, hemidesmosomes, and an adepidermal globular layer in developing newt epidermis, J. Cell Biol., **28,** 51–72.
Knudsen K., Horwitz A. F., Buck C. (1985). A monoclonal antibody identifies a glycoprotein complex involved in cell-substratum adhesion, Exp. Cell Res., **157,** 218–226.
Köhler G., Milstein C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, **256,** 495–497.
Lazarides E. (1976). Actin, α-actin, and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells, J. Cell Biol., **68,** 202–219.
Lee S., Gilula N. B., Warner A. E. (1987). Gap junctional communication and compaction during preimplantation stages of mouse development, Cell, **51,** 851–860.
Leptin M. (1986). The fibronectin receptor family, Nature, **321,** 728.
Lewis C. A., Pratt R. M., Pennypacker J. P., Hassell J. R. (1978). Inhibition of limb hondrogenesis in vitro by vitamin A: Alteration in cell surface characteristics, Dev. Biol., **64,** 31–47.
Lilien J., Ratz R. (1977). A multicomponent model for specific cell adhesion. In: J. W. Lash and M. M. Burgess (eds.), Cell and Tissue Interactions, Raven, New York, pp. 187–195.
Liotta L. A., Hand P. H., Rao C. N., Bryant G., Barsky S. H., Schlom J. (1985). Monoclonal antibodies to the human laminin receptor recognize structurally distinct sites, Exp. Cell Res., **156,** 117–126.
Lo C., Gilula N. B. (1979). Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo, Cell, **18,** 399–409.
McClay D. R., Ettensohn C. A. (1987). Cell recognition during sea urchin gastrulation. In: W. F. Loomis (ed.), Genetic Regulation of Development, Allan R. Liss, New York, pp. 111–128.
Merrell R., Glaser L. (1973). Specific recognition of plasma membranes by embryonic cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70,** 2794–2798.
Monroy A., Moscona A. A. (1979). Introductory Concepts in Developmental Biology, University of Chicago Press, Chicago.
Mooseker M. S., Tilney L. G. (1975). Organization of an actin filament-membrane complex: Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells, J. Cell Biol., **67,** 725–743.
Moscona A. A. (1952). Cell suspension from organ rudiments of chick embryos, Exp. Cell Res., **3,** 535–539.
Moscona A. A. (1961). Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells: A quantifiable approach to cell interaction in vitro, Exp. Cell Res., **22,** 455–475.
Nagafuchi A., Shirayoshi Y., Okazaki K., Yasuda K., Takeichi M. (1987). Transformation of cell adhesion properties of exogenously introduced E-cadherin cDNA, Nature, **329,** 341–343.
Nardi J. B., Stocum D. L. (1983). Surface properties of regenerating limb cells: Evidence for gradation along the proximodistal axis, Differentiation, **25,** 27–31.
Nicolson G. L. (1976). Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells, Biochim Biophys. Acta, **457,** 57–108.
Nose A., Takeichi M. (1986). A novel cadherin adhesion molecule: Its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos, J. Cell Biol., **103,** 2649–2658.
Nuccitelli R. (1984). The involvement of transcellular ion currents and electric fields in pattern formation. In: G. M. Malacinski (ed.), Pattern Formation: A Primer in Developmental Biology, Macmillan, New York, pp. 23–46.
Nuccitelli R., Erickson C. A. (1983). Embryonic cell motility can be guided by physiological electric fields, Exp. Cell Res., **147,** 195–201.
Orkin R. W., Knudson W., Toole P. T. (1985). Loss of hyaluronate-dependent coat during myoblast fusion, Dev. Biol., **107,** 527–530.
Palade G. E. (1985). Differentiated microdomains in cellular membranes: Current status. In: G. M. Edelman and J.-P. Thiery (eds.), The Cell in Contact, Wiley, New York, pp. 9–24.
Pennypacker J. P., Hassell J. R., Yamada K. M., Pratt R. M. (1979). The influence of an adhesive cell surface protein on chondrogenic expression in vitro, Exp. Cell Res., **121,** 411–415.
Peracchia C., Dulhunty A. F. (1976). Low resistance junctions in

crayfish: Structural changes with functional uncoupling, J. Cell Biol., **70,** 419–439.
Pierce M., Turley E.A., Roth S. (1980). Cell surface glycosyltransferase activities, Int. Rev. Cytol., **65,** 1–47.
Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. (1984). The cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, Nature, **309,** 30–33.
Podleski T.R., Greenberg I., Schlessinger J., Yamada K.M. (1979). Fibronectin delays the fusion of L6 myoblasts, Exp. Cell Res., **122,** 317–326.
Poole T.J., Steinberg M.S. (1982). Evidence for the guidance of pronephric duct migration by a craniocaudally traveling adhesive gradient, Dev. Biol., **92,** 144–158.
Porzig E.F. (1978). Galactosyltransferase activity on intact neural retinal cells from the embryonic chicken, Dev. Biol., **67,** 114–136.
Radice G.P. (1980). The spreading of epithelial cells during wound closure in *Xenopus laevis*, Dev. Biol., **76,** 26–46.
Ratner N., Bunge R.P., Glaser L. (1985). A neuronal cell surface heparan sulfate proteoglycan is required for dorsal root ganglion neuron stimulation of Schwann cell proliferation, J. Cell Biol., **101,** 744–754.
Rieger F., Grument M., Edelman G.M. (1985). N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction, J. Cell Biol., **101,** 285–293.
Rosario R.A., Delouvée A., Yamada K.M., Timpl R., Thiery J.-P. (1983). Neural crest cell migration: Requirements for exogenous fibronectin and high cell density, J. Cell Biol., **96,** 462–473.
Roseman S. (1970). The synthesis of complex carbohydrates by multi-glycosyltransferase systems and their potential in intercellular adhesion, Chem. Phys. Lipids., **5,** 270–297.
Roth S., McGuire E.J., Roseman S. (1971a). An assay for intercellular adhesive specificity, J. Cell Biol., **51,** 525–535.
Roth S., McGuire E.J., Roseman S. (1971b). Evidence for cell-surface glycosyltransferases: Their potential role in cellular recognition, J. Cell Biol., **51,** 536–551.
Runyan R.B., Maxwell G.D., Shur B.D. (1986a). Evidence for a novel enzymatic mechanism of neural crest cell migration on extracellular glycoconjugate matrices, J. Cell Biol., **102,** 432–441.
Runyan R.B., Vrsalovic J., Shur B.D. (1986b). Cell surface galactosyltransferase as a laminin receptor, J. Cell Biol., **103,** 260a.
Ruoslahti E., Pierschbacher M.D. (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, Science, **238,** 491–497.
Rutishauser U., Hoffman S., Edelman G.M. (1982). Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79,** 685–689.
Rutishauser U., Jessell T.M. (in press). Cell adhesion molecules in vertebrate neural development, Physiol. Rev.
San Antonio J.D., Winston B.M., Tuan R.S. (1987). Regulation of chondrogenesis by heparan sulfate and structurally related glycosaminoglycans, Dev. Biol., **123,** 17–24.
Shaper N.L., Munn P.L., Shaper J.H. (1985). Cell surface galactosyltransferase: Immunochemical localization, J. Cell Biochem., **28,** 229–239.
Shur B.D. (1977a). Cell surface glycosyltransferases in gastrulating chick embryos. I. Temporally and spatially specific patterns of four endogenous glycosyltransferase activities, Dev. Biol., **58,** 23–29.
Shur B.D. (1977b). Cell surface glycosyltransferases in gastrulating chick embryos. II. Biochemical evidence for a surface localization of endogenous glycosyltransferase activities, Dev. Biol., **58,** 40–55.
Shur B.D. (1982). Cell surface glycosyltransferase activities during normal and mutant (*T/T*) mesenchyme migration, Dev. Biol., **91,** 149–162.
Shur B.D., Oettgen P., Bennett D. (1979). UDP galactose inhibits blastocyst formation in the mouse: Implications for the mode of actin of *T/t*-complex mutations, Dev. Biol., **73,** 178–181.
Singer S.J., Nicolson G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, Science, **175,** 720–731.
Spiegel M., Spiegel E.S. (1975). Reaggregation of dissociated embryonic sea urchin cells, Am. Zool., **15,** 583–606.
Steinberg M.S. (1964). The problem of adhesive selectivity in cellular interactions. In: M. Locke (ed.), Cellular Membranes in Development, Academic, New York, pp. 321–434.
Steinberg M.S. (1970). Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells, J. Exp. Zool., **173,** 395–434.
Steinberg M.S. (1987). Lecture to the Mid-Atlantic Regional Developmental Biology Society, April 1987.
Steinberg M.S., Poole T.J. (1982). Cellular adhesive differentials as determinants of morphogenetic movements and organ segregation. In: S. Subtelny and P.B. Green (eds.), Developmental Order: Its Origin and Regulation, Alan R. Liss, New York, pp. 351–378.
Stocum D.L. (1986). Retinoids: Probes for understanding pattern regulation in regenerating amphibian limbs. In: R.M. Gorczynski (ed.), Receptors in Cellular Developmental Processes, Academic, New York, pp. 165–181.
Stopak D., Harris A.K. (1982). Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations, Dev. Biol., **90,** 383–398.
Takeichi M. (1987). Cadherins: A molecular family essential for selective cell–cell adhesion and animal morphogenesis, Trends Genet., **3,** 213–217.
Takeichi M., Ozaki H.S., Tokunaga K., Okada T.S. (1979). Experimental Manipulation of cell surface to affect cellular recognition mechanisms, Dev. Biol., **70,** 195–205.
Tamkun J.W., DeSimone D.W., Fonda D., Patel R.S., Buck C., Horwitz A.F., Hynes R.O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in transmembrane linkage between fibronectin and actin, Cell, **46,** 271–282.
Thiery J.-P., Delouvée A., Gallin W.J., Cunningham B.A., Edelman G.M. (1985). Initial appearance and regional distribution of the neuron–glia cell adhesion molecule of the chick embryo, J. Cell Biol., **100,** 442–456.
Thompson L.K., Horowitz P.M., Bentley K.L., Thomas D.D., Alderman J.F., Klebe R.J. (1986). J. Biol. Chem., **261,** 5209–5214.
Toole B.P. (1976). Morphogenetic role of glycosaminoglaycans (acid mucopolysaccarides) in brain and other tissue. In: S.H. Barondes (ed.), Neuronal Recognition, Plenum, New York, pp. 276–329.
Townes P.L., Holtfreter J. (1955). Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells, J. Exp. Zool., **128,** 53–120.
Trinkaus J.P. (1963). The cellular basis of *Fundulus* epiboly. Adhesivity of blastula cells in culture, Dev. Biol., **7,** 513–532.
Trinkaus J.P. (1985). Further thoughts on directional cell movement during morphogenesis, J. Neurosci. Res., **13,** 1–19.
Turley E.A., Roth S. (1979). Spontaneous glycosylation of glycosaminoglycan substrates by adherent fibroblasts, Cell, **17,** 109–115.
Tyler A. (1946). An auto-antibody concept of cell structure, growth, and differentiation, Growth 10 (Symposium 6), 7–19.
Ukena T.E., Berlin R.D. (1972). Effects of colchicine and vinblastine on the topological separation of membrane functions, J. Exp. Med., **136,** 1–7.
Venkatesh T.R., Zipursky S.L., Benzer S. (1985). Molecular analysis of the development of the compound eye in *Drosophila*, Trends Neurosci., **8,** 251–257.
Vuorio E. (1986). Connective tissue diseases: Mutations of collagen genes, Ann. Clin. Res., **18,** 234–241.
Warner A.E., Guthrie S.C., Gilula N.B. (1984). Antibodies to gap junctional protein selectively disrupt junctional communica-

tion in the early amphibian embryo, Nature, **311,** 127–131.
Weiss P. (1934). In vibro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber, J. Exp. Zool., **68,** 393–448.
Weiss P. (1945). Experiments on cell and axon orientation in vitro: The role of colloidal exudates in tissue organization, J. Exp. Zool., **100,** 353–386.
Weiss P. (1947). The problem of specificity in growth and development, Yale J. Biol. Med., **19,** 235–278.
Weiss P. (1955). Nervous system. In: B.H. Willer, P. Weiss and V. Hamburger (eds.), Analysis of Development, Saunders, Philadelphia, pp. 346–401.
West C.M., Lanza R., Rosenbloom J., Lowe M., Holtzer H., Avdalovic N. (1979). Fibronectin alters the phenotypic properties of cultured chick embryo chondroblasts, Cell, **17,** 491–501.
Whaley W.G., Dauwalder M., Kephart J.E. (1972). Golgi apparatus: Influence on cell surfaces, Science, **175,** 596–599.
Wood A., Thurogood P. (1987). An ultrastructural and morphometric analysis of an in vivo contact guidance system, Development, **101,** 363–381.
Woodruff R.I., Telfer W.H. (1974). Electrical properties of ovarian cells linked by intercellular bridges, N.Y. Acad. Sci., **238,** 408–419.
Yamada K.M., Critchley D.R., Fishman P.H., Moss J. (1983). Exogenous gangliosides enchance the interaction of fibronectin with ganglioside-deficient cells, Exp. Cell Res., **143,** 295–302.
Yamada K.M., Humphries M.J., Hasegawa T., Hasegawa E., Olden K., Chen W.-T., Akiyama S.K. (1985). Fibronectin: Molecular approaches to analyzing cell interactions with the extracellular matrix. In: G.M. Edelman and J.-P. Thiery (eds.), The Cell in Contact, Wiley, New York, pp. 303–332.
Yamada K.M., Kennedy D.W. (1985). Amino acid sequence specificities of an adhesive recognition signal, J. Cell Biochem., **28,** 99–104.
Yelton D.E., Scharff M.D. (1980). Monoclonal antibodies, Am. Sci., **68,** 510–516.
Zackson S.L., Steinberg M.S. (1986). Cranial neural crest cells exhibit directed migration on the pronephric duct pathway: Further evidence for an in vivo adhesion gradient, Dev. Biol., **117,** 342–353.
Zackson S.L., Steinberg M.S. (1987). Chemotaxis or adhesion gradient? Pronephric duct elongation does not depend on distant sources of guidance information, Dev. Biol., **124,** 418–422.
Zigmond S.H. (1978). Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes, J. Cell Biol., **77,** 269–287.
Ziomek C.A., Schulman S., Edidin M. (1980). Redistribution of membrane proteins in isolated mouse intestinal epithelial cells, J. Cell Biol., **86,** 849–857.
Zipursky S.L., Venkatesh T.R., Teplow D.B., Benzer S. (1984). Neuronal development in the *Drosophila* retina: Monoclonal antibodies as molecular probes, Cell, **36,** 15–26.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА К 3-МУ ИЗДАНИЮ

Argraves W.S., Dickerson K., Burgess W.H., Ruoslahti E. (1989). Fibulin, a novel protein that interacts with the fibronectin receptor β subunit cytoplasmic domain, Cell, **58,** 623–629.
Beckerle M.C., Burridge K., DeMartino G.N., Croall D.E. (1987). Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates and sites of adgesion, Cell, **51,** 569–577.
Begovac P.C., Shur B.D. (1990). Cell surface galactosyltransferase mediates the initiation of neurite outgrowth from PC12 cells on laminin, J. Cell Biol., **110,** 461–470.
Bernfield M., Sanderson D. (1990). Syndecan, a morphogenetically regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors, Phil. Trans. Roy. Soc. London (A), **327,** 171–186.
Bixby J.L., Lilien J., Reichardt L.F. (1988). Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro, J. Cell Biol., **107,** 353–361.
Bronner-Fraser M. (1988). Distribution of tenascin during cranial neural crest development of the chick, J. Neurosci. Res., **21,** 135–147.
Brower D.L., Jaffe S.M. (1989). Requirement for integrins during *Drosophila* development, Nature, **342,** 285–287.
Burridge K., Nuckolls G., Otey C., Pavalko F., Simon K., Turner C. (1990). Actin-membrane interactions in focal adhesions, Cell Diff. Dev., In press.
Carson D.D., Tang J.-P., Gay S. (1988). Collagens support embryo attachment and outgrowth in vitro: Effects of the Arg-Gly-Asp sequence, Dev. Biol., **127,** 368–375.
Covault J., Sanes J.R. (1986). Distribution of N-CAM in synaptic and extrasynaptic portions of developing and adult sceletal muscle, J. Cell Biol., **102,** 716–730.
Dufour S., Duband J.-L., Humphries M.J., Obara M., Yamada K.M., Thiery J.P. (1988). Attachment, spreading and locomotion of avian neural crest cells are mediated by multiple adhesion sites on fibronectin molecules, EMBO J., **7,** 2661–2671.
Eckstein D.J., Shur B.D. (1989). Laminin induces the stable expression of surface glycosyltransferases on lamellipodia of migrating cells, J. Cell Biol., **108,** 2507–2517.
Farach M.C., Tang J.P., Decker G.L., Carson D.D. (1987). Heparin heparan sulfate is involved in attachment and spreading of mouse embryos in vitro, Dev., Biol., **123,** 401–410.
Fraser S.E., Carhart M.S., Murray B.A., Chuong C.-M., Edelman G.E. (1988). Alterations in the *Xenopus* retinotectal projection by antibodies to *Xenopus* N-CAM, Dev. Biol., **129,** 217–230.
Fujimori T., Miyatani S., Takeichi M. (1990). Ectopic expression of N-cadherin perturbs histogenesis of *Xenopus* embryos, Development, **110,** 97–104.
Harrelson A.L., Goodman C.S. (1988). Growth cone guidance in insects: Fasciclin-II is a member of the immunoglobulin superfamily, Science, **242,** 700–708.
Hayashi Y., Haimovich B., Reszka A., Boettiger D., Horwitz A. (1990). Expression and function of chicken integrin b1 subunit and its cytoplasmic domain mutants in mouse NIH3T3 cells, J. Cell Biol., **110,** 175–184.
Hemler M.E. (1990). VLA proteins in the integrin family: Structures, functions and their role on leucocytes, Annu. Rev. Immunol., **8,** 365–400.
Hemler M.E., Huang C., Schwartz L. (1987). The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimeres each with a common 130,000 molecular weight β subunit, J. Biol. Chem., **262,** 3300–3309.
Hostikka S.L. (1990). Human type IV collagen, Acta Univ. Oulu.
Kadokawa Y., Fuketa I., Nose A., Takeichi M., Nakatsuji N. (1989). Expression of E- and P-cadherin in mouse embryos and uteri during the periimplantation period, Dev. Growth Diff., **31,** 23–30.
Korhonen M., Ylänne J., Laitinen L., Virtanen I. (1990). The α_1–α_6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron, J. Cell Biol., **111,** 1245–1254.
Lander A.D. (1989). Understanding the molecules of neural cell contacts: Emerging patterns of structure and function, Trends Neurosci., **12,** 189–195.
Landmesser L., Dahm L., Schulz K., Rutishauser U. (1988). Distinct roles for adhesion molecules during innervation of embryonic chick muscle, Dev. Biol., **130,** 645–670.
Leptin M., Bogaert T., Lehmann R., Wilcox M. (1989). The

genesis, function of PS integrins during *Drosophila* embryogenesis, Cell, **56,** 401–408.

Linask K. L., Lash J. M. (1988a). A role for fibronectin in the migration of avian precardiac cells. I. Dose-dependent effects of fibronectin antibody, Dev. Biol., **129,** 315–323.

Linask K. L., Lash J. W. (1988b). A role for fibronectin in the migration of avian precardiac cells. II. Rotation of the heart-forming region during different stages and its effects, Dev. Biol., **129,** 324–329.

Nagafuchi A., Takeichi M. (1989). Transmembrane control of cadherin-mediated cell adhesion: A 94-kDa protein functionally associated with a specific region of cytoplasmic domain of E-cadherin, Cell. Reg., **1,** 37–44.

Nose A., Nagapechi A., Takeichi M. (1988). Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems, Cell, **54,** 993–1001.

Obara M., Kang M. S., Yamada K. M. (1988). Site-directed mutagenesis of the cell-binding domain of human fibronectin: Separable, synergistic sites mediate adhesive function, Cell, **53,** 649–657.

Rutishauser U., Jessell T. M. (1988). Cell adhesion molecules in vertebrate neural development, Physiol. Rev., **68,** 819–857.

Solowska J., Guan J.-L., Marcantonio E. E., Trevithick J. E., Buck C. A., Hynes R. O. (1989). Expression of normal and mutant avian integrin subunits in rodent cells, J. Cell Biol., **109,** 853–861.

Sorokin L., Sonnenberg A., Aumailley M., Timpl R., Ekblom P. (1990). Recognition of the laminin E8 cell binding site by an integrin possessing α_6 subunit is essential for epithelial polarization in developing kidney tubules, J. Cell Biol., **111,** 1265–1273.

Spring J., Beck K., Chiquet-Ehrismann R. (1989). Two contrary functions of tenascin: Dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments, Cell, **59,** 325–334.

Takeichi M. (1987). Cadherins: A molecular family essential for selective cell–cell adhesion and animal morphogenesis, Trends Genet., **3,** 213–217.

Tan S.-S., Crossin K. L., Hoffman S., Edelman G. M. (987). Asymmetric expression of somites of cytotactin and its proteoglycan ligand is correlated with neural crest cell migration, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84,** 7977–7981.

Thesleff I., Vainio S., Jalkanen M. (1989). Cell-matrix interactions in tooth development, Int. J. Dev. Biol., **33,** 91–95.

Tosney K. W., Watanabe M., Landmesser L., Rutishauser U. (1986). The distribution of N-CAM in the chick hindlimb during axon outgrowth and synaptogenesis, Dev. Biol. **114,** 468–481.

Vainio S., Jalkanen M., Lehtonen E., Bernfeld M. (1989). Epithelial-mesenchymal interactions regulate stage-specific expression of a cell surface proteoglycan, syndecan, in the development kidney, Dev. Biol., **134,** 382–391.

Wehrle B., Chiquet M. (1990). Tenascin is accumulated along developing peripheral nerves and allows neurite outgrowth in vivo, Development, **110,** 401–415.

Werb Z., Tremble P., Damsky C. H. (1990). Regulation of extracellular matrix degradation by cell–extracellular matrix interaction, Cell Differ, Dev. [Suppl.], In press.

Wilcox M., DiAntonio A., Leptin M. (1989). The functions of the PS integrins in *Drosophila* wing morphogenesis, Development, **107,** 891–897.

Williams A. F., Barclay A. N. (1988). An Immunoglobulin superfamily: Domains for cell surface recognition, Annu. Rev. Immunol., **6,** 381–405.

Yow H., Wong J. M., Chen H. S., Lee C., Steel G. D., Jr., Chen L. B. (1988). Increased mRNA expression of a laminin-binding protein in human colon carcinoma: Complete sequence of a full-length cDNA encoding the protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85,** 6394–6398.

Глава 16

Ближние тканевые взаимодействия. Вторичная индукция

Стремление к истине гораздо ценнее уверенности в обладании ею.

Г. ЛЕССИНГ (1778)

Имея дело с такой сложной системой, как развивающийся зародыш, бесполезно спрашивать, «детерминирован» ли зачаток того или иного органа и «детерминируют» ли его какие-то одни признаки окружения при исключении влияния со стороны других. Здесь может участвовать множество факторов, действие которых образует сложное переплетение. Чтобы распутать этот клубок, мы должны изучать, каким образом взаимодействует данная система с другими частями зародыша на последовательных стадиях развития, учитывая возможно большее разнообразие экспериментальных условий.

Р. ДЖ. ГАРРИСОН (1933)

Введение

В предыдущей главе мы говорили о том, что клеточная поверхность играет важную роль в обеспечении прилежащих клеток пространственной информацией. В этой и в следующей главах мы обсудим, каким образом клеточные ансамбли влияют на поведение соседних клеточных популяций, в результате чего формируются ткани и органы. Органы представляют собой сложные образования, состоящие из тканей многих типов. Изучая такой орган, как, например, глаз, мы обнаруживаем, что свет, проникая через прозрачную ткань роговицы, фокусируется тканью хрусталика, диаметр которого регулирует мышечная ткань, и, наконец, падает на ткань нейральной сетчатки. Расположение тканей в этом органе нельзя изменить, не нарушив при этом его функции. Такая координация в строении органов достигается благодаря тому, что одна группа клеток может изменить поведение соседнего набора клеток, а именно изменить форму клеток, митотическую активность или дифференцировку.

Взаимодействие на близком расстоянии, или **ближнее взаимодействие,** дает возможность одной группе клеток реагировать на другую группу клеток и, изменившись, часто приобретать способность изменять третий набор клеток. Это явление было названо **вторичной индукцией.**

Инструктивные и разрешающие взаимодействия

Говард Хольцер (Holtzer, 1968) выделил два основных типа ближних тканевых взаимодействий. К первому типу относятся **разрешающие взаимодействия.** При этом отвечающая ткань потенциально готова к экспрессии и нуждается только в определенных условиях, которые разрешили бы экспрессию ее признаков. Многие развивающиеся ткани для своего развития требуют плотного субстрата, содержащего фибронектин или ламинин. Последние не изменяют тип образующихся клеток, а лишь дают этим клеткам возможность экспрессироваться.

Другой тип ближних тканевых взаимодействий – **инструктивные взаимодействия.** При такого рода взаимодействиях изменяется тип отвечающей ткани. Так, в гл. 8 мы обсуждали способность хорды индуцировать формирование будущих клеток дна нервной трубки. На сигнал со стороны хорды способны реагировать все клетки нервной трубки, но индуцируются только ближайшие к хорде. Другие будут дифференцироваться в ином направлении. Кроме того, если у зародыша удалить хорду, то клетки, дающие при нормальном развитии дно будущей нервной трубки, будут дифференцироваться по другому типу, а если зародышу имплантировать

дополнительную хорду сбоку от нервной трубки, то эта новая хорда индуцирует вторичный набор клеток дна будущей нервной трубки. Отвечающие клетки нервной трубки оказываются каким-то образом инструктированными относительно того, что им следует экспрессировать набор генов, отличающийся от набора, который они экспрессировали бы, не окажись в контакте с клетками хорды. Поэтому хорду называют тканью, действующей *инструктивно*. Были предложены (Wessells, 1977) четыре общих правила, характерные для большей части инструктивных взаимодействий.

1. В присутствии ткани А отвечающая на ее воздействие ткань Б развивается в определенном направлении.
2. В отсутствие ткани А отвечающая ткань Б не развивается в этом направлении.
3. В отсутствие ткани А, но в присутствии ткани В ткань Б не развивается в этом направлении.
4. В присутствии ткани А ткань Г, которая в нормальных условиях развивалась бы в ином направлении, изменяясь, развивается как Б.

Компетенция

Следует отметить, однако, что в случае четвертого правила отвечающая ткань должна быть **компетентной** к ответу. Компетенцией называют способность отвечать на индукционный сигнал (Waddington, 1940). Это не пассивное состояние, его приобретение обусловлено определенной активностью ткани. Подробно рассматривая процесс индукции нервной трубки в гл. 8, мы останавливались на наблюдениях, свидетельствующих о том, что эктодерма гаструлы может быть индуцирована дорсальной губой бластопора или производными мезодермы. Таким образом, об эктодерме гаструлы можно сказать, что она **компетентна** к восприятию индукционных стимулов. Эта компетенция для нейральной индукции приобретается на стадиях позднего дробления и утрачивается на стадиях поздней гаструлы. По мере снижения компетенции отвечать на индукционные сигналы дорсальной губы бластопора та же самая эктодерма приобретает компетенцию отвечать на индукторы хрусталика. Позже компетенция к индукторам хрусталика утрачивается, но эктодерма может реагировать на индукторы слуховых плакод (Servetnick, Grainger, 1990). Следовательно, компетенция сама по себе является дифференцированным фенотипом, различающим клетки во времени и в пространстве.

Механизмы, позволяющие клетке становиться компетентной, не известны, но полагают, что компетенция может быть приобретена несколькими способами. Во-первых, клетка может стать компетентной в результате синтеза рецепторов к молекулам индуктора, подобно тому как способность отвечать на гормон, например тироксин, зависит от наличия у клетки рецепторов к этому гормону. Во-вторых, клетка может приобрести компетенцию в результате синтеза молекул, позволяющих рецепторам функционировать. Рецепторы сами по себе могут связать индуктор, но это еще не означает, что они станут функциональными. Функция рецептора часто выражается в направлении сигнала к ядру, подобно тому как связывание лиганда спермия соответствующими рецепторами яйца дает начало целому каскаду таких сигналов. При отсутствии одного из ферментов, участвующих в этом каскаде, сигнал не передается. Поэтому клетка может приобрести компетенцию, синтезируя недостающее звено на пути передачи сигнала.

В-третьих, компетенция может быть приобретена путем репрессии ингибитора. При наличии ингибитора клетка, способная связать индуктор и послать сигнал к ядру, тем не менее не становится индуцированной. Например, индукторы часто вызывают изменение формы клеток (как в случае индукции нервной трубки). Если способность изменять форму будет ингибирована, то клетка не прореагирует на индуктор. Примером тому может служить индукция эктодермальных структур – нервной трубки, хрусталика, уха и перьев у куриного зародыша. В клетках эпибласта куриного зародыша содержится специальный белок, который с началом нейруляции утрачивается в области головы и презумптивной нервной пластинки, но сохраняется в клетках презумптивного эпидермиса (Charlebois et al., 1990; Grunwald et al., 1990; рис. 16.1). Эпидермальные клетки утрачивают этот белок непосредственно перед формированием перьев. Таким образом, утрата данного цитоскелетного белка коррелирует со способностью клетки изменять форму в ответ на индукцию.

Каскады межклеточных взаимодействий. Индукция хрусталика

Ближние клеточные взаимодействия лежат в основе механизма, обеспечивающего координированное развитие органов, поскольку отвечающая ткань также может стать индуцирующей тканью. В каскаде индукций, приводящих к образованию глаза (рис. 8.24), хорда индуцирует возникновение нервной трубки; выпячивание нервной трубки – глазной пузырь – в результате контакта с эктодермой инструктирует ее клетки к превращению в хрусталик. В свою очередь хрусталик инструктирует образование роговицы в эпидермисе, который располагается непосредственно над ним.

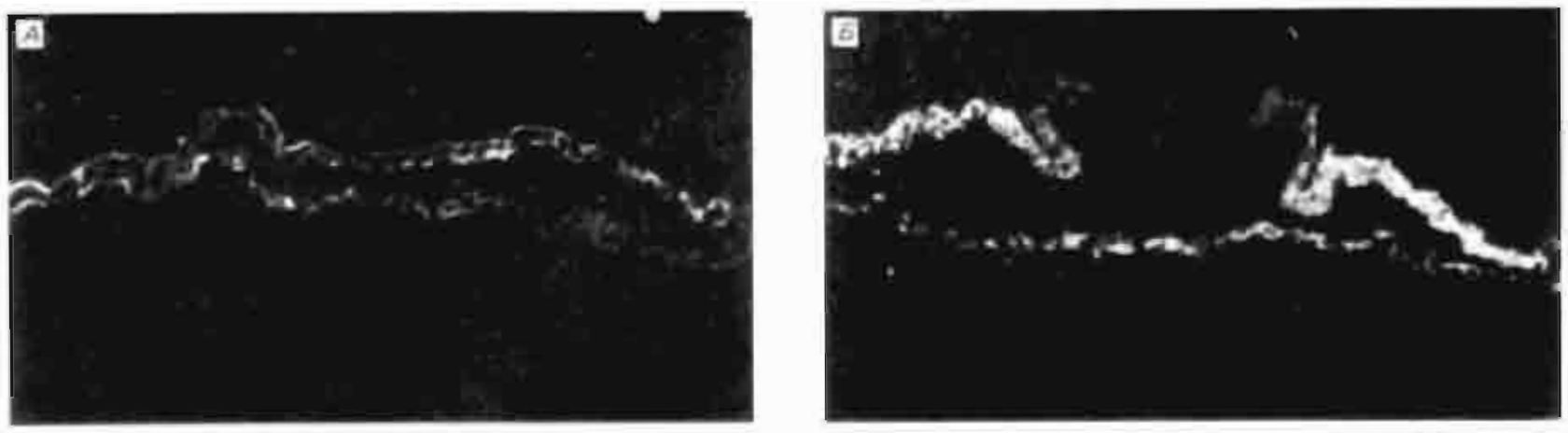


Рис. 16.1. Утрата цитоскелетного белка теми эктодермальными клетками куриного зародыша, которые изменяют свою форму во время нейруляции. *А*. Поперечный срез эпибласта и гипобласта одновременного куриного зародыша, окрашенного флуоресцирующими антителами к специфическому белку этих клеток – цитокератину. *Б*. Утрата этого белка клетками, которые образуют нервную пластинку. (Из Grunwald et al., 1990; фотографии с любезного разрешения этих авторов.)

У многих видов формирование хрусталика происходит лишь после того, как эктодерма приходит в контакт с глазным пузырем (рис. 16.2) (Harrison, 1920; Spemann, 1938). Имеются, однако, виды, в том числе некоторые амфибии, у которых индуктором хрусталика может быть не только глазной пузырь (рис. 16.3). Якобсон (Jacobson, 1966) связал индукцию хрусталика у амфибий с рядом тканей, которые контактируют с головной эктодермой по мере ее дифференцировки. Во время гаструляции презумптивная эктодерма хрусталика сначала располагается над энтодермальной тканью развивающейся глотки, а затем перемещается над областью мезодермальных клеток сердца. И только после нейруляции с презумптивными клетками хрусталика вступает в контакт глазной пузырь. Якобсон предположил, что каждая из этих тканей в индукции хрусталика выполняет вспомогательную функцию. У одних видов порог для индукции хрусталика относительно низок, и в таких случаях достаточно контакта с энтодермой. У других видов порог высок, и в этих случаях должны быть активны все три индуктора.

Современные исследования, выполненные на *Xenopus*, не акцентируя внимания на роли мезодермы и энтодермы, подчеркивают важность передней части нервной пластинки в качестве индуктора эктодермы хрусталика. Эти эксперименты свидетельствуют о том, что презумптивная эктодерма хрусталика приобретает способность стать хрусталиком на очень ранних этапах развития (от поздней гаструлы со средней нейрулы) и что глазной пузырь только локализует дифференцировку этой уже автономной ткани. Другими словами, головная эктодерма сформирует хрусталики и без контакта с глазным бокалом, но последний необходим для полной дифференцировки хрусталика и его правильного расположения по отношению к остальному глазу. В соответствии с этой моделью (Saha et al., 1989; Henry, Grainger, 1990) процесс детерминации экто-

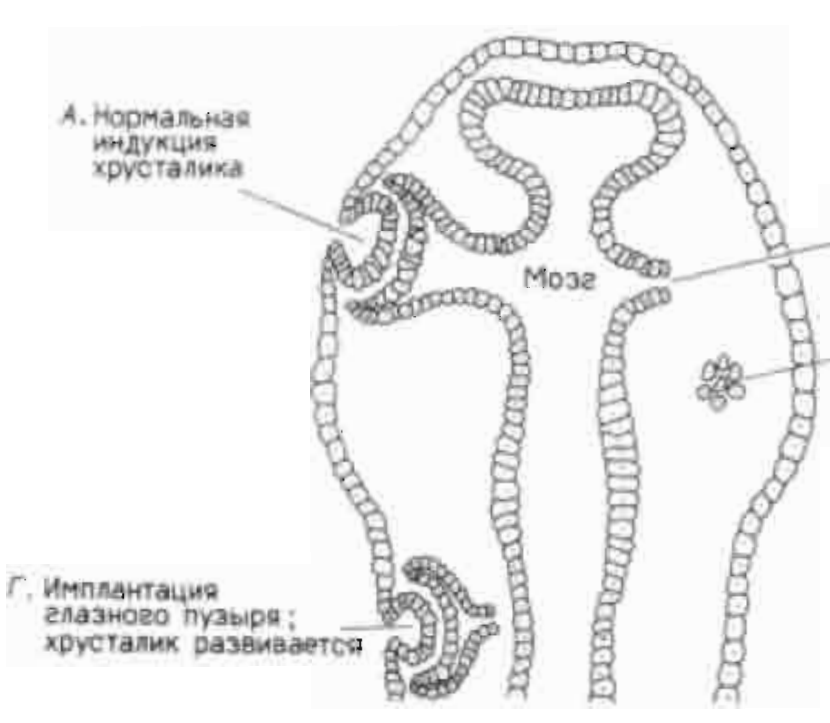


Рис. 16.2. Инструктивные взаимодействия тканей. Продольный срез головы обобщенного зародыша позвоночных, на котором представлена схема эксперимента, демонстрирующего инструктивное взаимодействие. В данном случае это индукция глазным пузырем хрусталика в эктодерме головы. *А*. Нормальная индукция. *Б*. В отсутствие глазного пузыря хрусталик не формируется. *В*. Замена глазного пузыря другой тканью не вызывает индукции. *Г*. При контакте глазного пузыря с эктодермой головы в другой области головного отдела происходит индукция хрусталика в необычном месте. (По Wessells, 1977.)

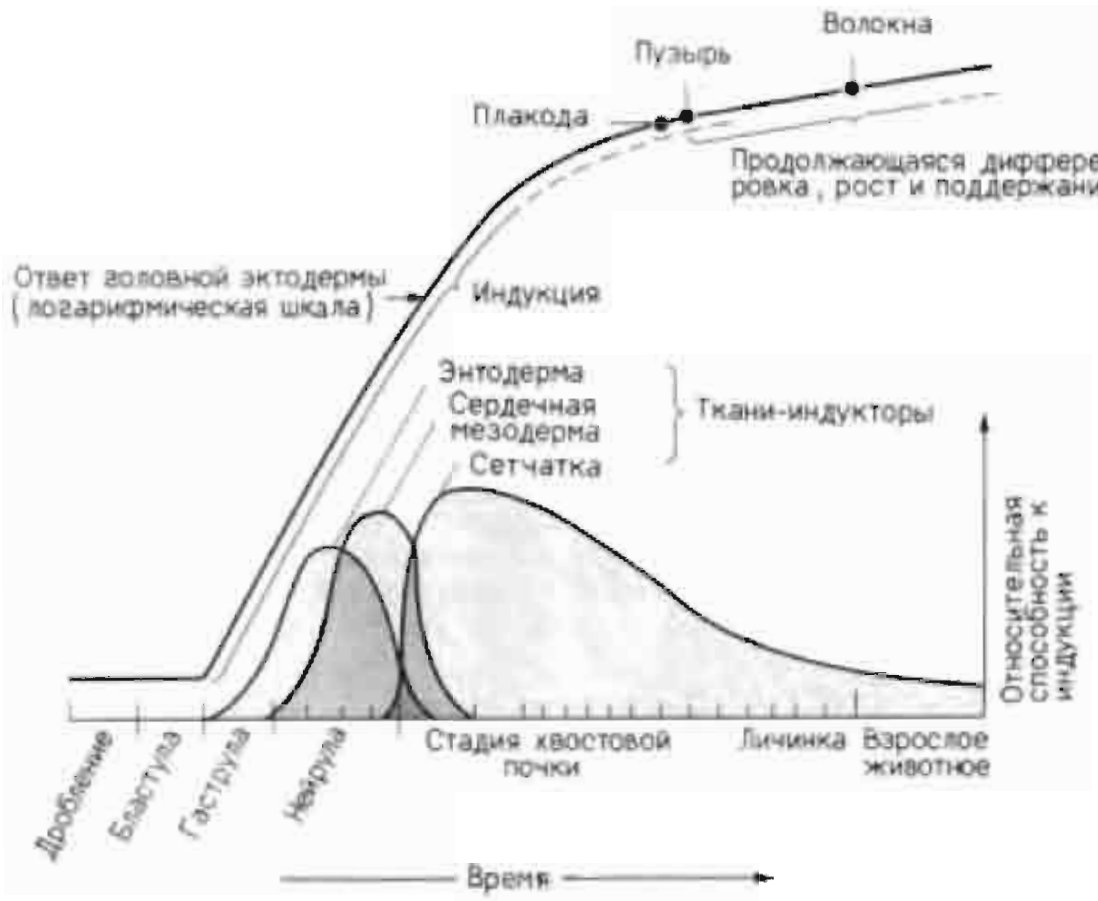


Рис. 16.3. Графическое представление индукции хрусталика у зародыша саламандры. Способность индуцировать ткань хрусталика впервые наблюдается у эктодермы, затем у сердечной мезодермы и, наконец, у ткани сетчатки, которая приобретает это свойство незадолго до контакта с головной эктодермой. Тем временем по мере развития от ранней гаструлы к стадиям хвостовой почки компетенция головной эктодермы отвечать на индукцию логарифмически возрастает. (По Jacobson, 1966.)

дермы хрусталика подразделяется на три стадии: приобретение компетенции, предрасположенность и окончательная детерминация. Полагают, что приобретение компетенции к ответу на первоначальный индуцирующий сигнал представляет собой автономный процесс, присущий эктодерме, предрасположенность к образованию хрусталика обеспечивается передней областью нервной пластинки, а окончательная детерминация индуцируется глазным пузырем.

Компетенция и предрасположенность эктодермы

В 1987 г. Генри и Грейнджер (Henry, Grainger, 1987) показали, что детерминация способности к образованию хрусталика у зародышей *Xenopus* происходит очень рано. Пересаживая эктодерму из разных областей гаструл *Xenopus* в образующие хрусталик области нейрулы, эти авторы пытались определить, когда эктодерма приобретает способность формировать хрусталик под действием глазного пузыря. Оказалось, что эктодерма очень молодых гаструл этим свойством не обладает. Оно появляется у трансплантатов из той же самой проспективной эктодермы хрусталика более поздних зародышей, пересаженных в нейрулу (табл. 16.1). Никакая иная ткань не могла реагировать на глазной пузырь таким образом. Другие эктодермальные области гаструл также проявляли ограниченную способность формировать хрусталики, но эта способность утрачивалась ими по мере развития зародыша.

Таким образом, оказывается, что образующая хрусталик эктодерма приобретает способность к формированию хрусталика задолго до контакта с глазным пузырем. Когда и как приобретается это свойство? Основываясь на результатах, полученных Ньюкупом (Nieuwkoop, 1952), можно предположить, что сигнал от нервной пластинки идет по эктодерме. Способна ли нервная пластинка индуцировать занимающий по отношению к ней латеральное положение презумптивный эпидермис к превращению в образующую хрусталик эктодерму? Генри и Грейнджер (Henry, Greinger, 1990) проверили это предположение, комбинируя проспективную переднюю область нервной пластинки поздней гаструлы с эктодермой, в перспективе образующей хрусталик. Оказалось, что эктодерма, изолированная из потенциально образующей хрусталик области зародыша, при отдельном культивировании хрусталиковых белков не образует, но та же самая область при культивировании с проспективной тканью передней части нервной пластинки начинает синтезировать эти белки. И хотя дифференцировка хрусталика часто бывает неполной, она очень специфична. Белки хрусталика не образуются, если эктодерму гаструлы комбинировать с другими тканями, в частности с энтодермой передней кишки или с сердечной мезодермой. Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что именно передний отдел проспективной нервной пластинки (включающий область будущей сетчатки) обеспечивает сигнал,

Таблица 16.1. Зависимость чувствительности проспективной эктодермы хрусталика к действию индуктора от возраста зародыша

Возраст донора	Операция: донор	Операция: хозяин	Число зародышей	Индукция хрусталиков, %	Хрусталикоподобные тела, %	Утолщение эктодермы, %	Нехрусталикоподобные тела, %	Нет ответа, %	Общее число положительных результатов
Средняя гаструла			24	0	4	38	8	50	1 (4%)
Поздняя гаструла			21	10	14	42	10	24	5 (24%)
Ранняя нейрула			24	75	8	0	4	13	20 (83%)
Поздняя нейрула			20	95	5	0	0	0	20 (100%)

Источник: Henry, Grainger, 1987.

который делает эту ткань предрасположенной к тому, чтобы стать хрусталиком.

Но все ли ткани способны отвечать на сигнал, идущий от передней части нервной пластинки? Было показано (Servetnick, Granger, 1990), что компетентной к ответу на эти сигналы является только эктодерма переходящей от средней к поздней стадии гаструлы. Чтобы выявить это, удаляли эктодерму анимальной шапочки на разных стадиях гаструляции и затем трансплантировали ее в область презумптивного хрусталика зародышу на стадии нервной пластинки. Эктодерма ранних гаструл в очень незначительной степени проявляла компетенцию к формированию хрусталиков или не проявляла ее вовсе (о компетенции судили по синтезу белков кристаллинов), но эктодерма несколько более продвинутых стадий могла формировать хрусталики. К концу гаструляции способность реагировать на сигнал нервной пластинки утрачивалась. Создается впечатление, что компетенция присуща самой эктодерме, а не индуцируется окружающими тканями. Эктодерму анимальной шапочки зародышей разных стадий можно удалить, некоторое время культивировать in vitro и затем возвратить в зародыш на стадии нервной пластинки. Такая эктодерма проявляла характерную компетенцию, несмотря на то что ее развитие частично протекало в чашке Петри. Следовательно, эктодерма приобретает компетенцию отвечать на индуцирующие сигналы со стороны передней части нервной пластинки на ранней стадии средней гаструлы, а во время поздней гаструлы передняя часть нервной пластинки индуцирует в этой ткани предрасположенность к образованию хрусталика. Сходные эксперименты показали, что дорсолатеральная мезодерма на этой стадии, хотя и не индуцирует в эктодерме предрасположенность к образованию хрусталика, но усиливает такую предрасположенность, сообщаемую нервной пластинкой.

Окончательная детерминация хрусталика

Несмотря на то что у *Xenopus* глазной пузырь, по-видимому, не играет ведущей роли в начальной индукции образования хрусталика, он, безусловно, играет какую-то роль в экспрессии полного фенотипа хрусталика. Хрусталики, формирующиеся при отсутствии глазного пузыря, обычно рудиментарны. Пока не известна точная функция глазного пузыря – имеет ли он прямое положительное влияние на дифференцировку зрительной плакоды в полностью дифференцированный хрусталик или его влияние заключается в удалении ингибитора дифференцировки хрусталика. Высказано предположение (von Woellwarth, 1961; Henry, Grainger, 1987), что клетки головного нервного гребня препятствуют дифференцировке хрусталика и контакт с глазным пузырем защищает хрусталиковую плакоду от этих ингибирующих сигналов.

Образование роговицы

Как только произойдет инвагинация хрусталиковой плакоды, она покрывается двумя слоями прилежащей эктодермы. Теперь индуктором становится развивающийся хрусталик. Эктодерма, которая должна стать роговицей, вероятно, также де-

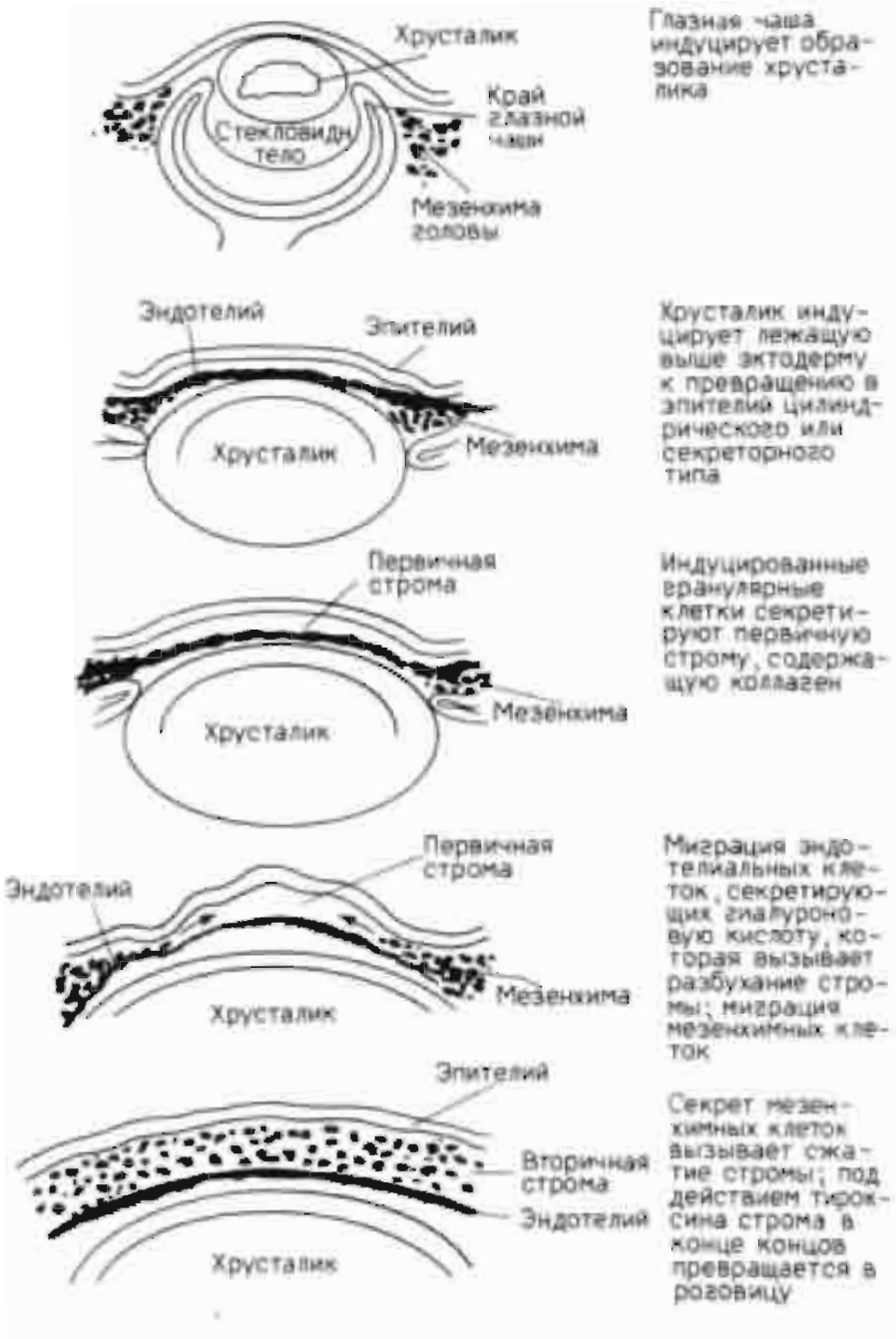


Рис. 16.4. Развитие роговицы. Под индуктивным воздействием хрусталика эпителий роговицы дифференцируется и секретирует первичную строму, состоящую из слоев коллагена. Затем эндотелиальные клетки в этой области секретируют гиалуроновую кислоту, создавая условия для вхождения сюда мезенхимных клеток из нервного гребня. После этого гиалуронидаза (секретируемая либо мезенхимой, либо эндотелием) расщепляет гиалуроновую кислоту, вследствие чего первичная строма сжимается. (По Hay, Revel, 1969.)

терминируется на ранних стадиях развития (Meier, 1977). Процесс дифференцировки роговицы заключается в следующем. Под действием ткани хрусталика клетки покрывающей эктодермы становятся цилиндрическими и заполняются секреторными гранулами. Эти гранулы перемещаются к основанию клеток и секретируются, образуя **первичную строму,** содержащую до 20 слоев коллагена типов I и II (рис. 16.4). В эту область из соседних капилляров мигрируют эндотелиальные клетки и здесь, в первичной строме, секретируют в матрикс гиалуроновую кислоту. Гиалуроновая кислота вызывает набухание матрикса, который становится хорошим субстратом для двух волн миграции мезенхимных клеток, происходящих из нервного гребня. Мезенхимные клетки второй волны после вхождения в матрикс остаются в нем, секретируя коллаген типа I и гиалуронидазу. Гиалуронидаза вызывает сжатие стромы. Под действием тироксина, выделяемого развивающейся щитовидной железой, происходит обезвоживание этой **вторичной стромы**, и богатый коллагеном матрикс эпителиальной и мезенхимной тканей становится прозрачной **роговицей**.

Мы убеждаемся, таким образом, что «простые» индукционные взаимодействия в действительности представляют собой хорошо отрежиссированные спектакли, в которых актеры должны появляться на сцене и произносить свою роль в строго определенное время и в строго определенном месте. Получив новую информацию, они могут передавать эту информацию, для того чтобы ею воспользовались другие. Учитывая это, мы можем приступить к изучению некоторых принципов, касающихся вторичной индукции, на примерах других развивающихся органов.

Эпителио-мезенхимные взаимодействия

Среди наиболее хорошо изученных случаев вторичной индукции основное место занимают взаимодействия эпителиальных слоев с прилежащими ме-

Таблица 16.2. Некоторые эпителио-мезенхимные взаимодействия

Орган	Эпителиальный компонент	Мезенхимный компонент
Производные покровов (волосы, перья, потовые железы, молочные железы, зубы)	Эпидермис (эктодерма)	Дерма (мезодерма)
Почки конечностей	Эпидермис (эктодерма)	Мезенхима (мезодерма)
Органы пищеварения (печень, поджелудочная железа, слюнные железы)	Эпителий (энтодерма)	Мезенхима (мезодерма)
Органы, связанные с глоткой и дыхательной системой (легкие, тимус, щитовидная железа)	Эпителий (энтодерма)	Мезенхима (мезодерма)
Почки	Эпителий зачатка мочеточника (мезодерма)	Мезенхима (мезодерма)

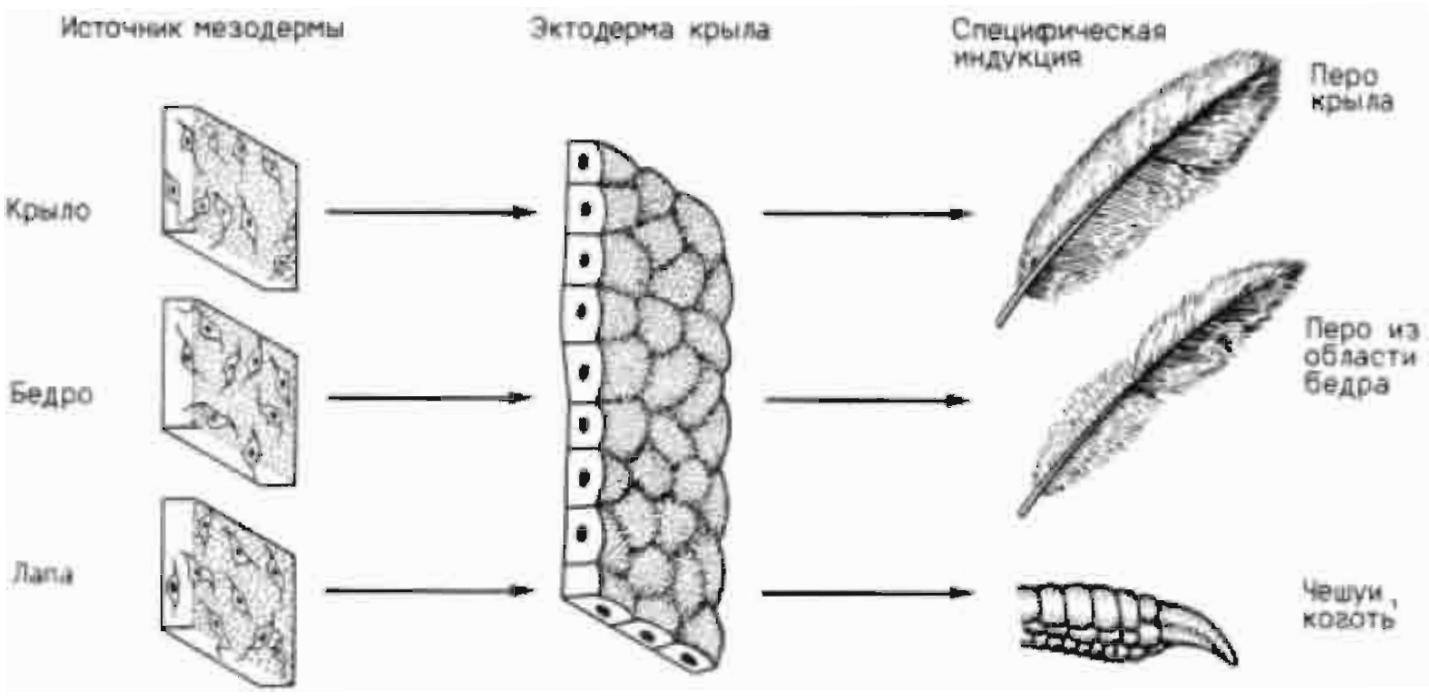


Рис. 16.5. Региональная специфичность индукции. Если клетки дермы (мезодермальное происхождение) рекомбинировать с эпидермисом (эктодермальное происхождение) цыпленка, то характер возникающих кожных структур определяется первоначальным положением мезодермы. (По Saunders, 1980.)

зенхимными клетками. Они называются **эпителио-мезенхимными** взаимодействиями. Эпителий может происходить из любого зародышевого листка, тогда как мезенхима обычно происходит от рыхлой мезодермальной ткани. Примеры эпителио-мезенхимных взаимодействий перечислены в табл. 16.2.

Региональная специфичность индукции

На примере индукции структур – производных покровов тела – рассмотрим характерные особенности эпителио-мезенхимных взаимодействий, где особенно четко прослеживается явление региональной специфичности индукции. Кожа состоит из двух основных слоев – наружного эпидермиса, происходящего из эктодермы, и собственно кожи, или дермы, происходящей из мезодермы. Кожа цыпленка дает начало трем типам покровных структур, почти полностью образованных эктодермальными клетками. Это широкие перья крыла, узкие перья голени и чешуи и когти ног. Отделив эмбриональные эпителий и мезенхиму друг от друга, можно затем совмещать их друг с другом различными способами (Saunders et al., 1957). Как видно из рис. 16.5, за специфичность индукции отвечает мезенхима. Тот же самый тип компетентной эктодермы развивается в соответствии с областью происхождения мезодермы. Таким образом, мезенхима играет инструктивную роль, включая в игру разные наборы генов отвечающих клеток.

Генетическая специфичность индукции

Если мезенхима может инструктировать эпителий относительно набора генов, который следует активизировать, то отвечающая эктодерма может подчиниться этой информации лишь постольку, поскольку это позволяет ее геном. В эксперименте, ставшем классическим, Ганс Шпеман и Оскар Шотте (Spemann, Schotté, 1932) трансплантировали боковую эктодермальную ткань ранней гаструлы лягушки в область гаструлы тритона, которая впоследствии даст часть рта. Сходным образом, презумптивная боковая эктодермальная ткань гаструлы тритона была помещена в презумптивную оральную область зародышей лягушки. Следует заметить, что ротовые структуры у личинок тритонов и лягушек резко различаются. У личинок тритона под ртом находятся балансёры, а у головастиков лягушки – секретирующие слизь железы, или присоски (рис. 16.6). Кроме того, головастики имеют роговую челюсть с зубчиками, а личинки тритонов – известковые зубы. Личинки, образовавшиеся в результате трансплантации, оказались химерами. Личинки тритонов обладали лягушачьим ртом, а головастики лягушки имели зубы и балансёры. Иначе говоря, мезодермальные клетки инструктировали эктодерму к формированию рта, но эктодерма отвечала образованием только такого рта, который она «знала», несмотря не то что он здесь совершенно неуместен[1].

Подобную генетическую специфичность можно наблюдать при комбинировании кожи цыпленка и мыши (Coulombre, Coulombre, 1971). Если экто-

[1] Говорят, что Шпеман излагал это так: «Эктодерма говорит индуктору: „Ты велел мне сделать рот; хорошо, я сделаю это, но я не могу сделать такой, как ты хочешь, я могу сделать свой, и я его сделаю"». (Цитата из Harrison, 1933.)



Рис. 16.6. Генетическая специфичность индукции. Реципрокная трансплантация областей презумптивной оральной эктодермы гаструл тритона и лягушки приводит к развитию личинок тритона с присосками головастика и головастиков лягушки с балансёрами тритона. (По Hamburgh, 1970.)

дерму, при нормальном развитии куриного зародыша дающую роговицу, изолировать и скомбинировать с кожной мезодермой также куриного зародыша, то эктодерма даст зачатки перьев, типичные для птиц. Более того, если та же самая ткань – презумптивная эктодерма роговицы – будет скомбинирована с *мышиной* кожной мезодермой, то также появятся зачатки перьев (рис. 16.7). Мышиная мезодерма проинструктировала роговицу цыпленка о необходимости приступить к формированию покровной структуры. Для мыши в норме ею должны быть волосы. Однако компетентная эктодерма куриного зародыша наилучшим образом выполняет инструкцию, образуя свои покровные структуры, а именно перья.

Таким образом, инструкции, посылаемые мезодермальной тканью, могут преодолевать видовые барьеры. Ткани тритона отвечают на сигналы, посылаемые тканями лягушки; ткани куриного зародыша отвечают на действие индукторов млекопитающих. Вместе с тем ответ эпителия является видоспецифическим для данного эпителия. Следовательно, если органоспецифичность (перо или коготь) в пределах вида обычно контролируется мезенхимой, то видоспецифичность, как правило, контролируется отвечающим эпителием.

В 1980 г. эти наблюдения были использованы для восстановления давно утраченной структуры – зубов у курицы (Kollar, Fisher, 1980). Эпителий из области формирования челюсти 5-суточных куриных зародышей (первая и вторая жаберные дуги) изолировали и комбинировали с мезенхимой коренных зубов 16-18-суточных зародышей мыши. После взаимной адгезии этих совмещенных тканей их культивировали в передней камере глаза мыши. В случае нескольких рекомбинаций сформировались

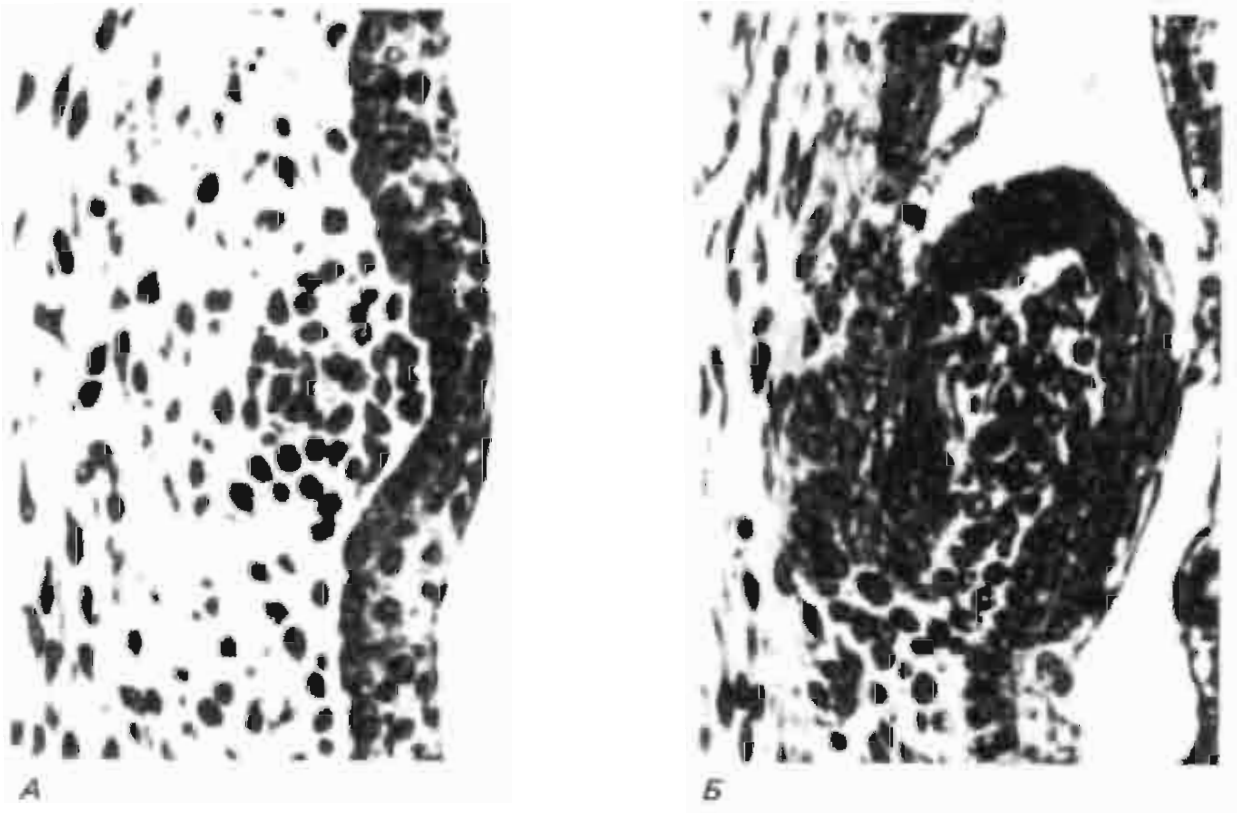


Рис. 16.7. Генетическая специфичность индукции покровов. *А*. Срез области роговицы 17-дневного куриного зародыша. Спустя 5 сут инкубации хрусталик этого глаза был замещен дермой, взятой с боковой поверхности раннего мышиного зародыша. Скопление клеток зародыша мыши расположено непосредственно под эпителием куриного зародыша. *Б*. У таких зародышей из эпителия роговицы формируется перо. В зачатке пера имеются мышиные клетки. (Из Coulombre, Coulombre, 1971; фотографии с любезного разрешения A. J. Coulombre.)



зубы, напоминающие зубы этого типа млекопитающих (рис. 16.8). Клетки жаберных дуг куриного зародыша, не создававшие зубов почти 10 млн. лет, все еще хранят этот генетический потенциал, который может быть реализован при наличии соответствующего индуктора.

Рис. 16.8. «Куриный зуб», сформировавшийся в результате совмещения глоточного эпителия цыпленка (презумптивная челюсть) с мезенхимой коренного зуба мыши. (Из Kollar, Fisher, 1980, фотография с любезного разрешения E. J. Kollar.)

Дополнительные сведения и гипотезы

Развитие и макроэволюция

Эволюция не создает новшеств из ничего. Скорее она включает наследственные изменения в развитие существующих организмов. В результате отбора этих изменений часто происходит трансформация структуры, которая получает новую функцию. Биохимические различия между видами не служат причиной их дивергентных фенотипов; если небольшие изменения в генах, кодирующих белки, и дают организму селективное преимущество, то они не могут произвести птицу из рептилии или человека из примитивной обезьяны. Кстати, усредненный полипептид человека более чем на 99% идентичен таковому шимпанзе (King, Wilson, 1975).

Общепринятыми представления (Goldschmidt, 1933; Jacob, 1977) о том, что крупные эволюционные изменения происходят в результате мутаций в регуляторных генах. Небольшие изменения в числе клеточных делений или в их расположении могут изменить время развития органа, его морфологию или положение в зародыше. Способность отвечающей клетки продуцировать определенный белок в результате сигнала от индуцирующей ткани также может изменить характер развития (Ohno, 1970). Если это так, то можно предположить появление «мутантов развития», когда особь данного вида в каком-то отношении представляет своих эволюционных предшественников. Такие мутации были обнаружены. У большинства птиц все пальцы включены в кости крыла и когти на концах крыла отсутствуют. Однако *Archaeopteryx*, первая из известных птиц, сохраняет на конце крыла три рептилийных коготка. У домашних кур простая менделевская доминантная мутация *Ametopodia* вызывает реверсию крыльев, снабженных на концах когтями (Cole, 1967). В гл. 18 мы обсудим мутации у мух, вызывающие изменения характера сегментации по типу сегментации у других членистоногих.

У иглокожих, таких, как морская звезда, закладка пятилучевой симметрии органов и «рук» происходит в результате взаимодействия гидроцеля с покрывающим его эпидермисом (Czihak, 1971). Гидроцель – часть полости тела, развивающаяся в гидроваскулярную систему, – образует пять выпячиваний, каждое из которых индуцирует формирование руки (или, у морских ежей, амбулакральной области) (рис. 16.9). Если разные виды морских ежей сохраняют пятилучевую симметрию, то морские звезды оказываются более изобретательными. Гидроцель шестилучевой морской звезды *Leptasterias hexactis* образует сначала пять выпячиваний, а чуть позже и шестое. Сходным образом, девять карманов гидроцеля обусловливают пространственную организацию у видов девятилучевых звезд (Gemmill, 1912). У слепых пещерных саламандр не происходит

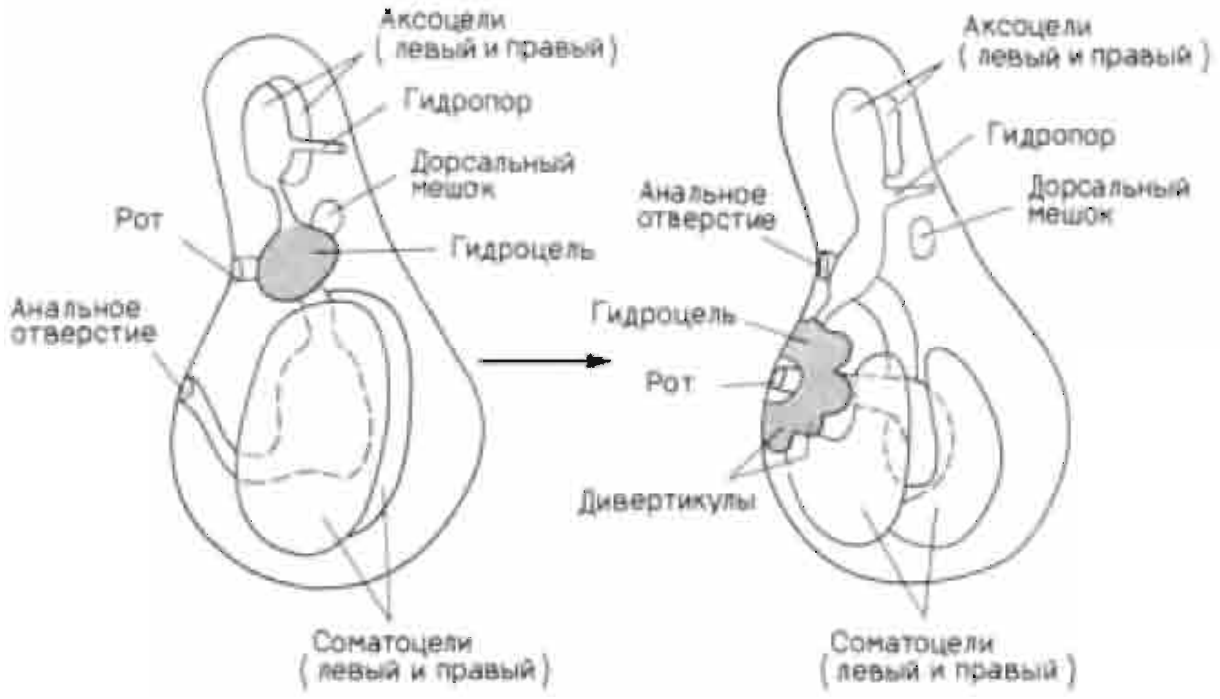


Рис. 16.9. Развитие гидроцеля (обозначен серым цветом) у обобщенной личинки иглокожих. Число «рук» у взрослого организма зависит от того, сколько дивертикулов образуется в гидроцеле (в данном случае пять). (По Ubaghs, 1967.)

индукции хрусталика. У одних видов этих саламандр мезенхимные клетки слишком рано мигрируют к месту формирования глаза, изолируя глазной бокал от головной эктодермы, тогда как у других видов клетки глазного пузыря проходят меньше делений, в результате чего он не может приблизиться к эктодерме. В любом случае индукция предотвращается (Schlapp, 1892; Cahn, 1959). Таким образом, различия в индукции могут создавать различия между видами или даже между классами животных.

Провозглашая создание «механики развития», Ру (Roux, 1894) постулировал, что следует различать *онтогенетическую* и *филогенетическую механику развития*. Далее он заметил, что исследования в области механики развития зародышей (онтогенетическая ветвь) должны были бы прогрессировать быстрее филогенетических исследований, «но благодаря существованию тесных причинных связей между обеими, многие из следствий, выведенных при изучении онтогенеза, прольют свет на филогенетические процессы». Теперь мы убедились в том, что различия в индукции могут создавать различия между видами и даже классами животных.

Формирование паренхиматозных органов

Эпителио-мезенхимные взаимодействия можно также наблюдать при развитии органов, формирующих протоки, таких, как почки, печень, легкие, молочные железы и поджелудочная железа.

ПОЧКА И ЛЕГКОЕ. Почка развивается из двух мезодермальных компонентов (рис. 16.10). Первый компонент – это эпителий **зачатка мочеточника,** происходящего из вольфова канала. При вхождении этого зачатка в область **метанефрогенной** (образующей почки) **мезенхимы** обе ткани взаимодействуют и изменяют друг друга. Метанефрогенная мезенхима заставляет зачаток мочеточника удлиняться и ветвиться. Образующиеся ветви вызывают конденсацию мезенхимы вблизи своих верхушек; эта мезенхима сначала формирует S-образный тяж, затем в нем появляется полость, и он превращается в трубку. Между зачатком мочеточника и новообразованной трубкой устанавливается связь, что позволяет беспрепятственно проходить по ним различным веществам. Трубочки (канальцы) на конце зачатка мочеточника формируют нефрон функционирующей почки, а ветвящийся зачаток мочеточника дает начало почечным собирающим протокам и мочеточнику, выводящему из почки мочу.

Клиффорду Гробстейну (Grobstein, 1955, 1956) удалось наблюдать эту **реципрокную индукцию** в условиях культивирования вне организма. Отделяя зачаток мочеточника от мезенхимы, он культивировал их либо по отдельности, либо вместе. Без мезенхимы зачаток мочеточника не ветвился. Мезенхима без зачатка мочеточника не конденсировалась с образованием канальцев. Но если эти ткани совмещали, то зачаток мочеточника рос и ветвился, а в мезенхиме формировались канальцы (рис. 16.11).

Итак, зачаток мочеточника ветвится только после стимуляции метанефрогенной мезенхимой. Это заключение подтверждается реципрокными трансплантациями в культуре. Если слюнной эпителий совместить со слюнной мезенхимой, то он будет ветвиться, так же как и эпителий зачатка мочеточника ветвится в комбинации с мезенхимой почки. Однако ветвления на наблюдается в случаях комбинации эпителия зачатка мочеточника с мезенхимой слюнной железы или эпителия слюнной железы



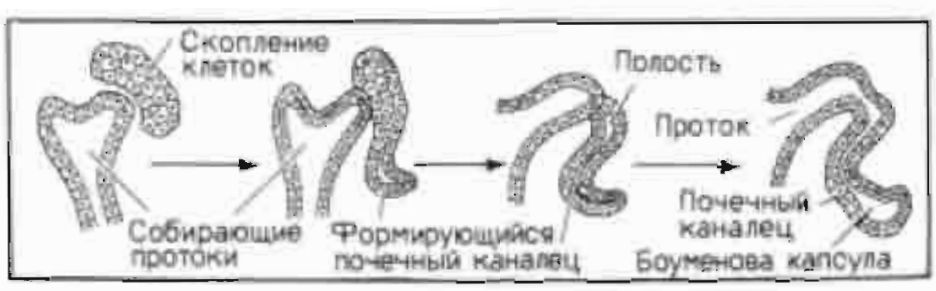


Рис. 16.10. Реципрокная индукция при развитии почки у млекопитающих. По мере того как зачаток мочеточника входит в метанефрогенную мезенхиму, мезенхима индуцирует его ветвление. На верхушках ветвей эпителий индуцирует мезенхиму к агрегации и формированию в агрегатах полостей, в результате чего образуются почечные канальцы. (По Wessells, 1977.)

с мезенхимой почки (Bishop-Calame, 1966). Таким образом, эпителиальный морфогенез при развитии почки зависит не только от наличия мезенхимных клеток, но и от того, что эта мезенхима обладает региональной специфичностью.

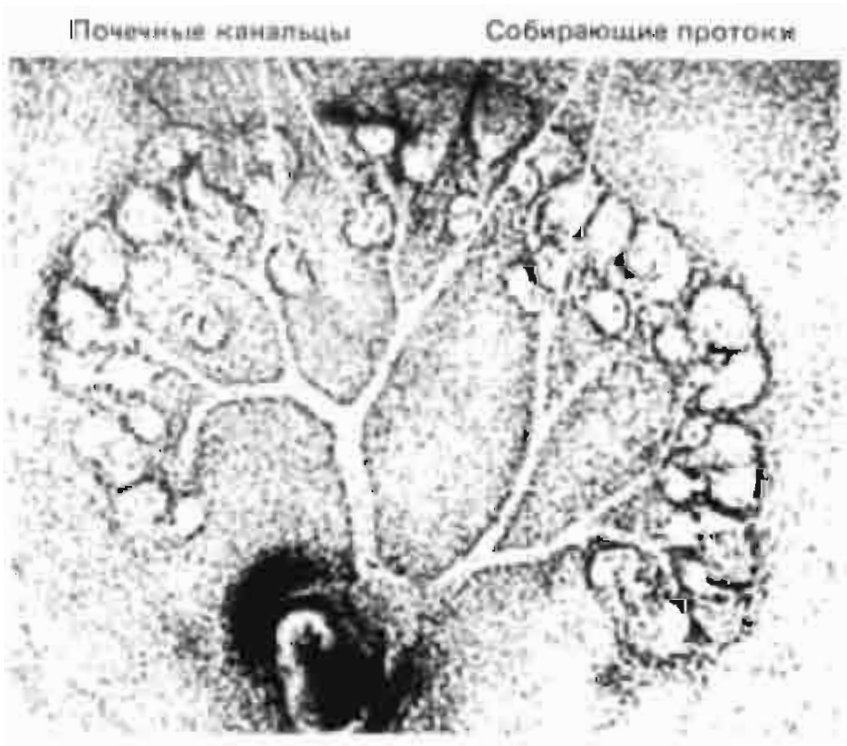


Рис. 16.11. Индукция образования почки, наблюдаемая in vitro. 11-дневный зачаток метанефроса мыши, в состав которого входят зачаток мочеточника и метанефрогенная мезенхима, находился в условиях культивирования 8 сут. За это время происходит ветвление зачатка мочеточника с образованием собирающих протоков, и конденсация мезенхимы в верхушках ветвей с образованием почечных канальцев. (Из Grobstein 1955; фотография с любезного разрешения C. Grobstein.)

Механизм органогенеза почки

Одно дело сказать, что зачаток мочеточника индуцирует метанефрогенную мезенхиму к превращению в эпителий и нефроны. Другое дело понять, как осуществляются эти процессы. Полагают, что как и развитие хрусталика под действием глазного пузыря, индукция зачатком мочеточника представляет собой лишь конечный этап в цепи событий, шаг, служащий триггером каскада реакций в компетентной мезенхиме. Метанефрогенная мезенхима не может дать никакой другой ткани, кроме почечных канальцев (если она индуцирована) или почечных клеток стромы (если она не индуцирована). Основываясь на результатах своих экспериментов по индукции мезонефроса у куриного зародыша, Этеридж (Etheridge, 1968) приходит к заключению, что эта детерминация является результатом взаимодействий с энтодермой в раннем развитии.

Какова же программа событий, происходящих в индуцированной мезенхиме? Превращение мезенхимных клеток в эпителий – не столь необычное явление при органогенезе; оно наблюдается и при развитии гонад (когда мезенхима гонады формирует половые тяжи), и при развитии мезотелия (который образуется из мезенхимных клеток, выстилающих целом). Как уже обсуждалось в гл. 15, эти изменения предполагают существенную перестройку внеклеточного матрикса, и в самом деле зачаток мочеточника стимулирует кардинальные изменения внеклеточного матрикса, образуемого клетками метанефрогенной мезенхимы. Если неиндуцированная мезенхима секретирует внеклеточный матрикс, состоящий преимущественно из фибронектина и коллагена типов I и III, то после индукции эти белки исчезают и замещаются базальной пластинкой, состоящей из ламинина и коллагена типа IV. Цитоскелет, типич-

ный для мезенхимных клеток, заменяется на цитоскелет, характерный для эпителия (Ekblom et al., 1983; Lehtonen et al., 1985). Таким образом рыхло лежащие клетки мезенхимы интегрируются в поляризованный эпителий на базальной пластинке.

Однако еще до этих событий только что индуцированная метанефрогенная мезенхима синтезирует мембранный протеогликан синдекан (Vainio et al., 1989a). Впервые этот поверхностный протеогликан обнаруживается вокруг мезенхимных клеток, окружающих зачаток мочеточника при вхождении его в область мезенхимы. К появлению первого ответвления вся мезенхима вокруг веточки дает положительное окрашивание на синдекан, при этом наиболее интенсивно окрашиваются клеточные слои вблизи зачатка мочеточника. С помощью индукторов от разных видов и видоспецифических антител к синдекану было показано, что синдекан действительно синтезируется мезенхимными клетками. Синдекан играет важную роль в пространственной организации разных типов эпителия (Reprageger, Bernfield, 1985; Vainio et al., 1989b), и его синтез может играть существенную роль в агрегации мезенхимных клеток. Если синтез протеогликана в зачатке эмбриональной почки ингибировать, то клетки мезенхимы не сформируют эпителиальных трубочек, а мочеточник не будет ветвиться при врастании в область мезенхимы (Lelongt et al., 1988).

Хотя предположения о том, что зачаток мочеточника инициирует каскад этих изменений путем активации и репрессии специфических генов в мезенхиме, высказывались давно, мы до сих пор не знаем, какое индуцирующее вещество синтезирует зачаток мочеточника, каковы рецепторы этого вещества в отвечающей мезенхиме или гены, активируемые этим взаимодействием. В последнее время, однако, идентифицирован ген, служащий хорошим кандидатом для инициации событий, превращающих мезенхимные клетки в эпителий. Было показано, что этот ген – *WT2-1* – отсутствует или мутирует у больных

Рис. 16.12. Дифференцировка презумптивного эпителия легкого в зависимости от источника мезенхимы. *А*. Эпителий легкого не дифференцируется при культивировании без мезенхимных клеток. *Б*–*Е*. Зависимая от мезенхимы дифференцировка эпителия. (По Deuchar, 1975.)

с опухолью Вилма (рака эмбриональных клеток почки). Кодируемый им белок обладает последовательностью, характерной для фактора транскрипции с доменом «цинковый палец», а гибридизация in situ показала, что этот ген в норме экспрессируется в мезенхиме почек, гонад и мезотелия. В случае почки человека мРНК *WT2-1* не экспрессируется ни в зачатке мочеточника, ни в неиндуцированной мезенхиме. Однако она легко выявляется в конденсирующихся агрегатах и в S-образном эпителии (Pritchard-Jones et al., 1990; van Heyninger et al., 1990).

Другие эпителиальные структуры не ограничены в своем ответе на стимул так жестко, как зачаток мочеточника. Например, эпителий, выстилающий энтодермальные трубки, будет развиваться по-разному в зависимости от положения. Оказывается, что развиваться по-разному заставляет эпителий каждая мезенхимная область (рис. 16.12). Подобная региональная специфичность мезенхимной индукции с наибольшей очевидностью наблюдается при формировании дыхательной системы. Дыхательный эпителий не так привередлив, как почечный или слюнной, и может отвечать на воздействие разнообразных типов мезенхимы. При развитии млекопитающих этот ответ может быть двояким. В области шеи эпителий растет прямо, формируя трахею. Входя в грудной отдел, он ветвится, образуя два бронха и затем легкие. Легочный эпителий можно изолировать на стадии, когда он только что разделился на два бронха, и культивировать правую и левую сторону при разных условиях. На рис. 16.13 представлены результаты такого эксперимента. Правый бронхиальный эпителий сохраняет свою мезенхиму, тогда как левый окружен мезенхимой трахеи (Wessells, 1970). Под действием легочной мезенхимы правый бронх пролиферирует и ветвится, а бронх слева продолжает рост без ветвления. Таким образом, дыхательный эпителий характеризуется исключительной зависимостью от среды и способен дифференцироваться в разнообразные энтодермальные структуры.



Рис. 16.13. Дифференцировка презумптивного эпителия легкого в зависимости от источника индуцирующей мезенхимы. После того как эмбриональный эпителий легкого мыши разветвился на два бронха, весь зачаток был вырезан и затем продолжал развиваться в условиях культуры. Правый бронх остался интактным, а на верхушку левого помещена мезенхима трахеи. Верхушка правого бронха образовала характерные для легкого ветви, тогда как на верхушке левого бронха ветвления не произошло. (Из Wessells, 1970; фотография с любезного разрешения N. Wessells.)

Координированная дифференцировка и морфогенез поджелудочной железы

Если индукция той или иной структуры произошла, то структура эта начинает дифференцироваться. Этот процесс особенно интенсивно изучался на примере развивающейся поджелудочной железы мыши. Дорсальная поджелудочная железа мыши закладывается в виде карманообразного выпячивания энтодермального эпителия, который врастает в область панкреатической мезенхимы. Взаимодействуя с эпителием, мезенхимные клетки заставляют его формировать пальцеобразные ответвления, заканчивающиеся сферическими кластерами клеток, называющимися **ацинусами.** Этот процесс подобен тому, что наблюдается в случае слюнных и молочных желез, а ацинарные клетки вырабатывают и секретируют белки, характерные для данного органа. В поджелудочной железе бо́льшая часть ее клеток образует пищеварительные ферменты (карбоксипептидазу, липазу, трипсин), которые экспортируются через протоки поджелудочной железы в тонкий кишечник. Другие клетки панкреатического эпителия, отпочковываясь, дают начало островкам Лангерганса, две основные популяции клеток которых секретируют инсулин (бета-клетки) и глюкагон (альфа-клетки).

Было показано (Rutter et al., 1964), что до образования панкреатического дивертикула соответствующая область энтодермы не содержит ни белков, специфичных для поджелудочной железы, ни их мРНК (рис. 16.14). Первые панкреатические белки появляются сразу, как только начинает формироваться первоначальное выпячивание. Таким образом, морфогенез и дифференцировка поджелудочной железы тесно связаны. Пока поджелудочная железа претерпевает морфогенез (характеризующийся быстрыми митозами и формированием протока и ацинусов), уровень синтеза этих белков низок. По мере развития железы некоторые ацинарные

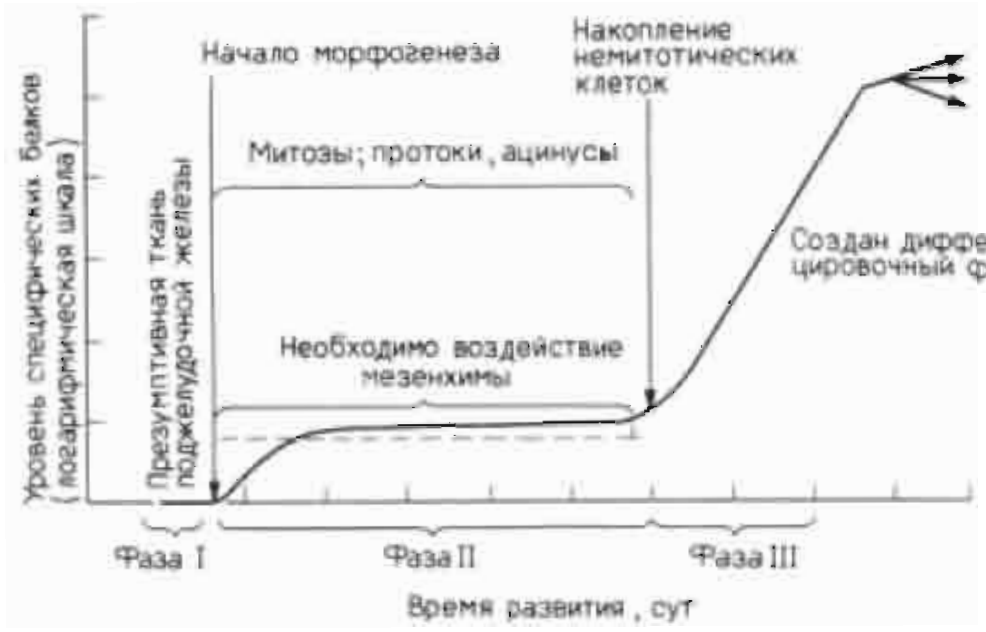
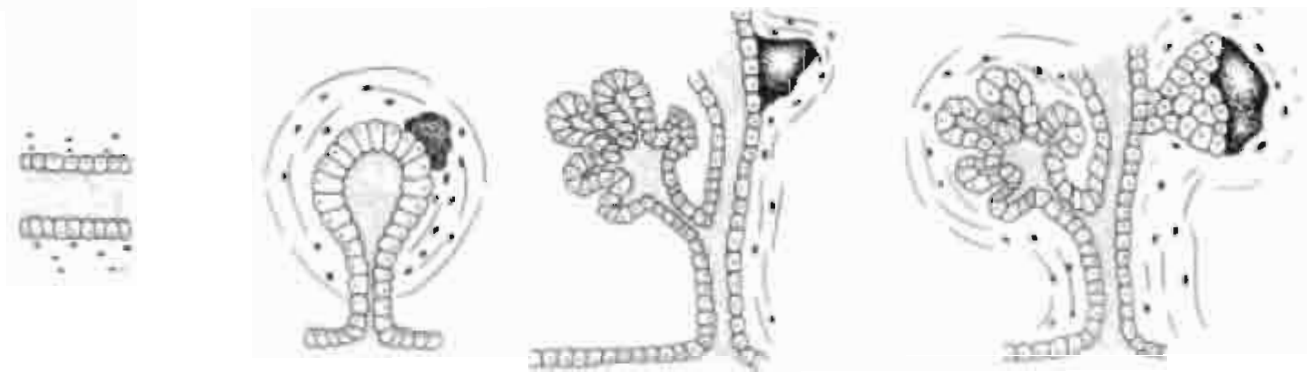


Рис. 16.14. Координированные дифференцировка и морфогенез поджелудочной железы. По мере формирования зачатка поджелудочной железы из энтодермального эпителия в нем повышается синтез специфических белков. Для поддержания формирования протоков и ацинусов необходима мезенхима; содержание специфических продуктов поджелудочной железы зависит от числа клеток, выходящих из митотического цикла. Вначале, когда таких клеток мало, уровень повышается очень незначительно, но после того, как в сформированной ткани накопится достаточно неделящихся клеток, синтез специфических для поджелудочной железы белков резко возрастает. На рисунке уровень синтеза специфических белков сопоставляется с этапами образования панкреатической ткани. (По Wessells, 1977; Rutter et al., 1978.)



клетки прекращают делиться, в них дифференцируются аппарат Гольджи и гранулярный эндоплазматический ретикулум, свойственные секреторным клеткам. Как только произойдет накопление таких клеток, их дальнейшая дифференцировка перестает зависеть от мезенхимы, они продолжают накапливать белки, специфичные для дифференцированных клеток данного типа (Spooner et al., 1977). Итак, при нормальных условиях два независимых процесса – морфогенез и цитодифференцировка – при формировании органа координированы.

Природа ближнего взаимодействия при эпителио-мезенхимной индукции

«Ближняя» индукция происходит в том случае, когда индуцирующая ткань располагается вблизи компетентной отвечающей ткани. Необходим ли для таких клеток физический контакт или они могут взаимодействовать на небольшом расстоянии? Принято выделять три типа взаимодействий: контакт между клетками, контакт между клеткой и матриксом и диффузия растворимых сигналов (рис. 16.15) (Grobstein, 1955; Saxén et al., 1976). В некоторых случаях, по-видимому, необходим контакт между клетками. Так, индукция почечных канальцев зачатком мочеточника зависит от их непосредственного контакта. Эта зависимость была продемонстрирована Лехтоненом и Саксеном (Lehtonen, 1975; Lehto-



Рис. 16.15. Три возможных способа индукционных взаимодействий. (По Grobstein, 1956.)

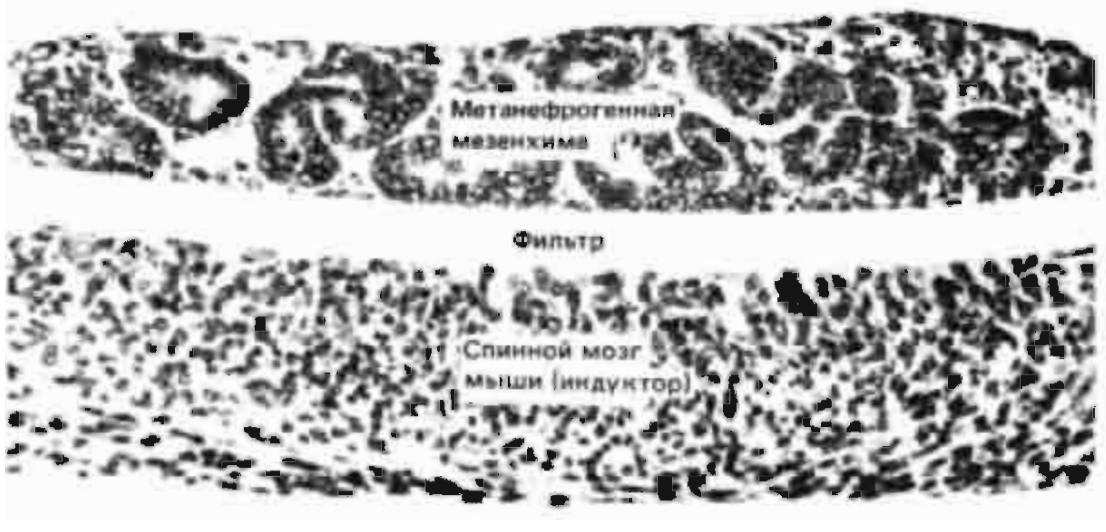


Рис. 16.16. Трансфильтровая индукция почечных канальцев. *А*. Метанефрогенная мезенхима расположена над фильтром, а индуктор (в данном случае – спинной мозг мыши, имитирующий действие зачатка мочеточника) помещен снизу. В мезенхиме сформировались почечные канальцы. *Б*. Электронная микрофотография, на которой виден клеточный контакт (обозначен стрелкой) через пору фильтра, «разделяющего» метанефрогенную мезенхиму и индуцирующий ее спинной мозг. (Фотографии с любезного разрешения L. Saxén.)

nen et al., 1975). Модифицировав метод Гробстейна, заключавшийся в выращивании индуктора и мезенхимы на разных сторонах пористого фильтра, эти авторы обнаружили, что формирование канальцев в мезенхиме происходит в том случае, если на другой стороне фильтра культивируют индуцирующую ткань (рис. 16.16, *А*). Когда были приготовлены гистологические срезы через эту конструкцию, оказалось, что небольшие отростки индуцирующей ткани проросли через поры фильтра и пришли в контакт с мезенхимой (рис. 16.16, *Б*). Путем изменения толщины фильтра им удалось показать зависимость индукции от межклеточных контактов. Сходная ситуация наблюдается в природе. У мышей, гомозиготных по мутации *Danforth's short tail*, почки не развиваются. Зачаток мочеточника у них подрастает на расстояние клеточного диаметра до мезенхимы и останавливается. В отсутствие контакта индукции не происходит (Gluecksohn-Schoenheimer, 1943). При индукции зубов (Slavkin, Bringas, 1976) и подчелюстной слюнной железы (Culter, Chaudhry, 1973) контакты между мезенхимными и эпителиальными клетками можно увидеть с помощью электронного микроскопа (рис. 16.17).

Данные по другим органам свидетельствуют о том, что внеклеточный матрикс клеток одного типа вызывает дифференцировку другого набора клеток. Как уже упоминалось, дифференцировка эпителия роговицы зависит от индукционного влияния капсулы хрусталика (Hay, Revel, 1969). В отличие от индукции почки, которая, очевидно, требует живой ткани индуктора, мертвая капсула хрусталика также оказывает свое действие, поскольку на ней присутствует коллаген; и вообще практически любой источник коллагена будет индуцировать клетки эпителия роговицы к синтезу своего матрикса (Hay, Dodson, 1973; Meier, Hay, 1974). Если между капсулой хрусталика и эпителием роговицы поместить

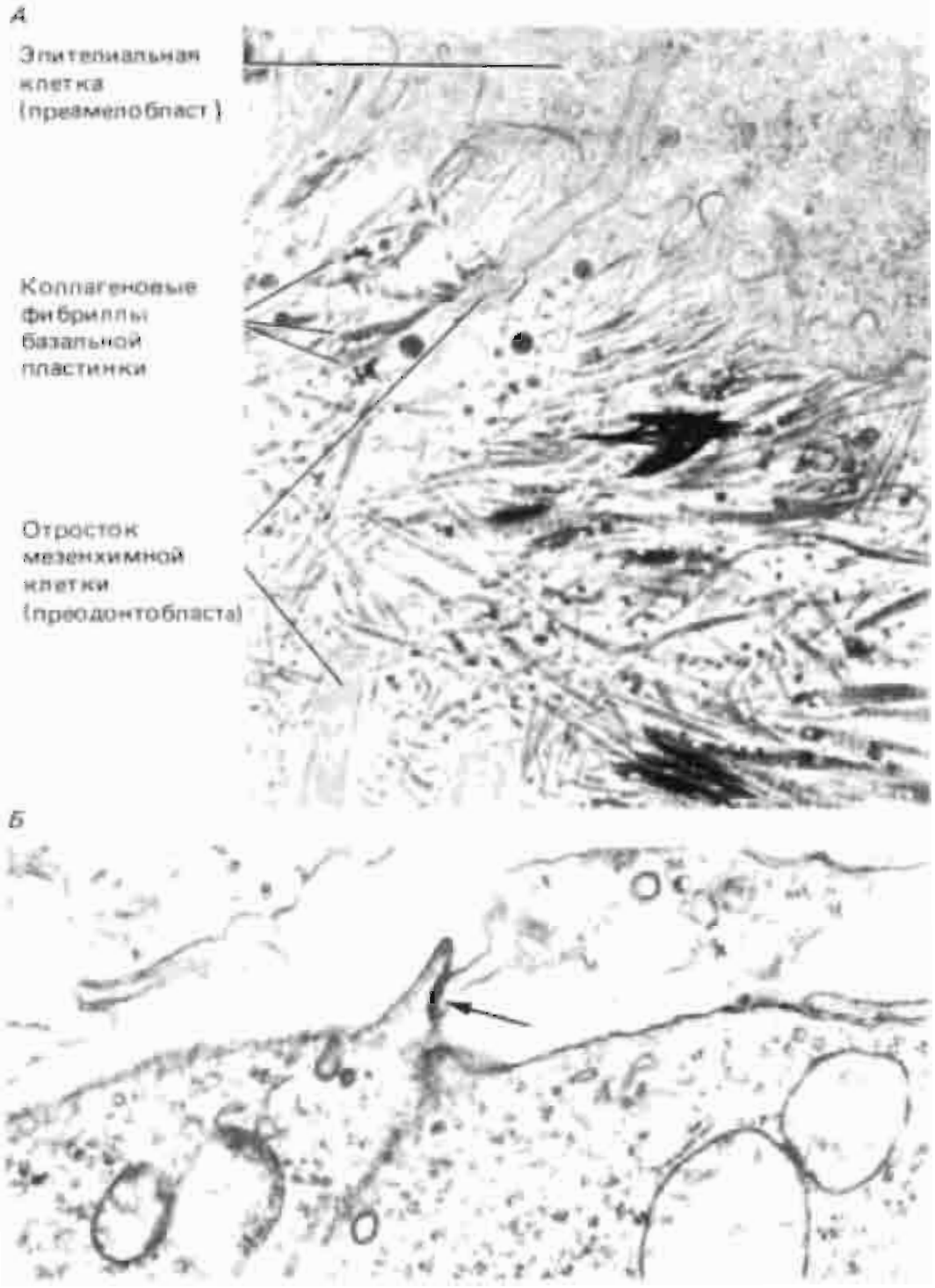


Рис. 16.17. Контакт между эпителиальной и мезенхимной клетками во время индукции. *А*. Электронная микрофотография контакта эпителиальной клетки (преамелобласта) и мезенхимной клетки (преодонтобласта) при развитии зуба. Отростки мезенхимных клеток проходят через внеклеточный матрикс, чтобы установить контакт с нижней поверхностью эпителиальных клеток. *Б*. Электронная микрофотография контакта (обозначен стрелкой) между эпителием и мезенхимой в слюнной железе 16-дневной крысы. (*А* – из Slavkin, Bringas, 1976; фотография с любезного разрешения H. C. Slavkin; *Б* – с любезного разрешения L. E. Culter.)

фильтр, эпителиальные клетки посылают через поры фильтра отростки, устанавливая контакт с капсулой (Meier, Hay, 1975). Следовательно, поверхность эпителиальных клеток роговицы получает от богатой коллагеном капсулы хрусталика какие-то инструкции.

Кроме того, внеклеточный матрикс может служить источником позиционной информации при вторичной индукции. У 5–6-дневного куриного зародыша можно наблюдать концентрацию клеток дермы в определенных локусах, которые соответствуют местам закладки перьев. Эти точки конденсации, или скопления, дермальных клеток строго упорядочены. Они возникают в виде отчетливых рядов (трактов), причем каждый **зачаток пера** появляется почти одновременно с остальными. В соседних рядах локусы дермальной конденсации располагаются в шахматном порядке (рис. 16.18). В этих точках – и только в них – произойдет закладка перьев в результате взаимодействия данных дермальных клеток с лежащей выше эктодермой. Было показано (Stuart et al., 1972), что дермальные конденсации образуются при миграции мезенхимных клеток вдоль преформированного коллагенового матрикса (рис. 16.18, *В*). После обработки кожи спины коллагеназой нарушался гексагональный характер отложения коллагена и подавлялась конденсация дермальных клеток.

Гексагональный рисунок отсутствует на коже зародышей, несущих мутацию *scaleless*; такие зародыши не способны образовывать конденсации (Goetinck, Sekellick, 1972). Кожа мутантов *scaleless* производит достаточное количество коллагена, но специфической гексагональной решетки не наблюдается. По-видимому, причиной мутации служит какой-то эктодермальный компонент кожи, поскольку и решетка, и зачатки перьев формируются, если нормальный эпидермис совместить с дермой

мутанта, но ни решетка, ни зачатки перьев не появляются, если с нормальной дермой скомбинировать мутантный эпидермис. В более поздних исследованиях было показано (Mauger et al., 1982, 1983), что в ходе нормального развития кожи коллагены типов I и III и фибронектин равномерно распределены в месте соединения дермы с эпидермисом. Развитие зачатков перьев или чешуек начинается там, где исчезает коллаген. В промежутках между зачатками количество коллагена, напротив, увеличивается. Вскоре после этого возникают точечные очаги экспрессии адгезионных молекул N-МКА, располагающиеся непосредственно под будущими зачатками перьев. Полагают (Chuong, Edelman, 1985), что белок N-МКА вызывает специфическую агрегацию клеток под эпидермисом и объединяет их в отдельные структурные единицы (гл. 15). Можно заключить, таким образом, что в процессе нормального развития кожи эктодерма передает информацию, позволяющую дермальным клеткам регулировать характер синтеза коллагена и фибронектина, что в результате обусловливает распределение коллагеновых волокон, служащих субстратом для мигрирующих клеток. Итак, эктодерма влияет на местоположение мезенхимы, которая конденсируется в определенных местах и индуцирует лежащую выше эктодерму к образованию перьев. Следовательно, несмотря на то что механизм, лежащий в основе пространственной организации этого процесса, еще не понятен полностью, очевидно, что внеклеточный матрикс играет очень важную роль в детерминации сайтов вторичной индукции в коже.

Существуют индукционные системы, не требующие контакта составляющих эти системы компонентов. Например, при индукции первной трубки клетками хордомезодермы в расположенной над ними эктодерме между индуцирующим и отвечающим на индукцию наборами клеток контакты не

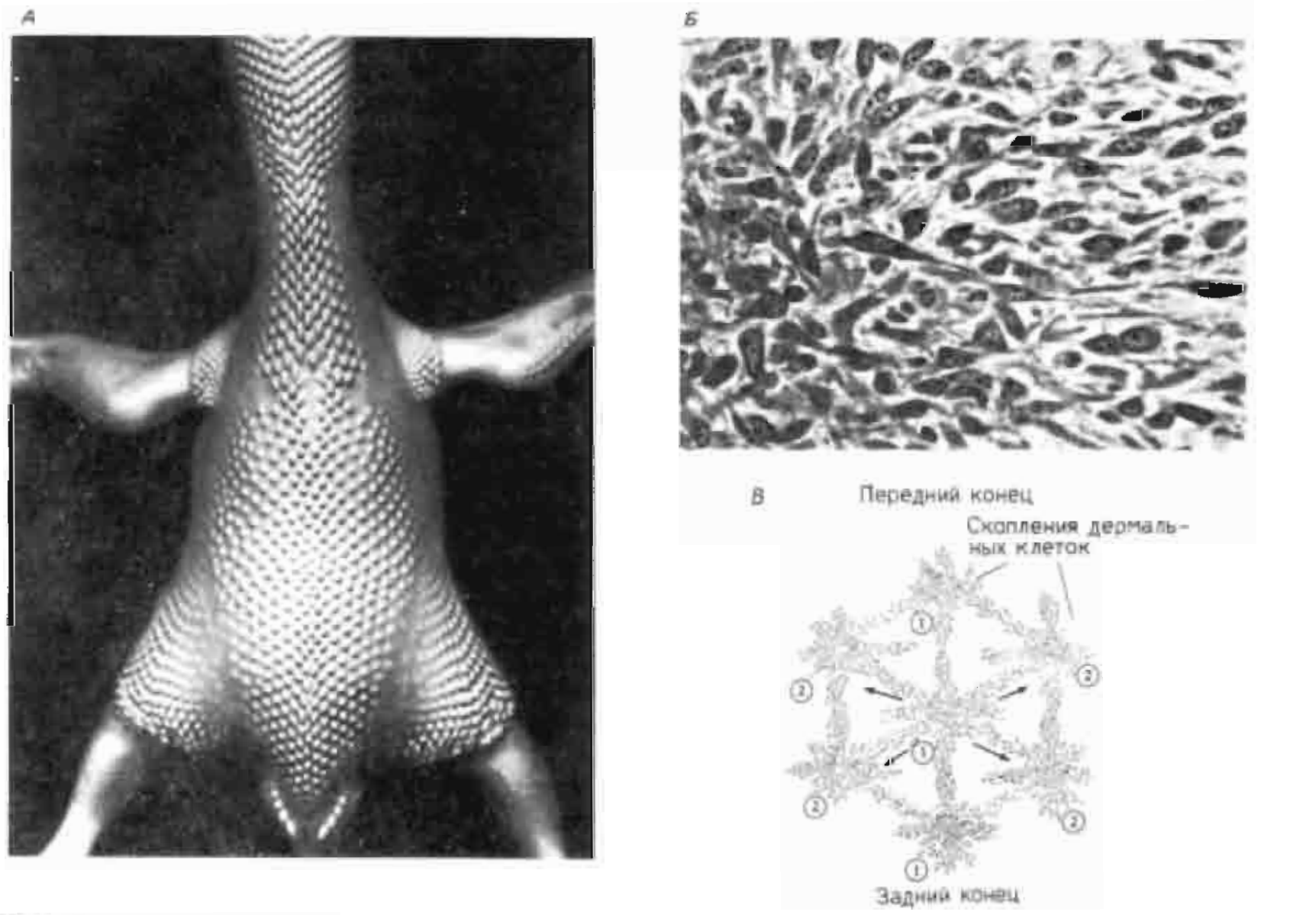


Рис. 16.18. Расположение птерилий у куриного зародыша. *А*. Птерилии на спине 9-дневного куриного зародыша. Обратите внимание на то, что зачатки перьев располагаются в шахматном порядке. *Б*, *В*. Характер расположения скоплений дермальных клеток, дающих начало зачаткам перьев на спине. *Б*. Слева видна конденсация мезенхимных клеток кожи; остальные, не агрегировавшие клетки ориентированы вдоль оси, соединяющей данное скопление клеток с соседним. *В*. Гексагональный характер агрегации дермальных клеток и их ориентировки: *1* – первичные ряды дермальных скоплений (папилл) и клетки, выстроившиеся вдоль соединяющих их осей; *2* – вторичные ряды папилл и их соединения. (*А* – с любезного разрешения P. Sengal. *Б* – из Wessells, Evans, 1968; фотография с любезного разрешения N. Wessells. *В* – из Saunders, 1980.)

обнаружены; эта индукция может происходить при наличии фильтра, разделяющего клетки обоих компонентов (Toivonen, 1979).

Сходная ситуация может иметь место и при развитии поджелудочной железы. Исследователи из лаборатории Раттера (Rutter et al., 1978) выделили из различных мезенхимных тканей гликопротеин, способный инициировать дифференцировку панкреатических эпителиальных клеток. Этот **мезенхимный фактор** может связываться с сефарозными (пластиковыми) бусинами. Фрагменты панкреатического эпителия, прикрепившиеся своими базальными концами к бусинам, адсорбировавшим мезенхимный фактор, начинают синтезировать ДНК и образовывать содержащие фермент секреторные гранулы, характерные для дифференцированных клеток поджелудочной железы. Такие же фрагменты ткани, прикрепившиеся к непокрытым бусинам, гранул не образуют. Указанное действие является специфическим именно для данного фактора, и другие белки дифференцировки не индуцируют. На рис. 16.19 представлена прикрепившаяся к бусине, покрытой мезенхимным фактором, эпителиальная клетка, которая делится и дифференцируется. Отсюда следует, что в данном случае морфогенез не служит необходимым условием клеточной дифференцировки. Клетки будут образовывать свой специфический продукт независимо от того, ветвится орган или нет. Этот фактор, вероятно, представляет собой мембранный белок, однако можно предположить и его утрату с поверхности клеток при нормальном обмене мембранных компонентов. Поэтому естественно было бы полагать, что индукция этого типа происходит либо в результате контакта мембран клеток, либо в результате взаимодействия клеток с индуцирующим продуктом, который отделился от клеточных поверхностей их соседей. Но что действительно важно отметить, – так это тот факт, что процесс индукции опосредован на уровне клеточной поверхности и что молекулы индуктора не удаляются далеко от источника своего происхождения.

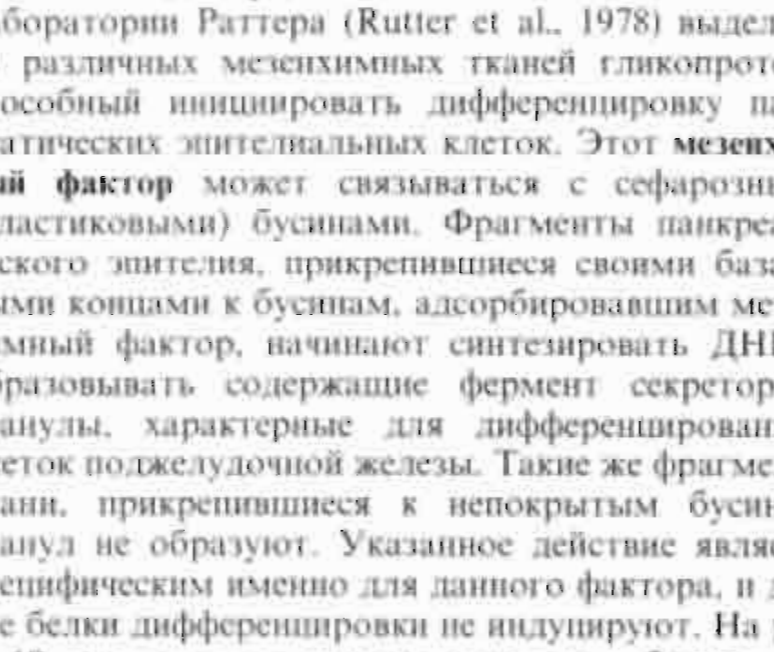


Рис. 16.19. Адсорбция и дифференцировка клеток поджелудочной железы на сефарозных бусинах, покрытых мезенхимным фактором. Видны зимогеновые гранулы и микроворсинки (указаны стрелками), характерные для дифференцированных клеток поджелудочной железы. (Levine et al., 1973; фотография с любезного разрешения W. J. Rutter.)

Механизм ветвления при формировании паренхиматозных органов

Как видно на примере почки и многих других органов, мезенхима может взаимодействовать с эпителиальной трубкой, вызывая ее ветвление. Ветвление происходит в результате того, что эпителиальные выросты разделяются щелями, оставляющими с каждой стороны от щели дольки, которые в свою очередь растут и ветвятся. Ветвление эпителиальных зачатков зависит от наличия мезенхимы. В некоторых случаях, как, например, при взаимодействии дыхательного эпителия с мезенхимой различных типов, взаимодействие является инструктивным. В большинстве же случаев эти взаимодействия оказываются чисто разрешающими. Зачатки готовы к ветвлению и формированию ацинусов, но они нуждаются в поддержке мезенхимы. Сейчас принято считать, что мезенхима вызывает формирование щели и ветвление путем расщепления дольки и избирательного переваривания части базальной пластинки эпителиальной ткани.

Контроль над формированием щели выполняют, по-видимому, молекулы коллагена. Коллагеновые волокна продуцируются мезенхимными клетками, но аккумулируются они только в пределах щелей долек (рис. 16.20) (Grobstein, Cohen, 1965; Wessells, Cohen, 1968). Более того, степень ветвления можно искусственно регулировать путем сохранения или удаления молекул коллагена (Nakanishi et al., 1986a). На рис. 16.21 представлено ветвление 12-дневного зачатка подчелюстной слюнной железы в условиях, предотвращающих разрушение коллагеновых фибрилл (в среду добавлен ингибитор коллагеназы) или ускоряющих их разрушение (в среду добавлена экзогенная коллагеназа). Без коллагена не образуются щели, однако если эндогенная коллагеназа не способна удалить избыток коллагена, то появляются сверхчисленные щели.

Механизм, посредством которого коллаген инициирует это ветвление, до сих пор не ясен. Некоторые авторы (Nakanishi et al., 1986b) полагают, что

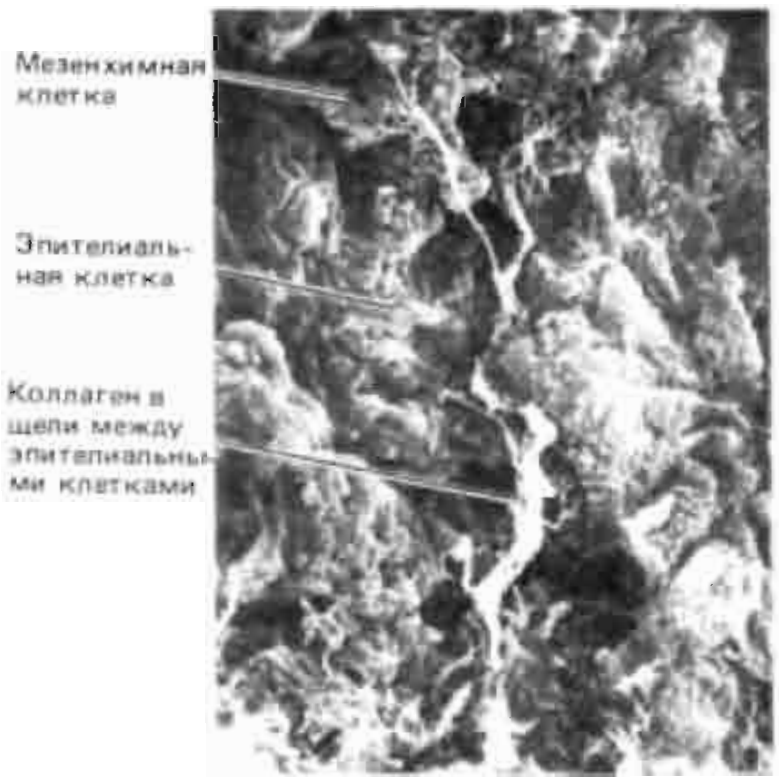


Рис. 16.20. На микрофотографии, полученной с помощью сканирующего электронного микроскопа, видна аккумуляция коллагеновых волокон в ранней щели слюнной железы 12-дневной мыши. (Из Nakanishi et al., 1986b; фотография с любезного разрешения Y. Nakanishi.)

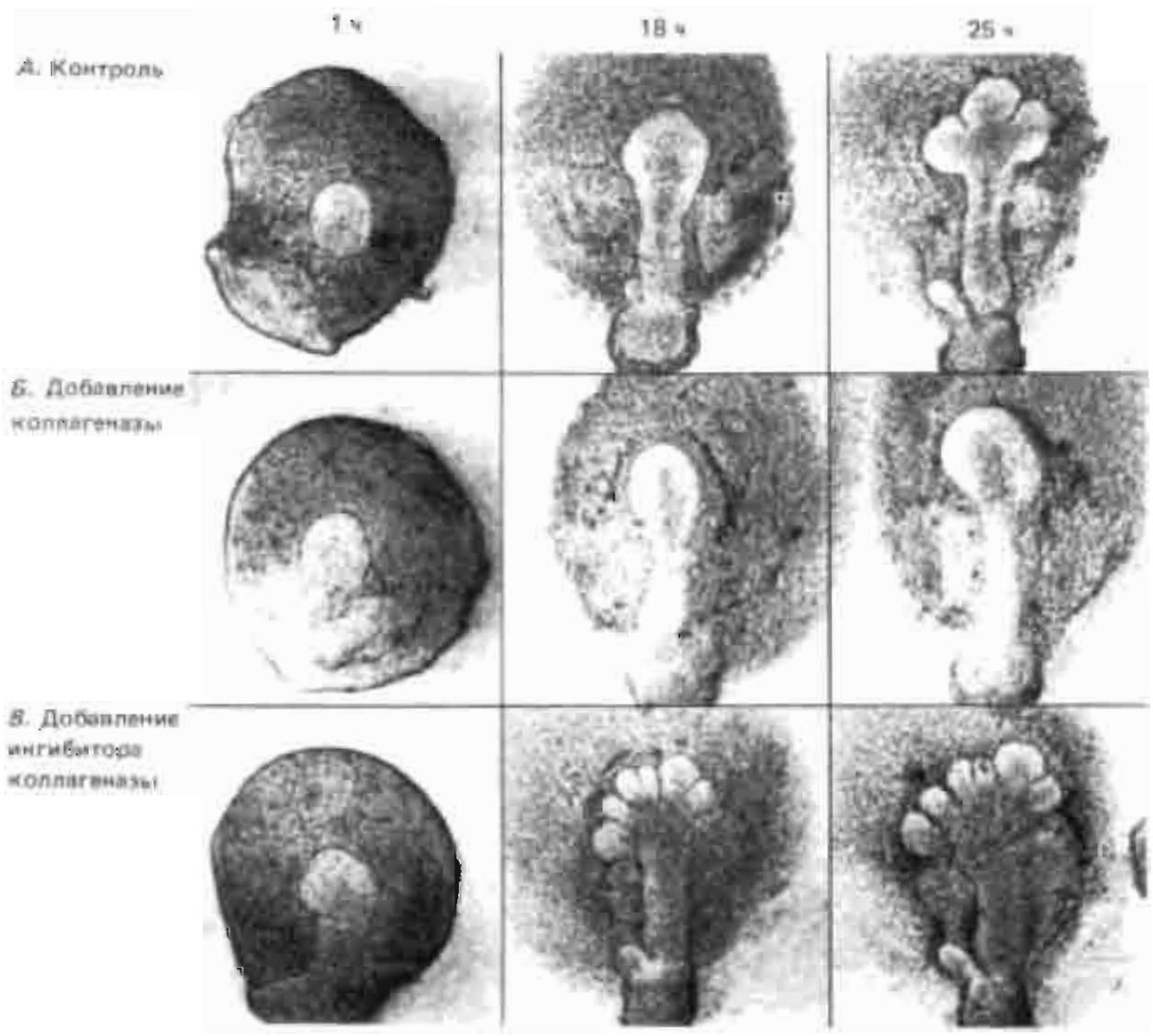


Рис. 16.21. Участие коллагена мезенхимы в формировании эпителиальной щели. Зачатки слюнной железы 12-дневной мыши помещали в культуральную среду и регистрировали их состояние через 1, 18 и 25 ч. *А*. Нормальное развитие, ведущее к формированию трех основных долей. *Б*. При добавлении в среду экзогенной коллагеназы (5 мкг/мл) долька растет, но не ветвится. *В*. Сверхчисленные ветви, которые сформировались при добавлении в среду ингибитора коллагеназы (5 мкг/мл), подавляющего активность экзогенной коллагеназы. (Из Nakanishi et al., 1986a; фотография с любезного разрешения Y. Nakanishi.)

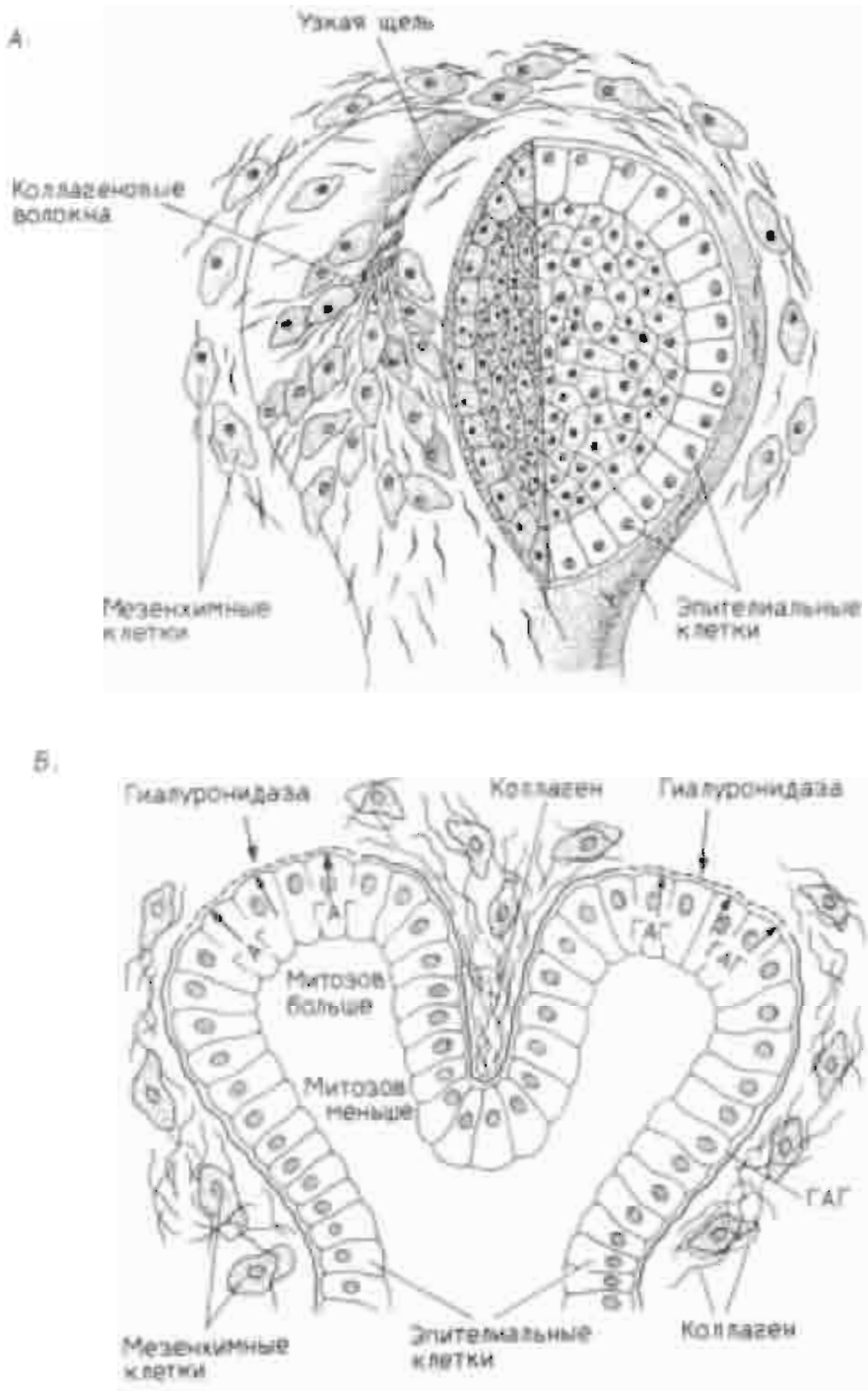


Рис. 16.22. Вероятная модель формирования щели и ветвления зачатка слюнной железы мыши. *А*. Под действием натяжения, создаваемого клетками мезенхимы, пучок коллагеновых фибрилл (изображен в виде скрученной напоминающей канат структуры) сокращается, в результате чего в дольке появляется борозда. Как показано на рис. 16.20, фибриллы протягиваются между двумя группами мезенхимных клеток. *Б*. Удлинение двух разделенных долек, ведущее к формированию ветвей, может быть обусловлено тем, что гликозаминогликаны (ГАГ) на верхушках долек более чувствительны к действию гиалуронидазы, не будучи экранированы коллагеновыми фибриллами. Стебелек дольки остается постоянным, тогда как интенсивные клеточные деления (стимулированные мезенхимой) на верхушках будут продвигать дольку вперед. (*А* – по Nakanishi et al., 1986b; *Б* – по Wessells, 1977.)

мезенхимные клетки при своей миграции ассоциируются с коллагеновыми волокнами и, накапливаясь на них, формируют гребешки, разделяющие щелями эпителиальные дольки. Эти щели становятся все более четкими по мере накопления мигрирующих мезенхимных клеток, пути которых деформируют дольку. Первоначальное формирование щели не зависит от пролиферации эпителиальных клеток (Nakanishi et al., 1987). Коллагеновые фибриллы могут отвечать и за развитие щели в отчетливые ветви. Бернфилд и Банерджи (Bernfield, Banerjee, 1982) предположили, что действие коллагена заключается в защите базальной пластинки эпителиальных клеток от действия гиалуронидазы, секретируемой мезенхимными клетками. Они показали, что мезенхимные клетки действительно переваривают гликозаминогликаны (ГАГ) долек (Banerjee, Bernfield, 1979) и что ГАГ на концах более чувствительны, чем ГАГ в щели. Разрушение базальной пластинки могло бы обеспечить отрастание ветвей благодаря стимуляции митозов в этой области. В соответствии с этой моделью, представленной на рис. 16.22, мезенхима вызывает рост эпителия, деградацию ГАГ и откладывает коллагеновые фибриллы в щели. Эпителий синтезирует материал базальной пластинки и стимулирует синтез мезенхимного коллагена. В результате происходит дифференциальное разрушение базальной пластинки на концах лопастей, дающее возможность делящимся клеткам лопасти (доли) формировать ветви. Таким образом, взаимодействие мезенхимных клеток с внеклеточным матриксом эпителия могло бы детерминировать характер ветвления органа.

Индукция плазматических клеток

Макрофаги и хелперные Т-клетки (Т-хелперы)

Изучать процессы эмбриональной индукции чрезвычайно трудно. Количество ткани, которое можно выделить из зародыша, удручающе мало, и экстрагировать из нее определенные индуцирующие агенты до сих пор было практически невозможно. Однако процессы развития никогда не прекращаются, и в организме взрослого животного постоянно происходит дифференцировка клеток некоторых типов из стволовых. В течение последних десятилетий объектом пристального изучения стала дифференцировка синтезирующих антитела плазматических клеток взрослых позвоночных. Как уже упоминалось, плазматические клетки, синтезирующие антитела, происходят от В-лимфоцитов. Каждый В-лимфоцит производит антитела определенного типа и в качестве рецептора антигена помещает его на своей клеточной мембране. Связывание с В-лимфоцитом антигенов служит сигналом для нескольких его делений, развития в нем структур, характерных для секреторной клетки (т. е. его дифференцировки), и секреции специфических антител (гл. 10).

Но одного лишь антигена не достаточно для запуска дифференцировки. Чтобы пролиферация и дифференцировка начались, требуется присутствие

клеток двух других типов. Во-первых, необходимы **макрофаги.** Полагают, что эти клетки служат поставщиком антигенов для В-лимфоцитов. В-лимфоциты обычно не реагируют должным образом на антигены в растворе. Скорее всего в макрофагах антигены подвергаются «процессингу», а затем экспонируются на их поверхности (Mosier, 1967; Unanue, Askonas, 1968).

Во-вторых, в дифференцировке В-лимфоцитов принимают участие Т-лимфоциты. Без Т-лимфоцитов В-лимфоциты не пролиферируют и не дифференцируются даже при наличии макрофагов и антигенов. Индивидуумы, у которых отсутствуют Т-клетки (это может быть следствием недоразвития тимуса), лишены возможности производить антитела к большинству веществ, несмотря на обладание популяцией В-клеток. Таким образом, индукция В-клетки к превращению ее в секретирующую антиген плазматическую клетку зависит от наличия антигена, макрофага и **Т-хелпера.**

Как эти клетки, относящиеся к иным типам, взаимодействуют с В-клетками? Сравнительно недавно (Guillet et al., 1987) была предложена следующая модель (рис. 16.23). Прежде всего макрофаги

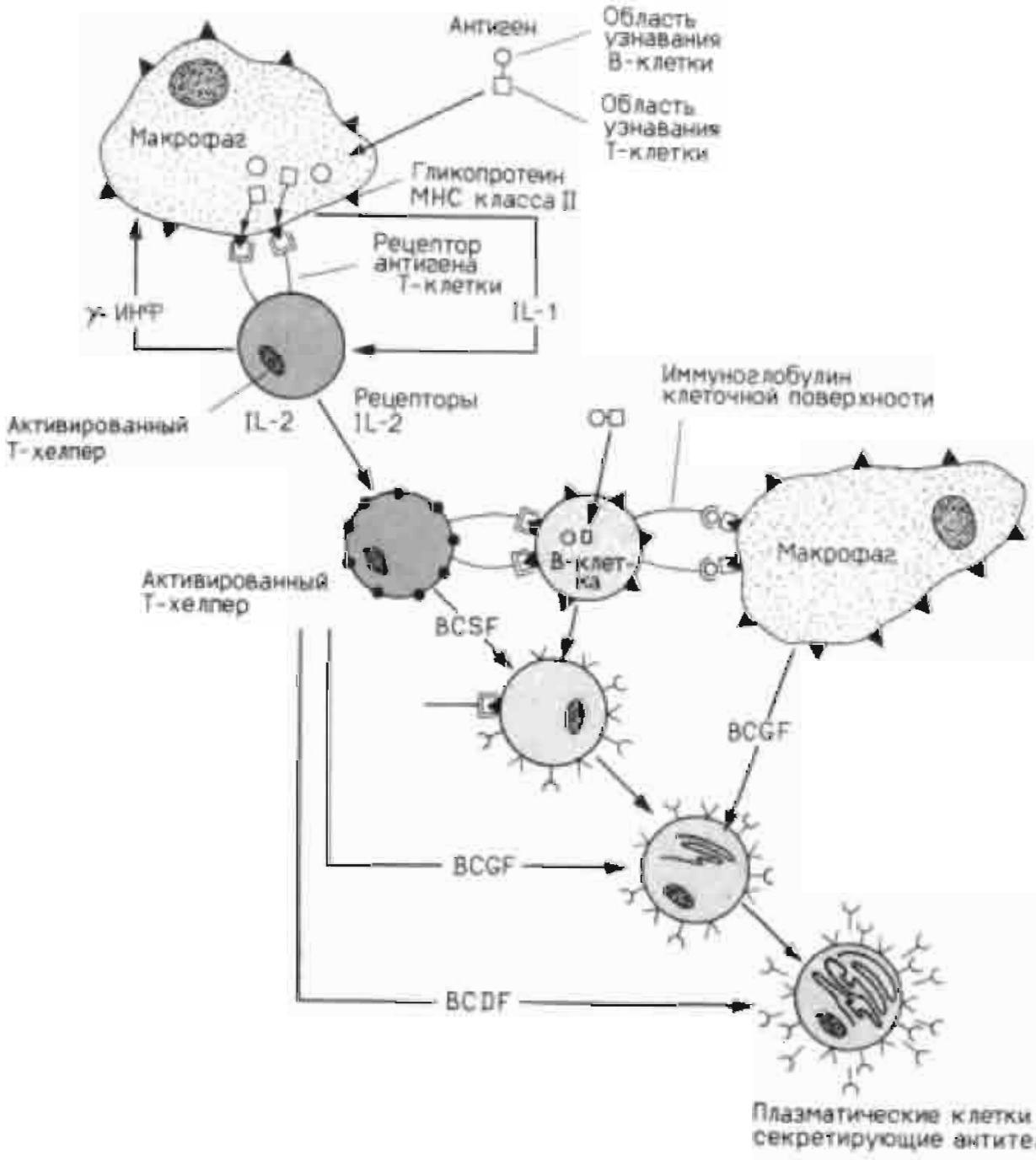


Рис. 16.23. Модель индукции дифференцировки В-клеток клетками-хелперами (индуктор) и макрофагами. Активация Т-хелперов обусловлена тем, что макрофаги захватывают антиген, частично переваривают его и перемещают на свою поверхность, где он остается связанным с гликопротеином MHC класса II. Т-клетки узнают антиген, связанный с макрофагом. Комбинация взаимосвязанных рецепторов антигена и продуцированного макрофагом интерлейкина 1 (IL-1) активирует Т-хелперные клетки, которые начинают синтезировать фактор роста интерлейкина 2 (IL-2), рецепторы IL-2 и стимулятор макрофагов γ-интерферон (γИНФ). Такие активированные Т-хелперы связываются своими репепторами с антигеном на поверхности макрофага. Взаимодействие иммуноглобулинов клеточной поверхности активирует В-клетку, делая ее чувствительной к факторам роста В-клеток (BCGF от активированных Т-хелперов и активированных макрофагов), а также к фактору дифференцировки В-клеток (BCDF) и стимулирующему фактору (BCSF) (от хелперных Т-клеток). Вся эта последовательность событий приводит к пролиферации активированных В-клеток и их дифференцировке в плазматические клетки, синтезирующие антитела.

связывают антигены (например, бактерии) и частично их переваривают. Частично переваренные фрагменты связываются с определенными мембранными гликопротеинами (с антигенами главного комплекса тканевой совместимости класса II, или MHC – от англ. "Major Histocompatibility Complex") и помещаются на клеточную поверхность макрофага. Затем Т-клетка узнает на поверхности макрофага определенные фрагменты антигена, связанные с гликопротеинами MHC класса II (в такой связанной форме их лучше узнают антиген-специфические рецепторы на поверхности Т-клеток). Эти рецепторы объединяются в кластеры на небольшой площади мембраны Т-клетки. В ходе этого процесса макрофаг секретирует **интерлейкин 1** (IL-1), активирующий Т-хелпер. Активированный Т-хелпер продуцирует фактор роста Т-хелперов – **интерлейкин 2** (IL-2) – и рецепторы для IL-2. (Кроме того, они выделяют γ-интерферон, вызывающий дальнейшую активацию макрофагов.) В-клетка также помещает частично переваренный антиген на свою клеточную поверхность (он связан с гликопротеинами MHC класса II) и предъявляет его активированным Т-хелперам (Lanzavecchia, 1985; Janeway et al., 1987). В то же самое время происходит связывание В-клеток со специфической частью антигена на макрофагах таким образом, что В-клетки, хелперные Т-клетки и макрофаги объединяются (рис. 16.24) (Inabar et al., 1984; Snow et al., 1983). Такое связывание В-клеток с антигеном усиливается иммуноглобулинами клеточной поверхности, а их поперечное связывание макрофагами активирует В-клетки. В-клетки начинают синтезировать рецепторы к факторам роста и дифференцировки В-клеток, продуцируемым Т-клетками и макрофагами (Melchers, Andersson, 1986). В состав этих индуцирующих факторов входят **стимулирующий В-клетки фактор I** (BCSF-I), который позволяет покоящимся В-клеткам приступить к пролиферации (перейти из фазы G_0 в фазу G_1) и продуцировать больше молекул антител (Lee et al., 1986; Killar et al., 1987), и **фактор роста В-клеток II** (BCGF-II), который, как было показано (O'Garra et al., 1986), воздействует на позднюю фазу G_1 клеточного цикла. Однако эти пролиферирующие В-клетки все еще не могут секретировать антитела, пока на них не воздействуют по крайней мере два других **фактора дифференцировки В-клеток** (BCDF) (Howard, Paul, 1983; Hamaoko, Ono, 1986).

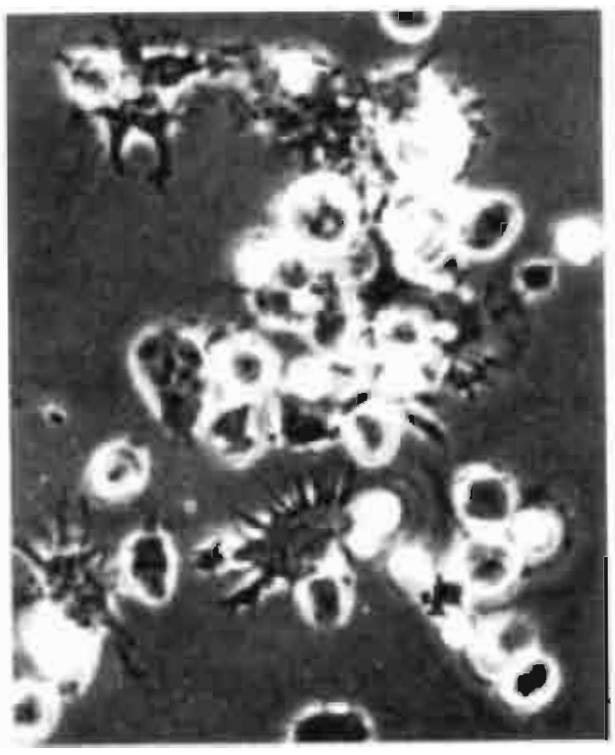


Рис. 16.24. Кластер антиген-специфических В-клеток, Т-хелперов и макрофагов из селезенки иммунизированной мыши. Крупные уплощенные клетки с многочисленными отростками – макрофаги; В- и Т-лимфоциты идентифицируются с помощью флуоресцентного мечения. (Из Inabar et al., 1984; фотография с любезного разрешения R. M. Steinman.)

Следовательно, Т-хелперы ответственны за индукцию В-клеток к превращению их в набор секретирующих антитела плазматических клеток. Т-хелперы индуцируют также макрофаги к синтезу нового набора пищеварительных ферментов, позволяющих им более эффективно разрушать бактерии. Если разрушить хелперные Т-клетки, то этих индукционных взаимодействий происходить не будет, и иммунной системе будет нанесен серьезный ущерб. Недавно было обнаружено, что хелперные Т-лимфоциты человека избирательно убивают **вирус иммунодефицита человека,** который связывается с дифференцировочным антигеном (гликопротеином CD4) на поверхности их клеток[1] (Klatzmann et al., 1984; Dalgleish et al., 1984). Утрата этих индукторных Т-клеток называется **синдромом приобретенного иммунодефицита** (СПИД, или AIDS, от "acquired immune deficiency syndrome"), который характеризуется неспособностью организма противостоять инфекционным микроорганизмам.

В течение беременности, однако, важно *сохранять* местный иммунодефицит в пределах матки, предотвращающий разрушение плода (как это случилось бы с трансплантатом). Плацентарный белок, подавляющий пролиферацию Т-хелперов, обсуждался в гл. 4; кроме того, матка обладает другой популяцией Т-клеток (называемых Т-супрессорами), которые продуцируют факторы, блокирующие активность IL-2 (Daya et al., 1987). Блокировать активность IL-1 способен и фактор, секретируемый почками беременных женщин (Brown et al., 1986). Можно полагать, что беременная матка использует нес-

[1] У человека эти клетки называют **хелпер-индукторными Т-клетками** по их функции в развитии. Гликопротеин CD4 в норме участвует в неспецифической адгезии клеток между хелпер-индукторными Т-клетками и В-лимфоцитами (Doyle, Strominger, 1987.)

колько механизмов, позволяющих блокировать индукцию иммунокомпетентных клеток, чтобы предотвратить реакцию отторжения развивающегося плода.

Неспецифическая адгезия лимфоцитов

Принято считать, что до того, как произойдет антигенспецифическое взаимодействие между лимфоцитами и макрофагами, эти наборы клеток должны распознать друг друга неспецифически. Другими словами, клетки сперва должны узнать друг друга как лимфоциты и макрофаги, и только после этого первоначального распознавания могут следовать антигенспецифические реакции. Образующиеся при этом кластеры макрофагов и лимфоцитов представлены на рис. 16.24. Полагают, что в основе узнавания макрофаг–лимфоцит лежит взаимодействие молекул гликопротеина LFA-1 клеточной мембраны. Этот гликопротеин относится к семейству рецепторов-интегринов и характеризуется многими общими последовательностями с рецепторами к фибронектину. Они обнаружены на В-клетках, Т-клетках и макрофагах (Springer et al., 1984). Фрагменты моноклональных антител против этого гликопротеина ингибируют адгезию Т-хелперов к макрофагам (так же, как и другие адгезионные реакции в иммунной системе), и лица с наследуемым отсутствием гликопротеина LFA-1 страдают от врожденного иммунодефицита, т. е. они не способны давать иммунный ответ на обычные микроорганизмы (Springer, 1987).

Итак, мы имеем дело с системой, где один набор клеток – Т-лимфоциты-хелперы – может индуцировать дифференцировку другой группы клеток – В-лимфоцитов. В-лимфоциты (как уже обсуждавшиеся клетки поджелудочной железы) обладают способностью синтезировать небольшое количество дифференцировочного белка, но они его не секретируют. Их цитодифференцировка происходит после стимуляции клетками другого типа. При этом формируются комплексы Гольджи и гранулярный эндоплазматический ретикулум; начинается синтез белка и его модификация в этих структурах с последующей секрецией из клетки.

Таким образом, индукция В-клеток очень похожа на индукционные явления у зародыша, но значительно более доступна для изучения. Одно из преимуществ изучения индукции В-клеток заключается в том, что мы можем работать с клонами опухолевых клеток, которые все еще сохраняют способность отвечать на индуцирующие молекулы. Лимфокины были открыты при работе с клонами злокачественных Т-клеток, секретирующих определенные белки, и с клонами опухолевых В-клеток, не способных расти в отсутствие этих факторов. Эти опухоли представляют собой различные «замороженные» стадии дифференцировки лимфоцитов. Воспользовавшись клеточными линиями таких опухолей, исследователь может иметь в своем распоряжении большое число лимфоцитов на любой нужной стадии дифференцировки. Пока такие стадиеспецифические опухолевые клетки существуют только для лимфоцитов, но есть основания надеяться, что эта техника в будущем найдет более широкое применение (Houghton et al., 1987). При изучении индукции и идентификации молекул индуктора опухоли для биологов развития могут стать тем, чем мутанты служат генетикам (Pierce, 1985). Их использование в исследованиях иммунной системы позволило нам получить первые представления о молекулярной природе индукции.

Дополнительные сведения и гипотезы

Поперечные связи и индукция

Нам еще не известен механизм, с помощью которого одна популяция клеток индуцирует изменения в другой. Вполне вероятно, что индукция, как и оплодотворение, является «препрограммированным» ответом, который активируется каким-либо триггерным событием. Изучение активации В-лимфоцитов позволяет предположить, что таким триггером для дифференцировки плазматических клеток служат поперечные связи антител клеточной поверхности. Кроме того, более поздние исследования, выполненные на других индуцибельных тканях, свидетельствуют о том, что агрегация рецепторных молекул клеточной поверхности может обеспечить общий путь запуска индукции.

При развитии В-клеток в плазматические клетки молекулы антител на клеточной поверхности служат рецепторами антигенов. Связав антиген с помощью рецепторов, В-клетки приступают к пролиферации и дифференцировке. Исследования, проведенные в лаборатории Джералда Эделмана (см.

обзор Edelman et al., 1974), показали, что антигенная стимуляция может быть имитирована агентами, действующими на уровне клеточной поверхности путем объединения определенных рецепторов. Антитела клеточной поверхности могут быть связаны вместе другими антителами, полученными на эти исходные поверхностные антитела. Анти-антитела вызовут агрегацию рецепторов антигенов на одной из сторон клетки наподобие шапочки («кэп») (рис. 15.19). И кэппинг, и митогенная активность зависят от способности связывать вместе рецепторы клеточной поверхности. Если антитела расщепить так, чтобы они не могли вызывать образование поперечных связей между молекулами рецепторов антигена, то они теряют способность стимулировать клетки к пролиферации и дифференцировке.

Если небольшие молекулы антигена связаны вместе линейно, то они могут непосредственно индуцировать дифференцировку В-клеток. Диниис и др. (Dintzis et al., 1976, 1982) приготовили полимеры разной длины из простых молекул динитрофенола (ДНФ). Затем эти линейные полимеры смешивали с изолированными В-лимфоцитами. В тех случаях, когда связывали вместе 12 или менее молекул ДНФ, ответа не было. Однако если полимеризовались 20 или более молекул ДНФ, то смешанные с ними В-клетки, узнающие ДНФ, начинали пролиферацию и дифференцировку. На этой основе авторы пришли к выводу, что для индукции Т-независимых В-клеток требуется определенное количество поперечных связей.

Было показано, что поперечные связи поверхностных антител служат ключевым активатором их дальнейшей дифференцировки. Образовав поперечные связи между молекулами поверхностных антител, В-клетки экспрессируют набор рецепторов для растворимых лимфокинов, секретируемых Т-хелперами. Они приобретают способность отвечать на продуцируемый Т-клетками интерлейкин, в результате чего происходит их деление и дифференцировка в секретирующие антитела плазматические клетки (Yaffe, Finkelman, 1983).

Подобное перераспределение молекул на клеточной поверхности может иметь существенное значение для дифференцировки. В гл. 3 уже говорилось о том, как поляризация компонентов мембраны на одной стороне клетки приводит к компактизации. В некоторых работах (Chow, Poo, 1982) были получены сходные результаты: при культивировании эмбриональных мышечных клеток *Xenopus* резко изменяется распределение их рецепторов к лектину соевых бобов. Сначала эти рецепторы случайно распределены на клеточной мембране, но при слипании клеток происходит аккумуляция этих гликопротеинов в месте контакта клеток друг с другом (рис. 16.25).

Известно, что поперечные связи рецепторов клеточной поверхности опосредуют изменения двумя основными способами. Один заключается в активации ферментов клеточной поверхности, изменяющей внутреннюю биохимию клетки. Такие изменения наблюдаются при инициации секреции гистамина тучными клетками во время аллергической атаки. Гранулы гистамина располагаются в тучных клетках непосредственно под поверхностной мембраной. На поверхности тучных клеток локализуются рецепторы к иммуноглобулину Е – типу антител, характерному для аллергических реакций. IgE связан со специфическими рецепторами на поверхности тучной клетки, где он может соединиться с веществом, вызывающим аллергию (аллергеном). Как показано на рис. 16.26, аллерген обусловливает образование поперечных связей между двумя или более молекулами IgE, в результате чего рецепторы объединяются. После этого – и только после этого – происходит выделение гистамина. Полагают, что образование поперечных связей активирует связанные с мембраной метилтрансферазы, которые изменяют липидную структуру мембраны путем метилирования некоторых фосфолипидов (Ishizaka et al., 1980). Это изменение в строении мембраны обусловливает поток ионов кальция в клетку. Гистаминвысвобождающий аппарат находится в состоянии готовности, и для его активации нужны только ионы кальция. Итак, образование поперечных связей запускает



Рис. 16.25. Перераспределение мембранных молекул, зависящее от взаимодействий между клетками. Лектин соевых бобов, меченный флуоресцентной меткой, распознает набор гликопротеинов клеточной поверхности, содержащих экспонированную галактозу N-ацетилгалактозаминовых сахаров. Сначала эти гликопротеины были случайно распределены по поверхности эмбриональных мышечных клеток. После соединения клеток друг с другом эти белки сконцентрировались в областях межклеточного контакта. (Из Chow, Poo, 1982; фотография с любезного разрешения I. Chow, M. M. Poo.)

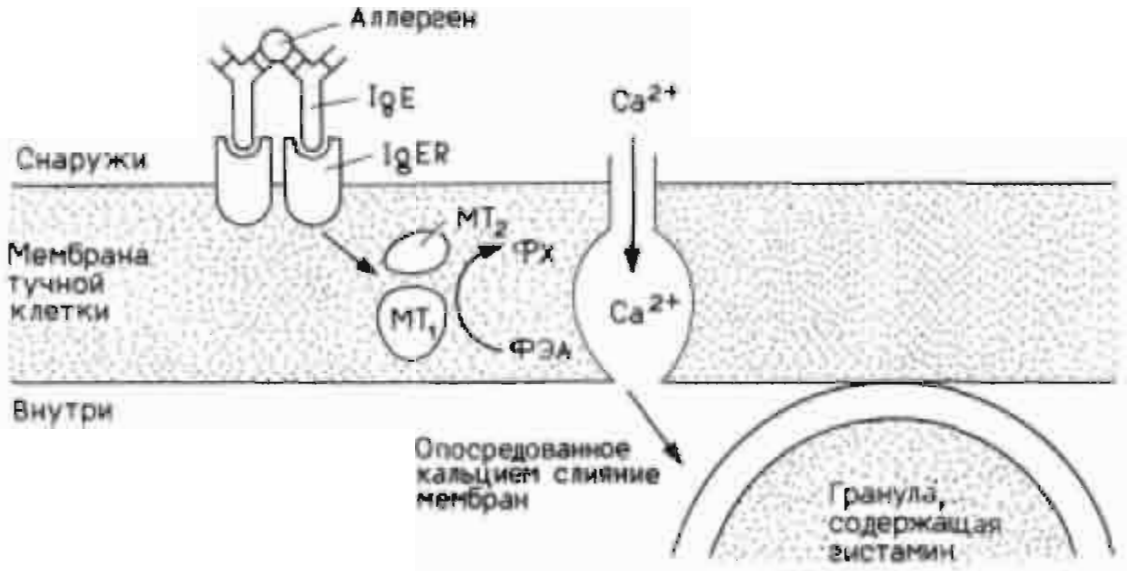


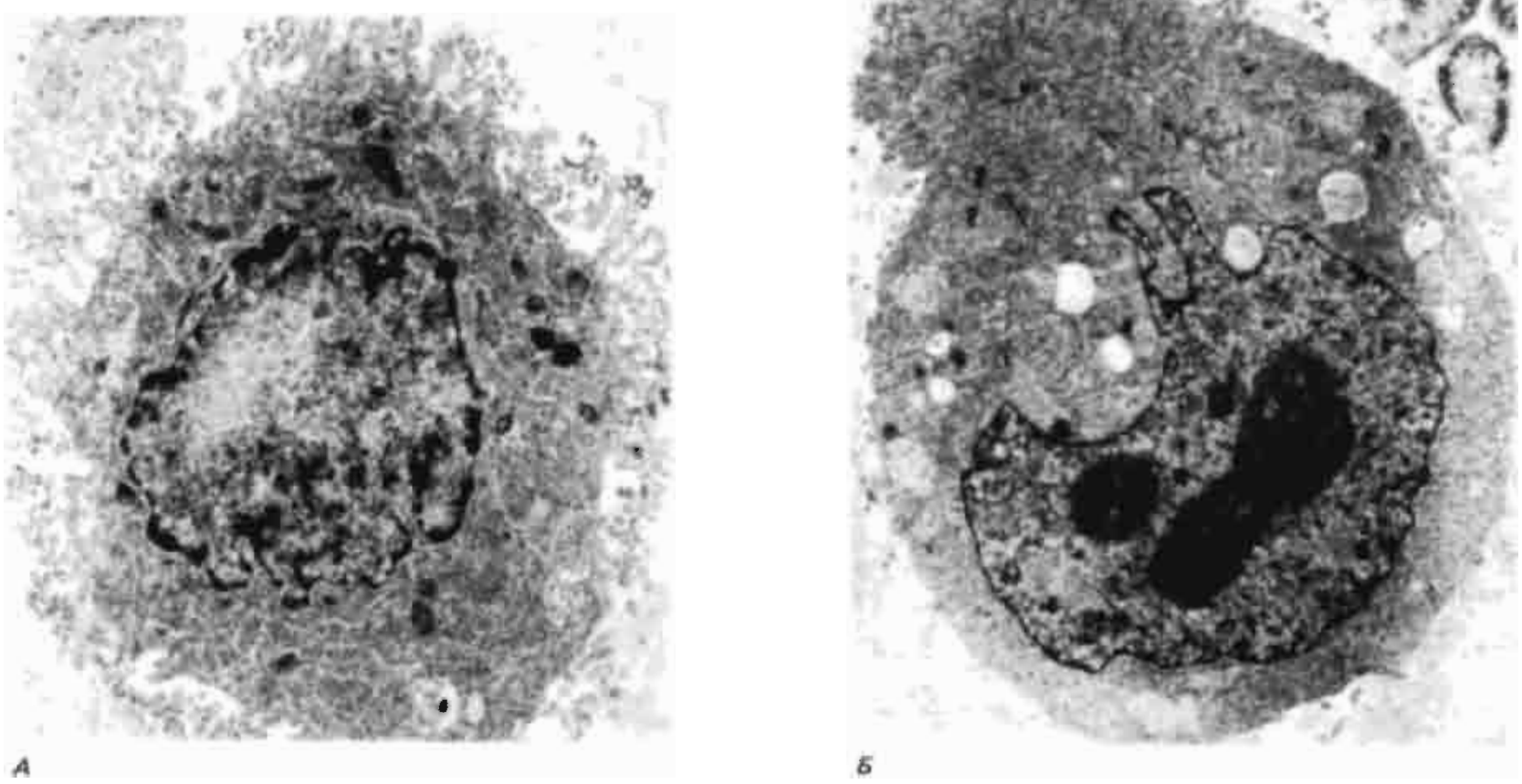
Рис. 16.26. Поперечные сшивки рецепторов IgE на мембране тучных клеток создают условия для высвобождения гистамина («аллергической реакции»). Молекулы IgE связываются со специфическими поверхностными рецепторами тучных клеток. Аллерген образует поперечные мостики между иммуноглобулиновыми антителами (стадия 1). Связывание этих рецепторов активирует две метилтрансферазы (MT_1, MT_2; стадия 2), которые превращают фосфатидилэтаноламин (ФЭА) в фосфатидилхолин (ФХ, стадия 3). Эти изменения в строении мембраны обусловливают поступление ионов кальция (стадия 4), что приводит к слиянию гистаминсодержащих гранул с клеточной мембраной и экзоцитозу их содержимого.

клеточные процессы, к которым уже потенциально готова цитоплазма.

Формирование поперечных связей может также влиять на клеточную дифференцировку путем перестройки цитоскелета. Связанные мостиками молекулы клеточной поверхности иногда оказываются соединенными с микротрубочками или микрофиламентами в цитоплазме. В результате реорганизация молекул клеточной поверхности отражается на реорганизации внутреннего цитоскелета. Поперечно связанные поверхностные антитела В-клеток соединены с актиновыми микрофиламентами внутри клетки (Flanagan, Koch, 1978), и процесс петчинга фибробластов может быть приостановлен с помощью препаратов, ингибирующих полимеризацию актина (Ash, Singer, 1976). Элизабет Хэй и ее коллеги показали (Sugrue, Hay, 1982; Tomasek et al., 1982), что внеклеточный матрикс капсулы хрусталика может индуцировать дифференцировку клеток роговицы у куриного зародыша путем фиксации белков клеточной поверхности в определенной конфигурации. Добавление коллагена к культивируемому на фильтре эмбриональному эпителию, из которого образуется роговица, вызывает уплощение его клеток (путем реорганизации их цитоскелета) и инициирует изменения, сопровождающие развитие роговицы. Вполне вероятно, что клетки будущей роговицы продуцируют коллаген, положение которого фиксируется фибронектином. Последний не синтезируется эпителиальными клетками, а является продуктом мезенхимы, мигрирующей в область роговицы из нервного гребня. Следовательно, индукция роговицы может быть обусловлена секрецией мезенхимой фибронектина, который фиксирует коллаген в определенной конфигурации, что в свою очередь изменяет пространственную организацию внутреннего цитоскелета. Подобные перераспределения цитоскелета могут привести к вхождению в клетку новых ионов или к реализации препрограммированного набора инструкций, которым обладает данная детерминированная клетка.

Такое программирование ядерных событий поперечными связями между молекулами клеточной поверхности наблюдается при устойчивой вирусной инфекции (Oldstone, 1982). Вирус кори, инфицировавший клетки, синтезирует гликопротеиновые антигены, которые затем встраиваются в клеточную мембрану инфицированной клетки. Антитела против этих антигенов (образующихся в организме в процессе иммунного ответа) связываются с вирусными антигенами на клеточной поверхности и служат триггером реакции кэппинга (рис. 16.27). После того как это произойдет, сигнал, каким-то образом переданный в клетку, изменит внутриклеточный синтез продуктов вирусного генома. Один из продуктов становится слишком фосфорилированным, тогда как синтез другого прекращается совсем. Бóльшая часть других клеточных функций продолжает осуществляться как обычно. Описанный эффект специфичен для гликопротеина кори, а что касается антител к гликопротеинам клетки-хозяина, то они его не имитируют.

Итак, вполне возможно, что процесс индукции включает связывание определенных молекул с клеточной поверхностью отвечающей клетки. Этот тип молекул может «замораживать» движение некоторых мембранных молекул в плоскости мембраны



А *Б*

Рис. 16.27. Явление кэппинга после реакции связанных с клеткой вирусных антигенов со специфическими антителами. Представлены электронные микрофотографии культивируемой клетки человека, инфицированной вирусом кори in vitro (*А*), и таким же образом инфицированной клетки после добавления антител против вируса кори (*Б*). Антитела вызывают кэппинг, связанный с мембраной вирусного антигена. (Из Oldstone, 1982; фотография с любезного разрешения M. Oldstone.)

и каким-то образом изменять внутреннюю химию клетки. В настоящее время дифференцировка лимфоцитов служит наилучшей моделью такого процесса, и исследователям предстоит выяснить, работают ли подобным образом другие индуцибельные системы.

Индукция на уровне одной клетки

Sevenless и *bride of sevenless*

Об эмбриональной индукции мы говорим тогда, когда взаимодействия между индуцирующими и отвечающими клетками приводят к изменению пути развития отвечающей клетки (Jacobson, Sater, 1988). Если клетка не подвергается индукционному воздействию, то она становится клеткой одного типа, если же индукционное воздействие имеет место, то она становится клеткой другого типа. До сих пор мы обсуждали индукцию на уровне тканей, а не клеток. Современные исследования в области генетики развития *Drosophila* и *Caenorhabditis* показали, что индукция может происходить на уровне клетка–клетка. В качестве наиболее яркой иллюстрации можно привести формирование фоторецепторов сетчатки в глазу *Drosophila*. В состав сетчатки входит около 800 единиц, называемых **омматидиями** (рис. 16.28). Каждый омматидий состоит из 20 определенным образом расположенных клеток. Глаз развивается в слое плоского эпителия имагинального диска глаза личинки. Сверху и снизу этот эпителий не имеет непосредственно связанных с ним клеток, поэтому взаимодействия ограничиваются только соседними клетками. Дифференцировка случайно расположенных эпителиальных клеток в фоторецепторы сетчатки и окружающих их клеток в ткань хрусталика происходит у личинки последнего (третьего) возраста. На задней границе имагинального диска образуется борозда, которая распространяется по эпителию к переднему краю (рис. 16.29). По мере распространения борозды соседствующие с ней клетки начинают дифференцироваться в определенном порядке. Первая из развивающихся клеток становится центральным (R8) фоторецептором. (Пока неизвестно, каким образом

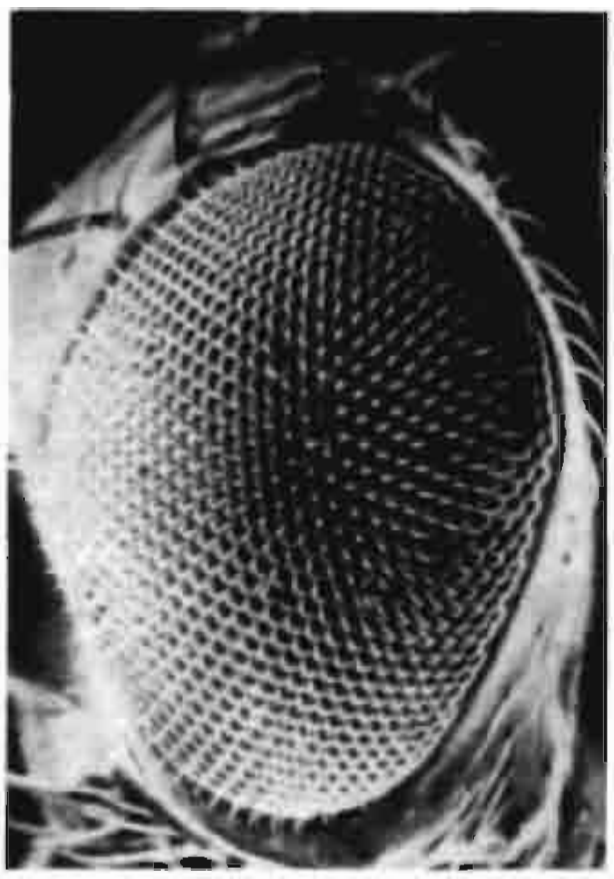


Рис. 16.28. Микрофотография сложного глаза *Drosophila*, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Каждая фасетка представляет собой один омматидий. От каждого омматидия отходит чувствительная щетинка. (Фотография с любезного разрешения T. Venkatesh.)

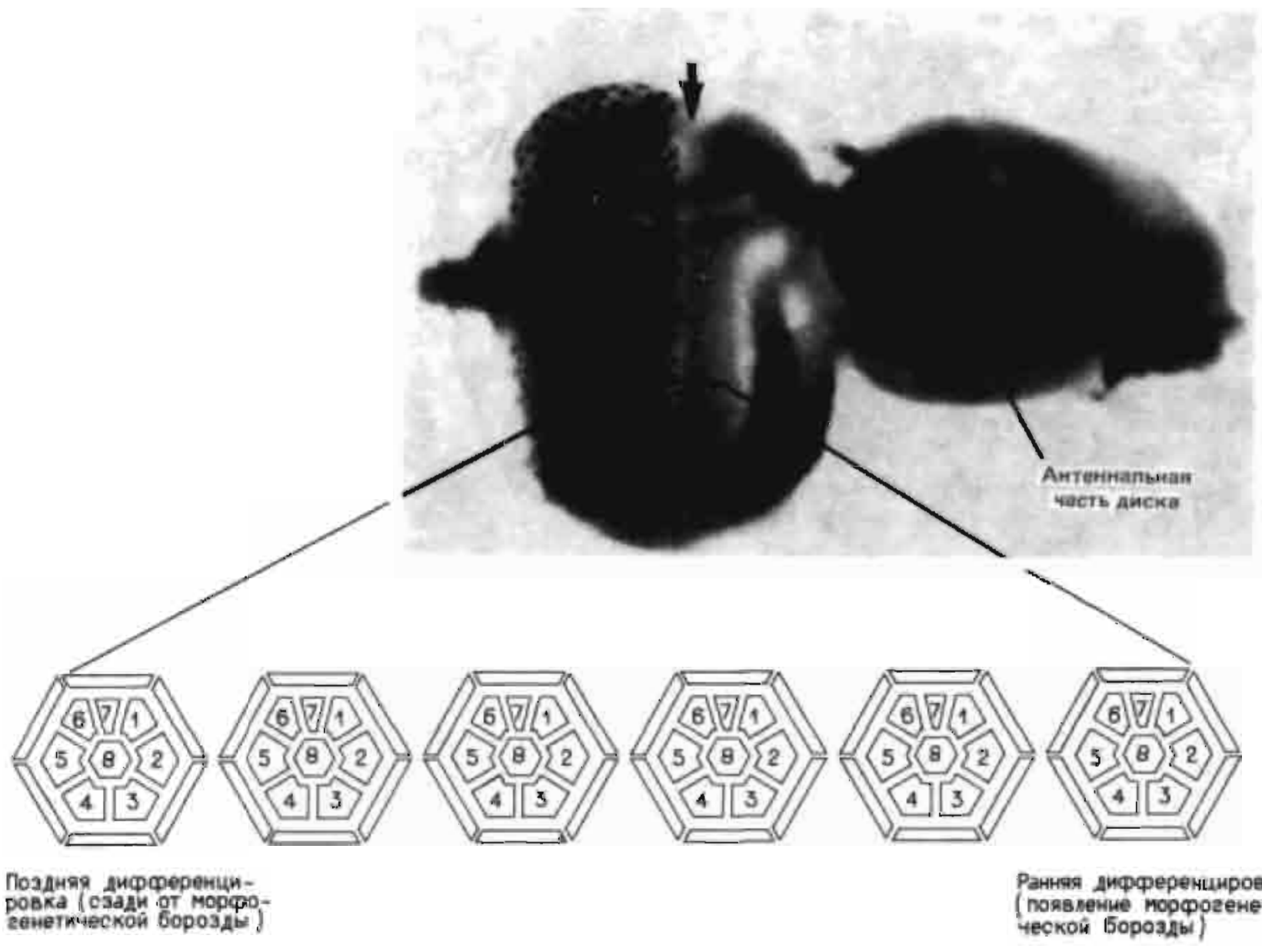


Рис. 16.29. Дифференцировка фоторецепторов в имагинальном диске глаза поздней личинки. Морфогенетическая бороздка (*стрелка*) пересекает диск от его заднего конца (*слева*) к переднему (*справа*). Позади борозды в определенной последовательности дифференцируются фоторецепторы (показаны ниже). Первая дифференцирующаяся клетка – R8. Она индуцирует дифференцировку R2 и R5; каскад индукций продолжается до тех пор, пока не дифференцируется фоторецептор R7. (По Tomlinson, 1988; фотография с любезного разрешения T. Venkatesh.)

борозда инструктирует данную клетку, чтобы она стала фоторецептором R8.) Полагают, что клетка R8 индуцирует клетку над ней и клетку под ней (по отношению к прохождению борозды) к превращению их соответственно в фоторецепторы R2 и R5. Фоторецепторы R2 и R5 функционально эквивалентны, поэтому предполагается, что сигнал, направляющийся от R8 к этим клеткам, один и тот же (Tomlinson, Ready, 1987). Сигналы от этих клеток индуцируют еще четыре соседние клетки к превращению в фоторецепторы R3, R4 и затем R1 и R6. Последним появляется фоторецептор R7. Клетки, располагающиеся вокруг фоторецепторов, становятся клетками хрусталика. Детерминация хрусталика является результатом «невыполнения условий», т. е. результатом отсутствия индукции.

Обнаружена серия мутаций, блокирующая некоторые из этапов этого индукционного каскада. Так, мутация *rough* (*ro*) блокирует индукцию фоторецепторов R3 и R4. Мутация *sevenless* (*sev*) и мутация *bride of sevenless* (*boss*) препятствуют дифференцировке клетки R7. (Она становится хрусталиковой.) Анализ этих мутаций показал, что они связаны с процессом индукции. Ген *sevenless* необходим самой клетке R7. Если создать мозаичный зародыш так, что одни клетки глаза принадлежат дикому типу, а другие гомозиготны по мутации *sevenless*, то фоторецептор R7 развивается лишь в том случае, когда клетка-предшественница R7 имеет аллель *sevenless* дикого типа (Basler, Hafen, 1989; Bowtell et al., 1989). С помощью антител к этому белку было обнаружено, что он локализуется в плазматической мембране, а последовательность гена *sevenless* свидетельствует о том, что это трансмембранный белок с тирозинкиназным сайтом в цитоплазматическом домене (Hafen et al., 1987; Banerjee et al., 1987). Указанные признаки дают некоторое представление о функции данного белка: вероятно, он служит рецептором некоего сигнала.

Этот сигнал, вынуждающий предшественницу R7 дифференцироваться в фоторецептор R7, поступает прямо или косвенно от белка, кодируемого аллелем дикого типа *bride of sevenless*. Мухи, гомозиготные по мутации *boss*, также не имеют фоторецепторов R7. Изучение генетических мозаиков, у которых некоторые клетки имагинального диска относятся к дикому типу, а другие гомозиготны по мутации *boss*, показали, что ген *boss* дикого типа для возникновения фоторецептора R7 не нужен. Этот фоторецептор будет дифференцироваться лишь при условии, что ген *boss* будет экспрессироваться в *клетке R8*. Таким образом, ген *bride of sevenless* кодирует некий белок, присутствие которого в клетке R8 необходимо для дифференцировки клетки R7. Сигнал, исходящий от белка boss, вероятно, передается на уровне клеточного контакта. Ген *boss*

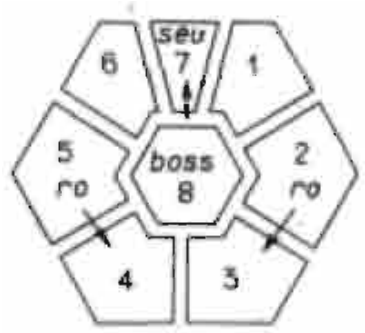


Рис. 16.30. Перечень генов, о которых известно, что они участвуют в индукции фоторецепторов у *Drosophila*. Для того чтобы за дифференцировкой фоторецепторов R8, R2 и R5 последовала дифференцировка других фоторецепторов, и в R2, и в R5 должен присутствовать ген *rough* (*ro*). Для дифференцировки фоторецептора R7 необходима активность гена *sevenless* (*sev*) в предшественнике R7, тогда как ген *bride of sevenless* (*boss*) должен быть активен в фоторецепторе R8. (По Rubin, 1989.)

дикого типа в клетке R8 одного омматидия не исправляет дефекта мутантного аллеля *boss* в соседнем омматидии (Reinke, Zipursky, 1988). Сводка известных индукций клетка–клетка в сетчатке *Drosophila* (рис. 16.30) показывает, что индивидуальная клетка способна индуцировать другую индивидуальную клетку, чем достигается точное расположение клеток в данной ткани.

Индукция вульвы у *Caenorhabditis elegans*

Развитие вульвы у *C. elegans* дает несколько примеров индукции на клеточном уровне. Первый из них представлен индукцией якорной клетки гонады. Как уже обсуждалось в гл. 11, формирование якорной клетки опосредовано геном *lin-12*, который, как полагают, кодирует рецепторный белок клеточной поверхности. У гермафродитов дикого типа потенциальной способностью стать якорной клеткой гонады обладают две соседние клетки – Z1.ppp и Z4.aaa. Эти клетки взаимодействуют таким образом, что в результате одна из них становится якорной клеткой гонады, а другая дает ткань матки. У рецессивных мутантов *lin-12* обе клетки становятся якорными, а у доминантных мутантов обе оказываются предшественницами матки (Greenwald et al., 1983). Результаты исследований с использованием генетических мозаиков и удалением клеток показали, что этот выбор происходит у личинки второго возраста и что функционирование гена *lin-12* необходимо лишь той клетке, которая станет предшественницей ткани матки. Презумптивной якорной клетке он не нужен. Было высказано предположение (Seydoux, Greenwald, 1989), что обе эти клетки изначально синтезируют и сигнал к дифференцировке матки (он еще не идентифицирован), и рецептор для этого модуля – белок lin-12. На определенном этапе развития личинки клетка, у которой секреция сигнала дифференцировки случайно оказалась более высо-

кой, вынуждает своего соседа снизить продукцию сигнальных молекул и повысить продукцию белка lin-12. Клетка, секретирующая сигнал, становится якорной клеткой гонады, а клетка, воспринимающая сигнал с помощью белка lin-12, становится брюшной клеткой-предшественницей матки. Таким образом, предполагается, что до проявления признаков дифференцировки эти две клетки детерминируют друг друга.

Следующий пример связан с детерминацией якорной клеткой судьбы шести **клеток-предшественниц вульвы.** Каждая из этих шести клеток эквипотенциальна и с одинаковым успехом может идти по одному из трех путей развития. Судьба этих клеток в значительной степени детерминируется близостью к якорной клетке. Якорная клетка служит источником сигнала, предположительно, способной к диффузии молекулы. Действие сигнала определяется положением его источника и мишени (рис. 16.31). Судьба клетки-предшественницы вульвы, располагающейся ближе всего к якорной клетке (обычно это P6.p), определяется первой: она получает инструкции к совершению трех симметричных делений, в результате которых образуются клетки вульвы. Далее определяется судьба двух клеток, расположенных по сторонам от этой первичной клетки: они инструктируются якорной клеткой к асимметричным делениям, дающим дополнительные клетки вульвы. Оставшиеся три потенциальные предшественницы вульвы не получают инструкции к дифференцировке вульвы. Их судьба – пройти одно деление, результатом которого будут клетки гиподермы нематоды (Ferguson et al., 1987). Если якорную клетку удалить сфокусированным лазерным лучом, то все шесть предшественников вульвы останутся неиндуцированными и дадут гиподерму (Kimble, 1981).

Помимо сигнала, источником которого служит якорная клетка, еще один сигнал – от первичных клеток-предшественниц вульвы, – по-видимому, стабилизирует судьбу клеток. Этот сигнал, действующий на очень близком расстоянии, ингибирует вторичные предшественники вульвы, не позволяя им вступить на путь дифференцировки первичных предшественников, т. е. обеспечивает **латеральное ингибирование** (Sternberg, 1988).

Недавно была изучена генетическая основа этих индукций (Sternberg, Horvitz, 1989; Seydoux, Greenwald, 1989). Было обнаружено, что развитие вульвы регулируется по меньшей мере тремя наборами генов. Это *Vulvaless* (*Vul*), *Multivulva* (*Muv*) и *lin-12*. Дефектные по гену *Vul* нематоды не имеют вульвы (т. е. для ее образования необходим ген дикого типа). Все клетки-предшественницы вульвы у таких мутантов следуют по третьему пути развития. Напротив, у червей без генов *Vul* имеются вульвы, образованные каждой из шести потенциальных клеток-предшественниц вульвы; таким образом, для того чтобы предотвратить образование вульв из всех шести клеток-предшественниц, необходим аллель дикого типа, который ингибирует все клетки-предшественницы, кроме одной. Продукт гена *Multivulva*, который содержат все шесть вульвальных предшественниц, как полагают, ингибирует ген *Vulvaless*. При этом клетки-предшественницы не будут дифференцироваться в клетки вульвы, а дадут начало гиподерме. Однако сигнал от якорной клетки снимает репрессию *Muv*, и у клеток, получивших

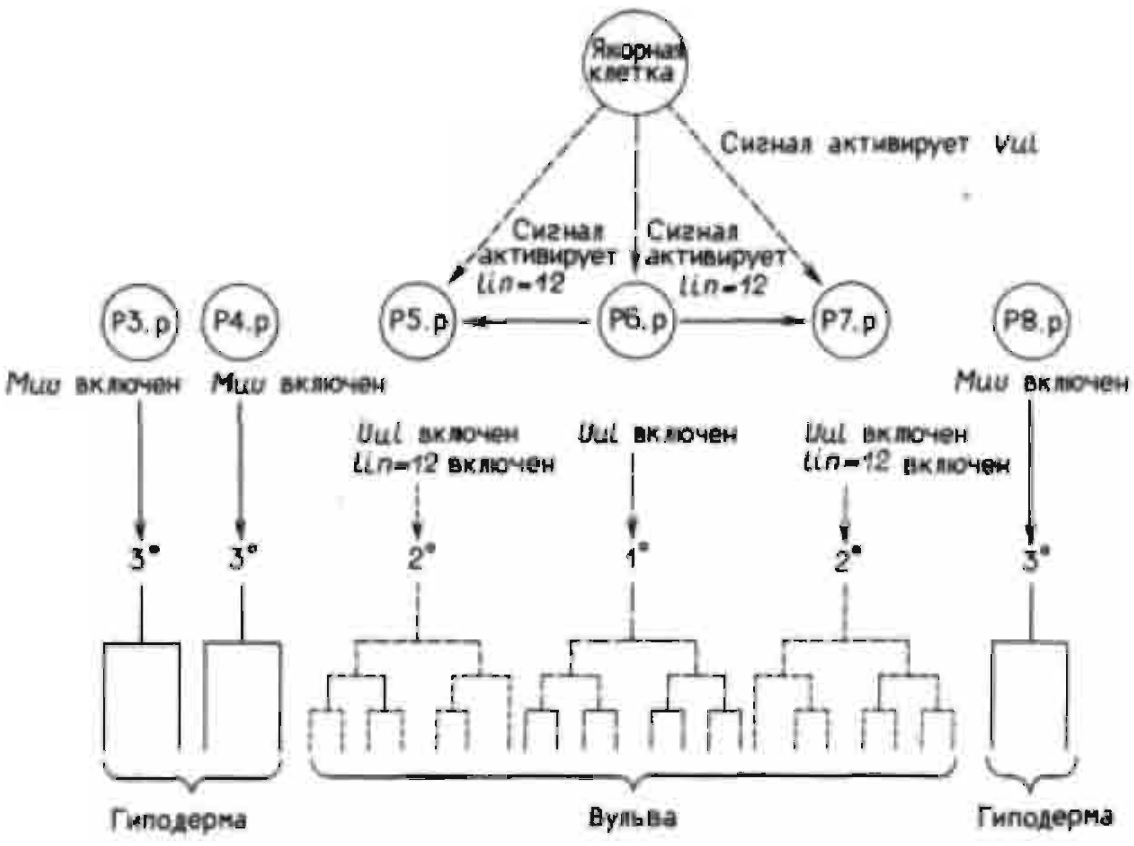


Рис. 16.31. Детерминация клеток вульвы у *C. elegans*. Сигнал со стороны якорной клетки вызывает активацию генов *Vulvaless* в трех из шести потенциальных клетках-предшественниках. Клетка, ближайшая к якорной, становится первичным предшественником вульвы. У трех клеток, не получивших стимула от якорной клетки, гены *Multivulva* репрессируют гены *Vulvaless* и эти клетки дифференцируются в гиподерму. Клетка-предшественник, ближайшая к якорной клетке, секретирует сигнал ближайшего действия, индуцирующий соседние клетки к активации гена *lin-12*. Этот ген обусловливает их дифференцировку во вторичные предшественники вульвы.

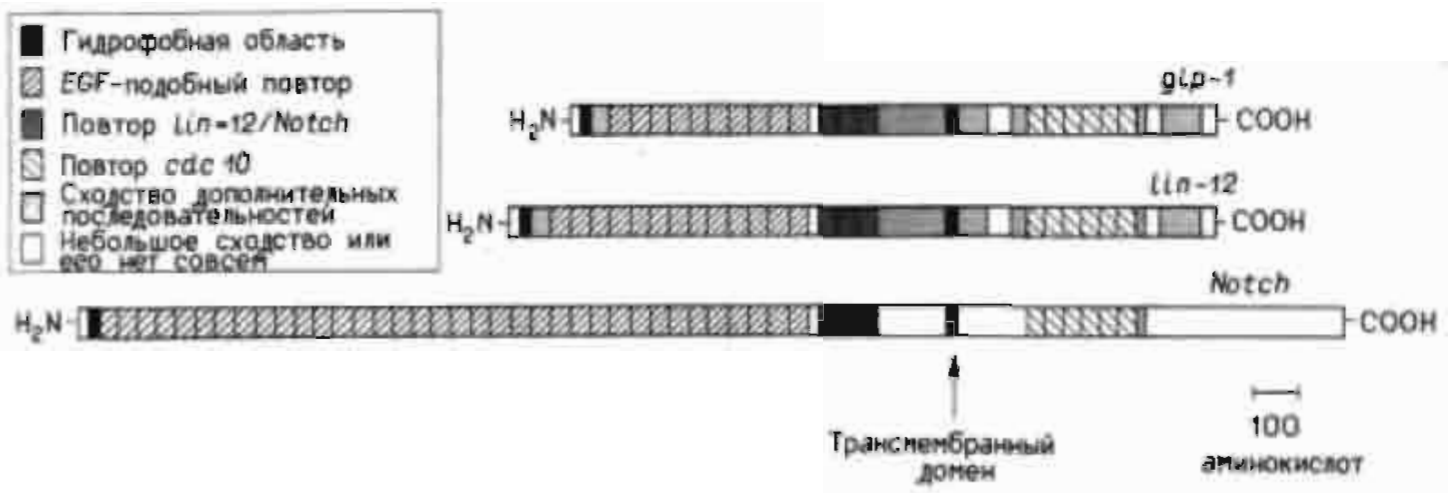


Рис. 16.32. Структурное сходство белков lin-12, glp-1 и Notch. Все три белка совмещены по трансмембранным последовательностям; внеклеточные домены расположены слева. Четвертый член этого семейства был обнаружен недавно (Coffman et al., 1990) путем гибридизации радиоактивного зонда гена *Notch* с библиотекой кДНК, полученной на мРНК нейрулы *Xenopus*. Этот ген *Xenopus* по своей структуре чрезвычайно схож с геном *Notch* дрозофилы, и также экспрессируется в эктодерме. (По Yochem, Greenwald, 1989.)

этот сигнал, будет функционировать ген *Vulvaless* дикого типа. На этом этапе, таким образом, сигнал якорной клетки детерминирует судьбу трех клеток-предшественников вульвы и трех других клеток, дающих гиподерму. На следующем этапе создаются различия между первичными и вторичными клетками-предшественниками вульвы. Это достигается тем, что первичная клетка-предшественник вульвы продуцирует сигнал, активирующий в соседней клетке ген *lin-12*. В случае активности последнего клетка становится вторичным предшественником вульвы. У нематод с нефункционирующим геном *lin-12* клетки-предшественники вульвы следуют либо по первому, либо по третьему пути, но у них не будет вторичных клеток-предшественников. Таким образом, комбинированное действие двух межклеточных индукций специфицирует три типа дифференцировки потенциальных клеток-предшественников вульвы.

Критическая роль в детерминации судьбы клеток принадлежит гену *lin-12*, который, очевидно, кодирует рецепторный белок. Последовательность гена *lin-12* указывает на семейство мембранных белков, чье функционирование связано с восприятием дифференцировочных сигналов от соседних клеток (Yochem, Greenwald, 1989; Austin, Kimble, 1989). Как показано на рис. 16.32, последовательность белка lin-12 очень сходна с последовательностью двух других – glp-1 и Notch. Белок glp-1 *C. elegans* (подробно этот вопрос обсуждается в гл. 22) необходим линии половых клеток для восприятия сигнала к продолжению митоза со стороны гонады. Белок Notch (см. гл. 11) необходим для дифференцировки эпидермальных клеток у *Drosophila*. При отсутствии этого белка эктодермальные клетки становятся нейробластами.

Все три белка начинаются с участка, несущего повторяющиеся последовательности, сходного с частью молекулы фактора роста эпидермиса, называемой «EGF-подобными повторами». Затем следуют три повторяющиеся элемента, специфичные для этих мембранных белков. За трансмембранным участком все три белка имеют область, очень сходную с дрожжевым белком cdc-10, участвующим в регуляции клеточных делений. Механизмы, с помощью которых эти белки получают соответствующие морфогенетические сигналы и передают их в ядро, тщательно изучаются. Сочетание генетических, молекулярных и эмбриологических подходов позволяет нам приблизиться к пониманию сути индукционных событий, регулирующих судьбу клеток; в настоящее время мы пытаемся выявить молекулы, участвующие в этих процессах.

Индукция конечности у куриного зародыша

Некоторые биологи развития утверждают, что все процессы развития можно наблюдать на примере формирования конечностей; и действительно, с тех пор как Р. Дж. Харрисон в начале столетия начал экспериментальный анализ развития конечностей, некоторые из наиболее важных концепций биологии развития оформились в результате исследования этих структур. Основные черты развития конечности являются общими для всех позвоночных. Закладка конечности начинается с высвобождения мезенхимных клеток из соматического листка мезодермы боковой пластинки (рис. 16.33). Клетки мигрируют в латеральном направлении и собираются под эпидермальной тканью нейрулы. Округлое выпячивание на поверхности зародыша называется **почкой конечности.**

Харрисон (Harrison, 1918) обнаружил, что эти *мезенхимные* клетки играют существенную роль в развитии конечности.

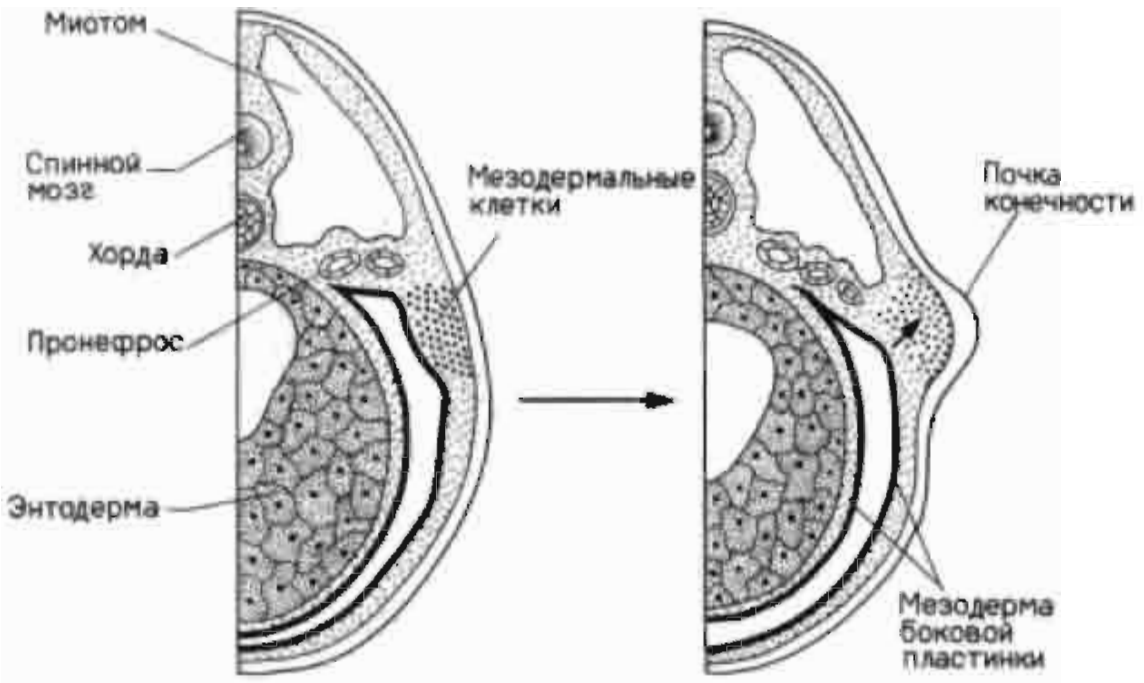


Рис. 16.33. Образование почки конечности. Миграция мезодермальных клеток из соматической области мезодермы боковой пластинки приводит к формированию почки конечности у зародыша амфибий. (По Balinsky, 1975.)

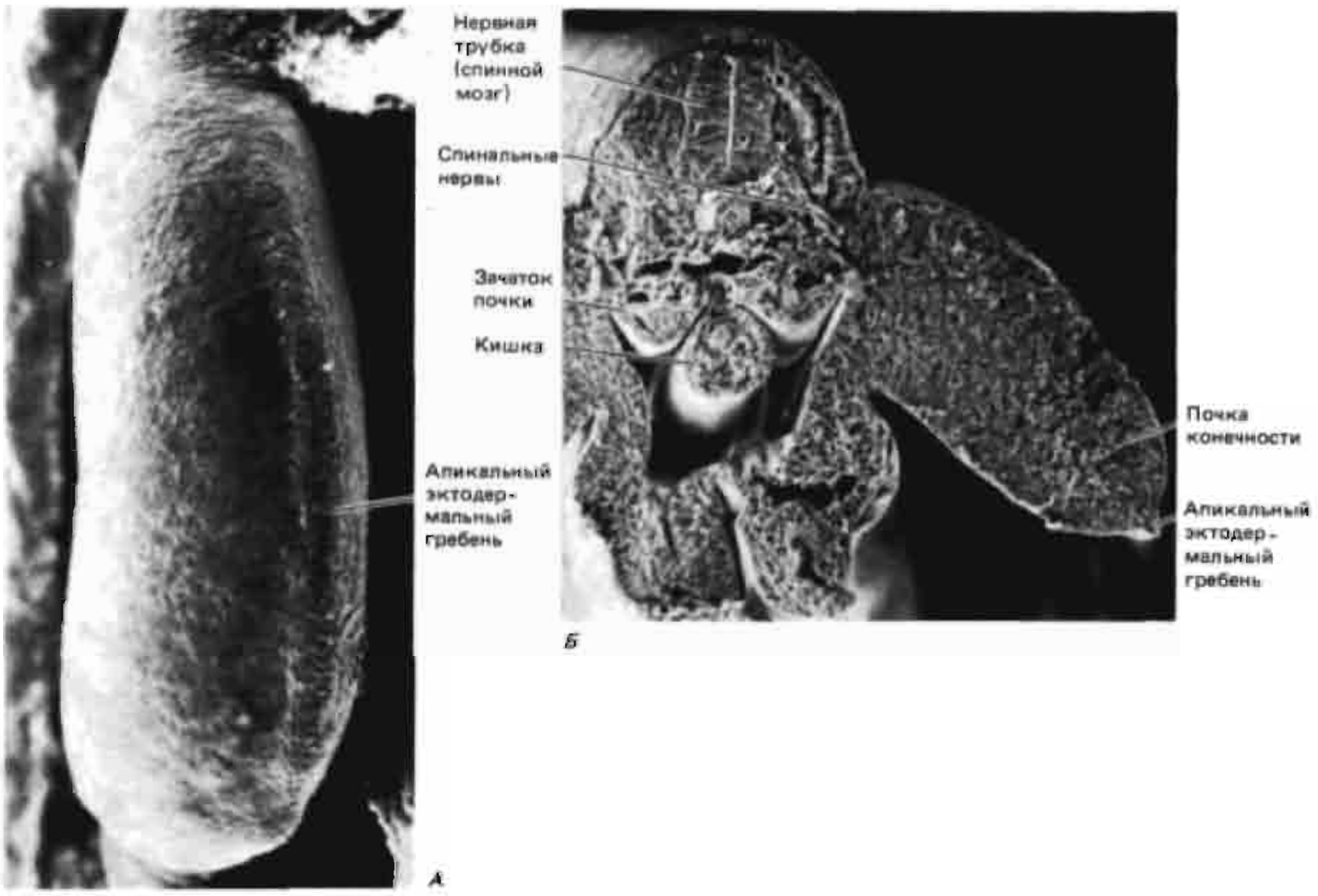


Рис. 16.34. Апикальный эктодермальный гребень. *А*. Полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа фотография почки крыла куриного зародыша с проходящим вдоль ее поверхности апикальным эктодермальным гребнем. *Б*. Разрез куриного зародыша на стадии 24–25 сомитов, проходящий через почку задней конечности; видно взаимоотношение почки конечности и АЭГ с развивающимся зародышем. Несмотря на то что клетки конечности еще не дифференцированы, можно различить спинальные нервы, врастающие в почку со стороны спинного мозга. (*А* – с любезного разрешения J. F. Fallon, B. K. Simandl; *Б* – из Tosney, Landmesser, 1985; с любезного разрешения K. W. Tosney.)

1. Если мезенхимные клетки удалить, то конечность не формируется.
2. Если мезенхиму конечности пересадить в новое место, то сформируется новая конечность.
3. Если скомбинировать мезенхиму задней конечности с эктодермой передней конечности, то сформируется задняя конечность.
4. Если эктодерму конечности пересадить в необычное для развития конечности место, то новой конечности на этом необычном месте не образуется.

Все это свидетельствует о том, что мезенхима конечности способна индуцировать формирование конечности. На примере птиц и млекопитающих можно наблюдать, как мезодерма индуцирует эктодермальные клетки к удлинению и образованию особой структуры – **апикального эктодермального гребня** (АЭГ) (рис. 16.34). Было также показано (Saunders et al., 1976), что АЭГ представляет собой самоподдерживающуюся популяцию клеток и по мере развития конечности не обменивается клетками со своим окружением. Клетки куриного зародыша и зародыша перепела легко различить по присутствию ядерного гетерохроматина (гл. 6), а если АЭГ перепела поместить на культю почки куриной конечности, то конечность будет продолжать расти. Однако АЭГ этой конечности по-прежнему будет состоять из перепелиных клеток, а окружающая эктодерма куриного зародыша не войдет в состав АЭГ. Коль скоро произошла индукция АЭГ, именно этот АЭГ и приобретает существенное значение для роста конечности и взаимодействует с мезенхимой (рис. 16.35):

1. Если АЭГ удалить на любой стадии развития конечности, то развитие конечности прекратится.
2. Если на почку конечности пересадить дополнительный АЭГ, то формируются сверхчисленные структуры, обычно в дистальной области.
3. Если мезодерму ноги поместить под АЭГ крыла, то от этой точки вперед разовьются структуры задней конечности.
4. Если мезодерму, при нормальном развитии не участвующую в образовании конечности, пересадить под АЭГ, то произойдет регрессия АЭГ и развитие конечности прекратится.

Таким образом, несмотря на то, что мезенхимные клетки индуцируют и поддерживают АЭГ, а также инструктируют АЭГ к формированию определенного типа конечности, АЭГ отвечает за поддержание роста и развития конечности (Zwilling,

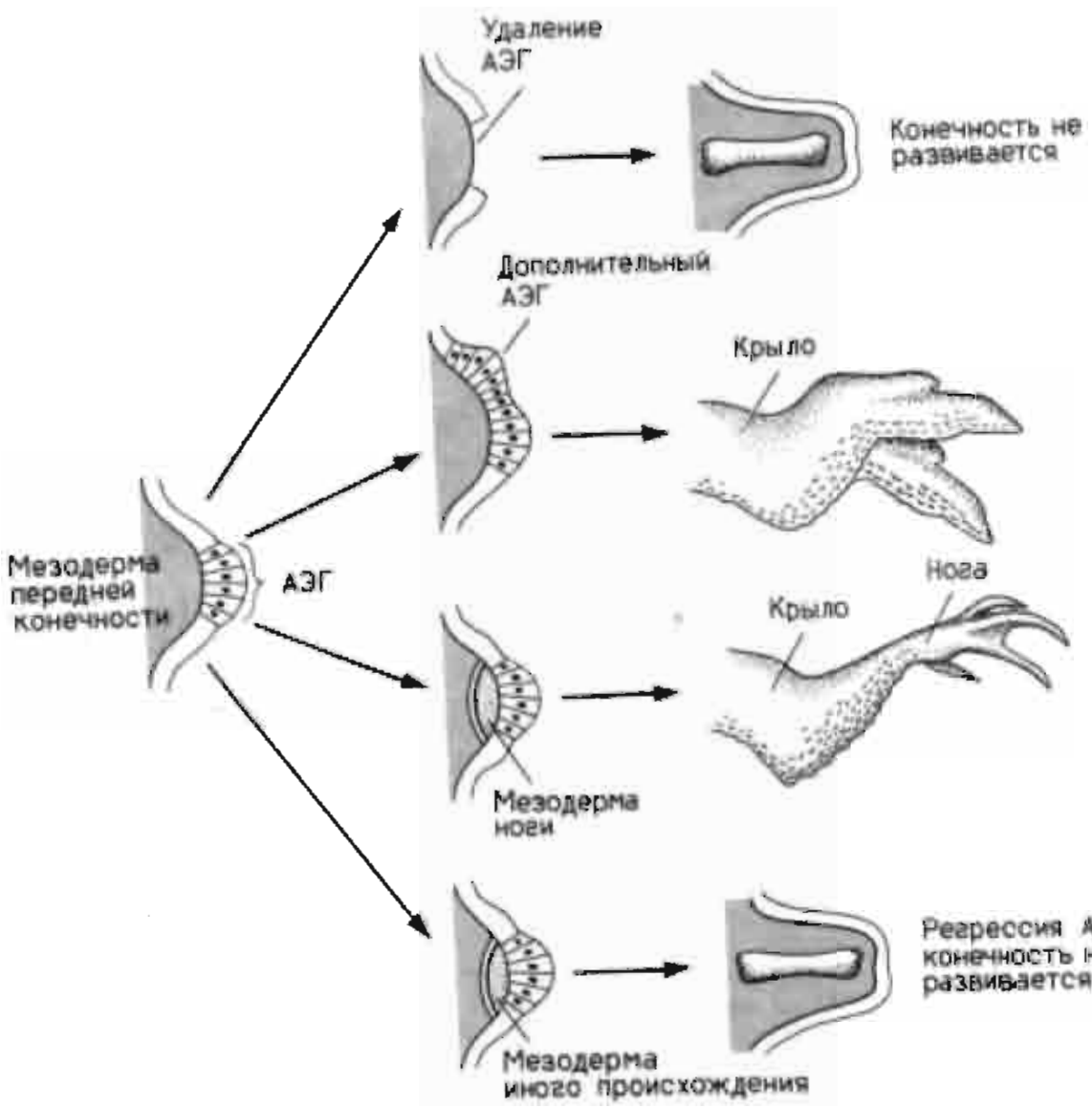


Рис. 16.35. Индуктивная роль апикального эктодермального гребня (АЭГ) по отношению к подлежащей мезенхиме. (По Wessells, 1977.)

Таблица 16.3. Мутации, влияющие на реципрокные взаимодействия между АЭГ и его подлежащей мезенхимой [1]

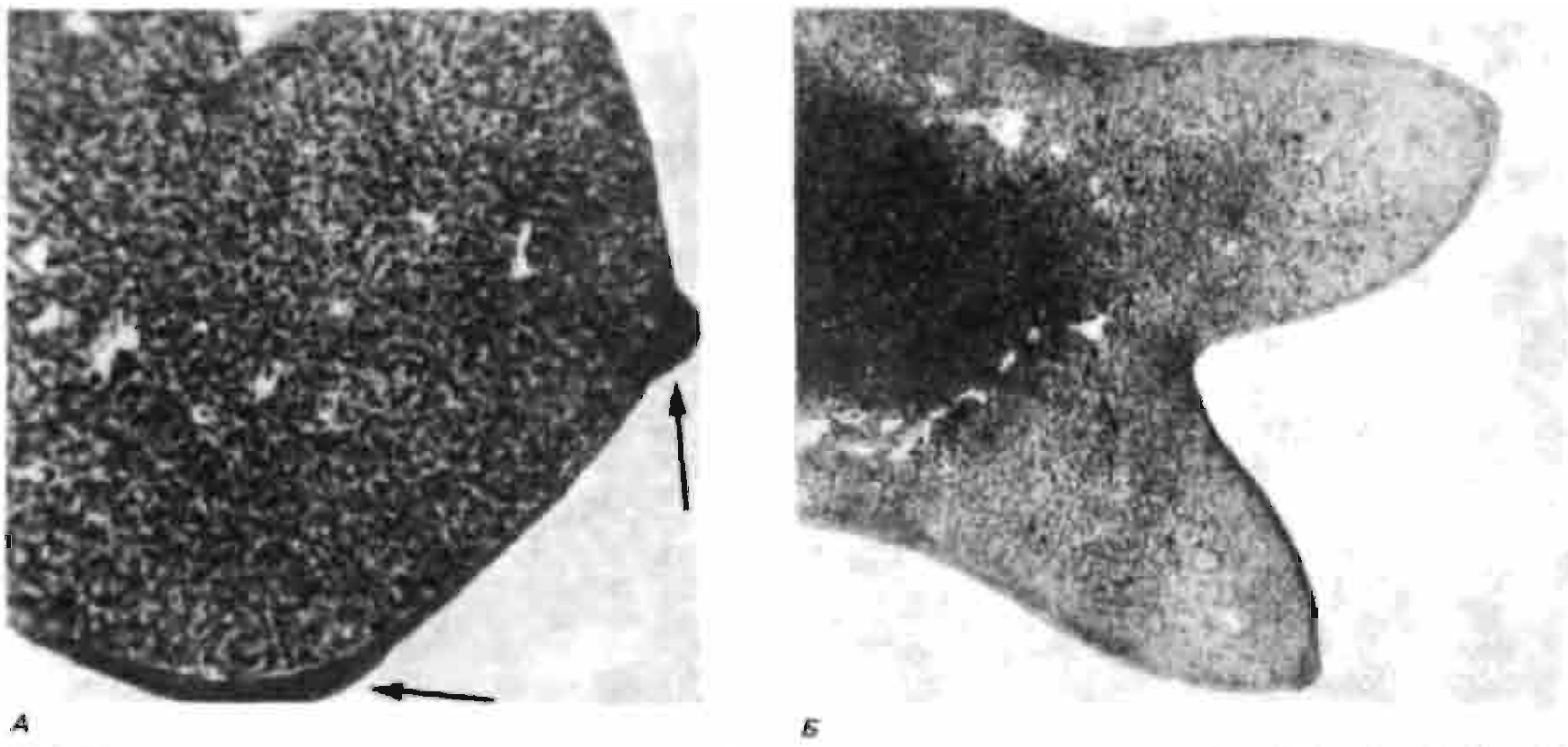
Мезодерма	Эпидермис	Результат	Заключение
POLYDACTYLOUS			
Polydactylous Дикого типа	Дикого типа Polydactylous	Polydactylous Дикий тип	Изменена мезодерма
EUDIPLOPODIA			
Eudiplopodia Дикого типа	Дикого типа Eudiplopodia	Дикий тип Eudiplopodia	Изменена эктодерма

[1] С помощью реципрокных трансплантаций между АЭГ и мезенхимой дикого типа и мутанта можно установить, какой из партнеров индукции является аберрантным.

1955; Saunders et al., 1957; Saunders, 1972). Кроме того, АЭГ ингибирует образование хряща мезенхимными клетками непосредственно под гребнем. Было показано, что эктодерма конечности вообще обладает свойством ингибировать хондрогенез в более старшей мезенхиме (Solursh, Reiter, 1988) и что если вырезать небольшую часть АЭГ из области, которая в норме будет располагаться между пальцами конечности цыпленка, то на этом месте появится дополнительный палец (Hurl et al., 1989).

Отношения между АЭГ и мезенхимой почки конечности наилучшим образом иллюстрируют две мутации, влияющие на развитие конечности у куриного зародыша – *polydactilous* и *eudiplopodia*. Мутация *polydactilous*, как свидетельствует само название, выражается в развитии сверхчисленных пальцев на каждой из конечностей. Путем совмещения мутантной ткани с тканью дикого типа (табл. 16.3) удалось проследить причину возникновения дефекта до мезодермальных клеток, которые индуцируют слишком широкий АЭГ. В случае мутации *eudiplopodia* (от греческого слова, означающего «две хорошие ноги») закладываются не только дополнительные пальцы в области крыла, но формируются также два полных ряда пальцев на каждой из задних конечностей (рис. 16.36). Аналогичные эксперименты с реконституциями (табл. 16.3) свидетельствуют о том, что причина дефекта кроется в эктодермальной ткани.

Очевидно, что вторичная индукция, по природе своей часто реципрокная (как это видно на примере развития почки и конечности), играет существенную роль в формировании органа. Однако одной лишь вторичной индукции недостаточно для развития



А Б

Рис. 16.36. Поперечные срезы почек задних конечностей куриного зародыша с мутацией *eudiplopodia*. *А*. Два АЭГ (указаны стрелками) на почке задней конечности; дополнительный вырост на дорсальной стороне даст дополнительный набор пальцев. *Б*. Поверхность обоих выростов покрыта АЭГ. (Из Goetinck, 1964; фотографии с любезного разрешения P. Goetinck.)

полного органа. Должен существовать какой-то механизм, следящий за тем, чтобы кисть не развилась слишком далеко от тела или чтобы не сформировалось два больших пальца. Должен также существовать некий механизм, следящий за тем, чтобы ноги и руки развивались в соответствующей области тела и не развивались в других местах. Сходным образом должен иметься механизм, с помощью которого нервы, идущие от сетчатки, передадут эту информацию в определенную область мозга, хотя сетчатка и может получать изображения от чрезвычайно точно скоординированного глаза. Следующая глава будет посвящена дальнейшему изучению формирования органов, причем основное внимание будет уделено становлению пространственной организации зародыша.

ЛИТЕРАТУРА

Ash J. F., Singer S. J. (1976). Concanavalin A-induced transmembrane linkage of concanavalin A subface receptor to intracellular myosin-containing filaments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **71**, 4575–4579.

Balinsky B. I. (1975). Introduction to Embryology, 4th Ed., Saunders, Philadelphia.

Banerjee S., Bernfield M. (1979). Developmentally regulated neutral hyaluronidase activity during epithelial mesenchymal interaction, J. Cell Biol., **83**, 469a.

Bernfield M., Banerjee S. D. (1982). The turnover of basal lamina glycosaminoglycan correlates with epithelial morphogenesis, Dev. Biol., **90**, 291–305.

Bishop-Calame S. (1966). Etude experimentale de l'organogenese du système urogénital de l'embryon de poulet, Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp., **55**, 215–309.

Brown K. M., Muchmore A. V., Rosenstreich D. L. (1986). Uromodulin, an immunosuppressive protein derived from pregnancy urine, is an inhibitor of interleukin 1, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 9119–9123.

Cahn P. H. (1959). Comparative optic development in *Astyanax mexicanus* and in two of its blind cave derivatives, Bull. Am. Mus. Natl. Hist., **115**, 72–112.

Chow I., Poo M.-M. (1982). Redistribution of cell surface receptor induced by cell–cell contact, J. Cell Biol., **95**, 510–518.

Chuong C.-M., Edelman G. M. (1985). Expression of cell adhesion molecules in embryonic induction. I. Morphogenesis of nestling feathers, J. Cell Biol., **101**, 1009–1026.

Cole R. K. (1967). Ametapodia, a dominant mutation in the fowl, J. Hered., **58**, 141–146.

Coulombre J. L., Coulombre A. J. (1971). Metaplastic induction of scales and feathers in the corneal anterior epithelium of the chick embryo, Dev. Biol., **25**, 464–478.

Cutler L. S., Chaudhry A. P. (1973). Intercellular contacts at the epithelial-mesenhymal interface during prenatal development of the rat submandibular gland, Dev. Biol., **33**, 229–240.

Czihak G. (1971). Echinoids. In: G. Reverberi (ed.), Experimental Embryology of Marine and Freshwater Invertebrate, Elsevier North-Holland, Amsterdam, pp. 383–506.

Dalgleish A. G., Beverley P. C. L., Clapham P. R., Crawford D. H., Greaves M. F., Weiss R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus, Nature, **312**, 763–767.

Daya S., Rosenthal K. L., Clark D. A. (1987). Immunosuppressor factor(s) produced by decidua-associated suppressor cells: A proposed mechanism for fetal allograft survival, Am. J. Obstet. Gynecol., **156**, 344–350.

Deuchar E. M. (1975). Cellular Interactions in Animal Development, Chapman and Hall, London.

Dintzis H. M., Dintzis R. Z., Vogelstein B. (1976). Molecular determinants of immunogenicity: The immunon model of immune response, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 3671–3675.

Dintzis R. Z., Vogelstein B., Dintzis H. M. (1982). Specific cellular stimulation in the primary immune response: Experimental test of a quantized model, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 884–888.

Edelman G. M., Spear P. G., Rutishauser U., Yahara I. (1974). Receptor specificity and mitogenesis in lymphocyte populations. In: A. A. Moscona (ed.), The Cell Surface in Development, Wiley, New York, pp. 141–164.

Ekblom P., Thesleff I., Saxén L., Miettinen A., Timpl R. (1983). Transferrin as a fetal growth factor: Acquisition of responsiveness related to embryonic induction, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 2651–2655.

Flanagan J., Koch G. C. E. (1978). Cross-linked surface Ig attaches to actin, Nature, **273**, 278–281.

Gemmill J. F. (1912). The development of the starfish *Solaster endica* (Forbes), Trans. Zool. Soc. Lond., **20**, 1–72.

Gluecksohn-Schoenheimer S. (1943). The morphological manifestations of a dominant mutation in mice affecting tail and urogenital system, Genetics, **28**, 341–348.

Goetinck P. F. (1964). Studies on limb morphogenesis. II. Experiments with the polydactylous mutant *eudiplopodia*, Dev. Biol., **10**, 71–91.

Goetinck P. F., Sekellick M. J. (1972). Observations on collagen synthesis, lattice formation, and the morphology of scaleless and normal embryonic skin, Dev. Biol., **28**, 636–648.

Goldschmidt R. (1933). Some aspects of evolution, Science, **78**, 539–547.

Grobstein C. (1955). Induction interaction in the development of the mouse metanephros, J. Exp. Zool., **130**, 319–340.

Grobstein C. (1956). Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme, Exp. Cell Res., **10**, 424–440.

Grobstein C., Cohen J. (1965). Collagenase: Effect on the morphogenesis of embryonic salivary epithelium in vitro, Science, **150**, 626–628.

Guillet J.-C. and 7 others. (1987). Immunological self, nonself discrimination, Science, **235**, 865–870.

Hamaoko T., Ono S. (1986). Regulation of B-cell differentiation, Annu. Rev. Immunol., **4**, 167–204.

Hamburgh M. (1970). Theories of Differentiation, Elsevier, New York.

Harrison R. G. (1918). Experiments on the development of the forelimb of *Amblystoma*, a self-differentiating equipotential system, J. Exp. Zool., **25**, 413–461.

Harrison R. G. (1920). Experiments on the lens in *Amblystoma*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **17**, 199–200.

Harrison R. G. (1933). Some difficulties of the determination problem, Am. Nat., **67**, 306–321.

Hay E. D., Dodson J. W. (1973). Secretion of collagen by corneal epithelium. I. Morphology of the collagenous products produced by isolated epithelia grown on frozen-killed lens, J. Cell Biol., **57**, 190–213.

Hay E. D., Revel J.-P. (1969). Fine structure of the developing avian cornea. In: A. Wolsky and P. S. Chen (eds.), Monographs in Developmental Biology, Karger, Basel.

Henry J. J., Grainger R. M. (in press). Inductive interactions in the spatial and temporal restriction of lens forming potential in embryonic ectoderm of *Xenopus laevis*, Dev. Biol.

Holtzer H. (1968). Induction of chondrogenesis: A concept in terms of mechanisms. In: R. Gleischmajer and R. E. Billingham (eds.), Epithelial-Mesenchymal Interactions, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 152–164.

Houghton A., Real F. X., Davis L. J., Cordon-Cardo C., Old L. J. (1987). Phenotypic heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanocyte cells, J. Exp. Med., **164**, 812–829.

Howard M., Paul W. E. (1983). Regulation of B-cell growth and differentiation by soluble factors, Annu. Rev. Immunol., **1**, 307–333.

Inabar K., Witmer M. D., Steinman R. M. (1984). Clustering of dendritic cells, Helper T lymphocytes, and histocompatible B cell during primary antibody responses in vitro, J. Exp. Med., **160**, 858–876.

Ishizaka T., Hirata F., Ishizaka K., Axelrod J. (1980). Stimulation of phospholipid methylation, Ca^{++} influx, and histamine release by binding of IgE receptors on rat mast cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 1903–1906.

Jacob F. (1977). Evolution and tinkering, Science, **196**, 1161–1166.

Jacobson A. G. (1966). Inductive processes in embryonic development, Science, **152**, 25–34.

Janeway C. A., Ron J., Katz M. E. (1987). The B-cell is the initiating antigen-presenting cell in peripheral lymph nodes, J. Immunol., **138**, 1051–1055.

Killar L., MacDonald G., West J., Woods A., Bottomly K. (1987). Cloned, Ia-restricted T cells that do not produce IL4 (BSF-1) fail to help antigen-specific B cells, J. Immunol., **138**, 1674–1679.

King M.-C., Wilson A. C. (1975). Evolution at two levels in humans and chimpanzees, Science, **188**, 107–116.

Klatmann D., and 10 others. (1984). Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes, Science, **225**, 59–63.

Kollar E. J., Fisher C. (1980). Tooth induction in chick epithelium: Expression of quiescent genes for enamel synthesis, Science, **207**, 993–995.

Lanzavecchia A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells, Nature, **314**, 537–539.

Lee T., and 11 others. (1986). Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activity and T-cell- and mast cell-stimulating activities, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 2061–2065.

Lehtonen E. (1975). Epithelio-mesenchymal interface during mouse kidney tubule induction in vivo, J. Embryol. Exp. Morphol., **34**, 695–705.

Lehtonen E., Wartiovaara J., Nordling S., Saxén D. (1975). Demonstration of cytoplasmic processes in Millipore filters permitting kidney tubule induction, J. Embryol. Exp. Morphol., **33**, 187–203.

Levine S., Pictet R., Rutter W. J. (1973). Control of cell proliferation and cytodifferentiation by a factor reacting with the cell surface, Nature New Biol., **246**, 49–52.

Liedke K. B. (1951). Lens competence in *Amblystoma punctatum*, J. Exp. Zool., **117**, 573–591.

Liedke K. B. (1955). Studies on lens induction in *Amblystoma punctatum*, J. Exp. Zool., **130**, 353–379.

Mauger A., Demarchez M., Herbage D., Grimaud J. A., Druguet M., Hartmann D., Sengel P. (1982). Immunofluorescent localization of collagen types II and III, and of fibronectin during feather morphogenesis in the chick embryo, Dev. Biol., **94**, 93–105.

Mauger A., Demarchez M., Herbage D., Grimaud J. A., Druguet M., Hartmann D. J., Foidart J. M., Sengel P. (1983). Immunofluorescent localization of collagen types I, III and IV, fibronectin, and laminin during morphogenesis of scales and scaleless skin in the chick embryo, Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol., **192**, 205–215.

McKeehan M. S. (1951). Cytological aspects of embryonic lens induction in the chick, J., Exp. Zool., **117**, 31–64.

Meier S., Hay E. D. (1974). Control of corneal differentiation by extracellular materials. Collagen as a promoter and stabilizer of epithelial stroma production, Dev. Biol., **38**, 249–270.

Meier S., Hay E. D. (1975). Stimulation of corneal differentiation by interaction between the cell surface and extracellular matrix. I. Morphometric analysis of transfilter induction, J. Cell Biol., **66**, 275–291.

Melchers F., Andersson J. (1986). Factors controlling the B cell cycle, Annu. Rev. Immunol., **4**, 13–36.

Mosier D. E. (1967). A requirement for two cell types for antibody formation in vitro, Science, **158**, 1573–1575.

Muthukkaruppan V. R. (1965). Inductive tissue interaction in the development of the mouse lens in vitro, J. Exp. Zool., **159**, 269–288.

Nakanishi Y., Morita T., Nogawa H. (1987). Cell proliferation is not required for the initiation of early cleft formation in mouse embryonic submandibular epithelium in vitro, Development, **99**, 429–437.

Nakanishi Y., Sugiura F., Kishi J.-I., Hayakawa T. (1986a). Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland, Dev. Biol., **113**, 201–206.

Nakanishi Y., Sugiura F., Kishi J.-I., Hayakawa T. (1986b). Scanning electron microscopic observations of mouse embryonic submanibular glands during initial branching: Preferential localization of fibrillar structures at the mesenchymal ridges participating in cleft formation, J. Embryol. Exp. Morphol., **96**, 65–77.

O'Garra A., Warren D. J., Holman M., Popham A. M., Sanderson C. J., Klaus G. G. B. (1986). Interleukin 4 (B cell growth factor II/eosinophil differentiation factor) is a mitogen and differentiation factor for preactivated B lymphocytes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 5228–5232.

Ohno S. (1970). Evolution by Gene Duplication, Springer-Verlag, New York.

Oldstone M. B. A. (1982). Immunopathology of persistent viral infection, Hospital Practice, **17**(12), 61–72.

Pierce B. G. (1985). Carcinoma is to embryology as mutation is to genetics, Am. Zool., **25**, 707–712.

Roux W. (1894). The problems, methods, and scope of developmental mechanics, Lectures of the Marine Biological Laboratory, Ginn and Co., Boston, pp. 149–190.

Rutter W. J., Pictel R. L., Harding J. D., Chirgwin J. M., MacDonald R. J., Przybyla A. E. (1978). An analysis of pancreatic development: Role of mesenchymal factor and other extracellular factors. In: J. Papaconstantinou and W. J. Rutter (eds.), Molecular Control of Proliferation and Differentiation, Academic, New York, pp. 205–277.

Rutter W. J., Wessells N. K., Grobstein C. (1964). Controls of specific synthesis in the developing pancreas, Natl. Cancer Inst. Monogr., **13**, 51–65.

Saunders J. W., Jr. (1972). Developmental control of three-dimensional polarity in the avian limb, Ann. N. Y. Acad. Sci., **193**, 29–42.

Saunders J. W., Jr. (1980). Developmental Biology, Macmillan, New York.

Saunders J. W., Jr., Cairns J. M., Gasseling M. T. (1957). The role of the apical ridge of ectoderm in the differentiation of the morphological structure and inductive specificity of limb parts of the chick, J. Morphol., **101**, 57–88.

Saunders J. W., Jr., Gasseling M. T., Errick J. E. (1976). Inductive activity and enduring cellular constitution of a supernumerary apical ectodermal ridge graften to the limb bud of the chick embryo, Dev. Biol., **50**, 16–25.

Saxén L., Lehtonen E., Karkinen-Jääskelainen M., Nordling S., Wartiovaara J. (1976). Are morphogenetic tissue interactions mediated by transmissible signal substances or through cell contacts? Nature, **259**, 662–663.

Schlapp K. W. (1892). Das Auge des Grottenolmes (*Proteus anguineus*), Z. Wiss. Zool., **53**, 537–557.

Slavkin H. C., Bringas P., Jr. (1976). Epithelial-mesenchymal interactions during odontogenesis. IV. Morphological evi-

dence for direct heterotypic cell–cell contacts, Dev. Biol., 428–442.
Snow E.C., Noelle R.J., Uhr J.W., Vitetta E.S. (1983). Activation of antigen-enriched B cells. II. Role of linked recognition in B cell proliferation to thymus-dependent antigens, J. Immunol., **130**, 614–618.
Spemann H. (1938). Embryonic Development and Induction, Yale University Press, New Haven.
Spemann H., Schotté O. (1932). Über xenoplatische Transplantation als Mittel zur Analyse der embryonalen Induction, Naturwissenschaften, **20**, 463–467.
Spooner B.S., Cohen H.I., Faubion J. (1977). Development of the embryonic mammalian pancreas: The relationship between morphogenesis and cytodifferentiation, Dev. Biol., **61**, 119–130.
Springer T.A. (1987). The LFA-1, Mac-1 glycoprotein family and its deficiency in an inherited disease, Fed. Proc., **44**, 2660–2663.
Springer T.A., Thompson W.S., Miller L.J., Schmalsteig F.C., Anderson D.C. (1984). Inherited deficiency of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family and its molecular basis, J. Exp. Med., **160**, 1901–1918.
Stuart E.S., Garber B., Moscona A. (1972). An analysis of feather germ formation in normal development and in skin treated with hydrocortisone, J. Exp. Zool., **179**, 97–110.
Sugrue S.P., Hay E.D. (1982). Interaction of embryonic corneal epithelium with exogenous collagen, laminin, and fibronectin: Role of endogenous protein synthesis, Dev. Biol., **92**, 97–106.
Thesleff I., Partanen A.M., Landschulz W., Towbridge I.S., Ekblom P. (1985).The role of transferrin receptors and iron delivery in mouse embryonic morphogenesis, Differentiation, **30**, 152–158.
Toivonen S. (1979). Transmission problem in primary induction, Differentiation, **15**, 177–181.
Tomasek J.J., Hay E.D., Fujiwara K. (1982). Collagen modulates cell shape and cytoskeleton of embryonic corneal and fibroma fibroblasts: Distribution of actin, α-actin, and myosin, Dev. Biol., **92**, 107–122.
Tosney K.W., Landmesser L.T. (1985). Development of the major pathways for neurite outgrowth in the chick hindlimb, Dev. Biol., **109**, 193–214.
Ubaghs G. (1967). General characteristics of Echinodermata. In: R.C. Moore (ed.), Treatise on Invertebrate Paleontology, Part S, Echinodermata 1, Vol. 1, University of Kansas Press, Lawrence, pp. 3–60.
Unanue E.R., Askonas B.A. (1968). The immune response of mice to antigen in macrophages, Immunology, **15**, 287–296.
Wessells N.K. (1970). Mammalian lung development: Interactions in formulation and morphogenesis of tracheal buds, J. Exp. Zool., **175**, 455–466.
Wessells N.K. (1977). Tissue Interaction and Development, W.A. Benjamin, Menlo Park, CA.
Wessells N.K., Cohen J.H. (1968). Effects of collagenase on developing epithelia in vitro: Lung, ureteric bud, and pancreas, Dev. Biol., **18**, 294–309.
Wessells N.K., Evans J. (1968). The ultrastructure of oriented cells and extracellular materials between developing feathers, Dev. Biol., **18**, 42–61.
Yaffe L.J., Finkelman F.D. (1983). Induction of a B lymphocyte receptor for a T-cell-replacing factor by the crosslinking of surface IgD. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 293–297.
Zwilling E. (1955). Ectoderm-mesoderm relationship in the development of the chick embryo limb bud, J. Exp. Zool., **128**, 423–441.

Дополнительная литература к 3-му изданию

Austin J., Kimble J. (1989). Transcript analysis of *glp-1* and *lin-12*, homologous genes required for cell interactions during development of *C. elegans*, Cell, **58**, 565–571.
Banerjee U., Renfranz P.J., Pollock J.A., Benzer S. (1987). Molecular characterization and expression of *sevenless*, a gene involved in neuronal pattern formation in the *Drosophila* eye, Cell, **49**, 281–291.
Basler K., Hafen E. (1989). Ubiquitous expression of *sevenless*: Position-dependent specification of cell fate, Science, **243**, 931–934.
Bowtell D.D.L., Simon M.A., Rubin G.M. (1989). Ommatidia in the developing *Drosophila* eye require and can respond to *sevenless* for only a restricted period, Cell, **56**, 931–936.
Charlebois T.S., Spencer D.H., Tarkington S.K., Henry J.J., Grainger R.M. (1990). Isolation of a chick cytokeratin cDNA clone which detects regional specialization in early embryonic ectoderm, Development, **108**, 33–45.
Coffman C., Harris W., Kintner C. (1990). *Xotch*, the *Xenopus* homolog of *Drosophila Notch*, Science, **249**, 1438–1441.
Ferguson E.C., Sternberg P.W., Horvitz R. (1987). A genetic pathway for the specification of vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*, Nature, **326**, 259–267.
Greenwald I., Sternberg P.W., Horvitz H.R. (1983). The *lin-12* locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*, Cell, **34**, 435–444.
Grunwald G.B., Gilbert S.F., Brewer K., Cleland L., Kawai M. (1990). Immunocytochemical analysis of embryonic compartmentation with a monoclonal antibody against a cytokeratin-related antigen, Histochemistry, **94**, 545–553.
Hafen E., Basler K., Edstrom J.E., Rubin G.M. (1987). *Sevenless*, a cell specific homeotic gene of *Drosophila*, encodes a putative transmembrane receptor with a tyrosine kinase domain, Science, **236**, 55–63.
Henry J.J., Grainger R.M. (1987). Inductive interactions in the spatial and temporal restriction of lens-forming potential in embryonic ectoderm, Dev. Biol., **124**, 200–214.
Henry J.J., Grainger R.M. (1990). Early tissue interactions leading to embryonic lens formation in *Xenopus laevis*, Dev. Biol., **141**, 149–163.
Hurle J.M., Gañan Y., Macias D. (1989). Experimental analysis of the in vivo chondrogenic potential of the interdigital mesenchyme of the chick limb bud subjected to local ectodermal removal, Dev. Biol., **132**, 368–374.
Jacobson A.G., Sater A.K. (1988). Features of embryonic induction, Development, **104**, 341–359.
Kimble J. (1981). Alterations in cell lineage following laser ablation of cells in the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*, Dev. Biol., **87** 286–300.
Lelongt B., Makino H., Dalecki T.M., Kanwar Y.S. (1988). Role of proteoglycans in renal development, Dev. Biol., **128**, 256–276.
Meier S. (1977). Initiation of corneal differentiation prior to cornea–lens association, Cell Tiss. Res., **184**, 255–267.
Pritchard-Jones K. and 11 others (1990). The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary development, Nature, **346**, 194–197.
Reinke R., Zipursky A.L. (1988). Cell-cell interaction in the *Drosophila* retina: The *bride of sevenless* gene is required in protoreceptor cell R8 for R7 cell development, Cell, **55**, 321–330.
Repraeger A., Bernfield M. (1985). Cell surface proteoglycan of mouse mammary epithelial cells: Protease releases a heparin sulfate-rich ectodomain from a putative membrane-anchored domain, J. Biol. Chem., **260**, 4103–4109.
Rubin G.M. (1989). Development of the *Drosophila* retina: inductive events studied at single cell resolution, Cell, **57**, 519–520.
Saha M.S., Spann C.L., Grainger R.M. (1989). Embryonic lens

induction: More than meets the optic vesicle, Cell Differ. Dev, **28**, 153–172.
Servetnick M., Grainger R.M. (1990). Changes in competence occur autonomously in *Xenopus* ectoderm. (Abstract) Forty-Ninth Annual Symposium of the Society for Development Biology, Alan R. Liss, New York, p. 4.
Seydoux G., Greenwald I. (1989). Cell autonomy of *lin-12* function in a cell fate decision in *C. elegans*, Cell, **57**, 1237–1245.
Solursh M., Reiter R.S. (1988). Inhibitory and stimulatory effects of limb ectoderm on in vitro chondrogenesis, J. Exp. Zool., **248**, 147–154.
Sternberg P.W. (1988). Lateral inhibition during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*, Nature, **335**, 551–554.
Sternberg P.W., Horvitz H.R. (1989). The combined action of two intercellular signalling pathways specifies three cell fates during vulval induction in *C. elegans*, Cell, **58**, 679–693.
Tomlinson A. (1988). Cellular interactions in the developing *Drosophila* eye, Development, **104**, 183–193.
Tomlinson A. Ready D.F. (1987). Cell fate in the *Drosophila* ommatidium, Dev. Biol., **123**, 264–275.
Tosney K.W., Landmesser L.T. (1985). Development of the major pathways for neurite outgrowth in the chick hindlimb, Dev. Biol., **109**, 193–214.
Vainio S., Lehtonen E., Jalkanen M., Bernfild M., Saxén L. (1989a). Epithelial–mesenchymal interactions regulate the stage-specific expression of a cell surface proteoglycan, syndecan, in the developing kidney, Dev. Biol., **134**, 382–391.
Vainio S., Jalkanen M., Thesleff I. (1989b). Syndecan and tenascin expression is induced by epithelial–mesenchymal interactions in embryonic tooth mesenchyme, J. Cell Biol., **108**, 1945–1954.
van Heyningen V. and 11 others. (1990). Role for Wilms tumor gene in genital development? Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 5383–5386.
von Woellwarth V. (1961). Die Rolle des neuralleistenmaterials und der Temperatur bei der Determination der Augenlinse, Embriologia, **6**, 219–242.
Yochem J., Greenwald I. (1989). *glp-1* and *lin-12* genes implicated in distinct cell–cell interactions in *C. elegans*, encode similar transmembrane proteins, Cell, **58**, 553–563.

Глава 17

Формирование пространственной организации

Итак, за всеми вопросами количества стоят вопросы формирования пространственной организации, которые имеют существенное значение для понимания Природы.

АЛФРЕД НОРТ УАЙТХЕД (1934)

Биохимии и морфологии в ближайшем будущем предстоит взаимопроникновение без каких-либо различий или преимуществ. Форма больше не отдается на откуп морфологу, а молекулярная точность больше не служит заповедной территорией химика.

ДЖОЗЕФ НИДХЭМ (1967)

Теория без фактов – фантазия, но факты без теории – хаос.

К. УИТМЕН (1894)

Введение

Формирование пространственной организации – это результат функциональной активности эмбриональных клеток, посредством которой осуществляется упорядоченное расположение дифференцированных тканей. Способность к такой организации представляется одним из наиболее эффективных свойств развивающегося организма, которое вызывает чувство благоговения как у ученых, так и у непрофессионалов. Каким образом в зародыше не только возникают различные типы клеток, но и создаются функциональные ткани и органы? Одно дело – дифференцировка хондроцитов или остеоцитов, синтезирующих соответственно хрящевой и костный матриксы, другое дело – образовывать эти клетки в такой пространственно-временной ориентации, которая приводит к созданию функциональной кости. При этом должна выполняться еще одна задача, а именно создаваться определенная кость, например плечевая, тазовая или бедренная. Способность клеток узнавать свое положение в пределах ограниченной популяции клеток и дифференцироваться в соответствии с получаемой ими позиционной информацией стала объектом интенсивного изучения.

Формирование пространственной организации включает реализацию выбора одного из возможных путей развития. Каким образом происходит так, что клетка, потенциально способная стать хрящевой или мышечной, становится мышечной, если располагается в одном месте, и хрящевой, если оказывается в другом? Каким образом аксон проинформирован о том, что ему следует расти от спинного мозга к кончику указательного пальца, а не к пальцу ноги или к зубу?

Градиентная модель позиционной информации

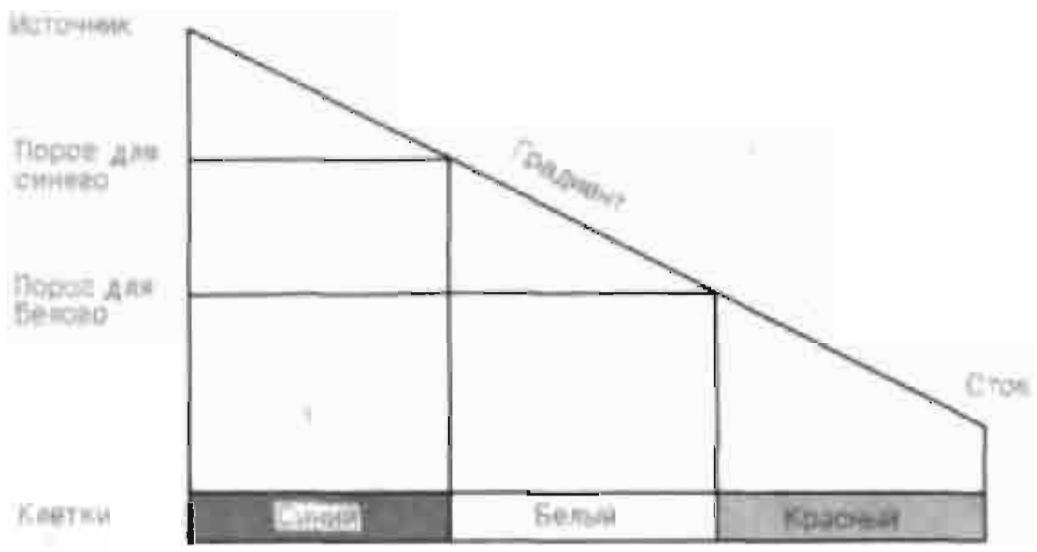
Каким образом клетки получают информацию относительно своего положения в зародыше и как они используют эту информацию для дифференцировки в соответствующий клеточный тип? Чтобы объяснить это, были предложены две основные гипотезы, хотя этими двумя гипотезами соответствующие теоретические построения не ограничиваются. В основе одной гипотезы лежит представление о **градиентах** морфогенетических веществ (Boveri, 1901; Child, 1941; Wolpert, 1971). Предполагается, что растворимое вещество (**морфоген**) диффундирует от «источника» (где оно продуцируется) к «стоку» (где оно разрушается), образуя в области диффузии постепенный спад концентрации. (Таким образом, морфогены представляют собой аналоги хемотактических веществ, обсуждаемых в гл. 15, которые также действуют путем установления градиента концентрации от источника. Подобно хемотактическим веществам, морфогены должны легко диф-

фундировать и разрушаться или инактивироваться.) Согласно теоретическим расчетам (Crick, 1970), такие градиенты могут проявлять свое действие на относительно небольших расстояниях (менее 100 клеточных диаметров). Мы уже встречались с градиентными моделями при попытке объяснить формирование пространственной организации зародыша морского ежа (гл. 8).

Модель французского флага

Волперт (Wolpert, 1978) иллюстрировал возможное действие отдельного градиента, представив плоскую ткань в виде французского флага (рис. 17.1). Предположим, что источник морфогена располагается на левой границе синей полосы, а на другом конце флага – на правой границе красной полосы – находится место выведения морфогена. Таким образом, перед нами – градиент концентрации, причем на одном конце флага/ткани концентрация самая высокая, а на другом – самая низкая. Все клетки полипотентны, т. е. каждая может стать либо синей, либо белой, либо красной, и эта спецификация коррелирована с концентрацией морфогена. Клетки, получившие наибольшее количество морфогена, становятся синими. Однако существует порог концентрации морфогена, ниже которого клетки становятся белыми. При падении концентрации ниже следующего порога клетки становятся красными.

Экстраполяция «модели французского флага»



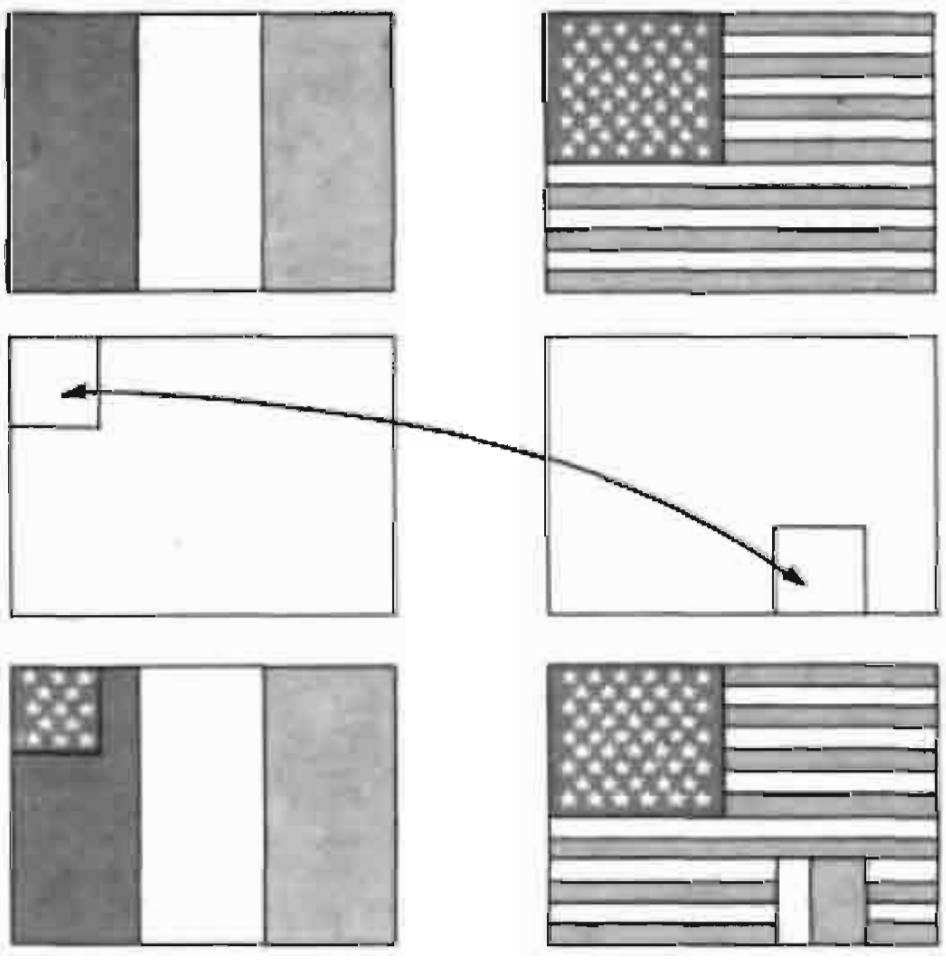


Рис. 17.1. Объяснение действия градиента позиционной информации на модели французского флага. *А*. В соответствии с моделью Волперта позиционная информация передается посредством снижения концентрации растворимого морфогена по мере удаления от источника к стоку, т. е. области бесконечного разведения. Пороги, обозначенные слева, означают свойства клеток, позволяющие им интерпретировать градиент; например, при одном пороге морфогена клетка становится синей, при другом – белой и при третьем – красной. В результате формируется трехцветная структура (как на французском флаге). *Б*. Важная особенность модели состоит в том, что кусочек ткани, трансплантированный из одной области в другую, сохраняет свою идентичность, но дифференцируется в соответствии с новыми позиционными инструкциями. Эту особенность схематически иллюстрируют «пересадки» участка флага одной страны на флаг другой. (По Wolpert, 1978.)

представлена на рис. 17.1, *Б*. Кусочек ткани, трансплантированный из одной области в другую, сохраняет свою специфичность, но дифференцируется в соответствии со своим новым положением. Например, если вновь обратиться к эксперименту, обсуждавшемуся в гл. 16, фрагмент презумптивной кожи брюха гаструлы саламандры после пересадки в область презумптивной оральной эктодермы гаструлы лягушки даст структуры рта, но это будет не челюсть лягушки, а челюсть саламандры. Позиционная информация обладает специфичностью (рот, а не брюхо), но то, каким образом используют клетки эту информацию для своей дифференцировки (развитие балансёров, а не присосок), определяется наследственными свойствами клеток. В сходном эксперименте на зародышах дрозофилы группа клеток позднего имагинального диска ноги, в норме формирующая среднюю часть ноги, после трансплантации в центр диска антенны, клетки которого в норме дают концевую часть антенны, сформирует после выворачивания диска не дистальные структуры антенны, а коготки (концевую часть *ноги*). **Спецификация** положения (середина или конец) не связана с **детерминацией** клеточного типа (нога или антенна). Поэтому на модели Волперта реципрокные пересадки участков французского и американского флагов сохранят идентичность этих участков (т. е. французский или американский), но приобретут специфику (цвет) в соответствии со своей новой позиционной спецификацией.

Градиенты должны быть «прочитаны» клетками, и эта интерпретация градиентов не должна быть линейной. Возьмем, к примеру, серию экзаменационных оценок от 100 до 60. По одной схеме («линейное» чтение) ступень от 100 до 90 обозначается как А, от 80 до 89 – как Б, от 70 до 79 – как В, от 60 до 69 – как Г. По другой схеме (чтение «по кривой») ступень от 100 до 95 – А, от 95 до 85 – Б, от 84 до 70 – В и от 69 до 60 – Г. Помимо одноградиентной модели была предложена двухградиентная модель, при помощи которой ученые попытались объяснить образование рисунка, имитирующего глаз на крыльях бабочки (Nijhout, 1981). Один градиент представлен линейной диффузией морфогена. Второй градиент

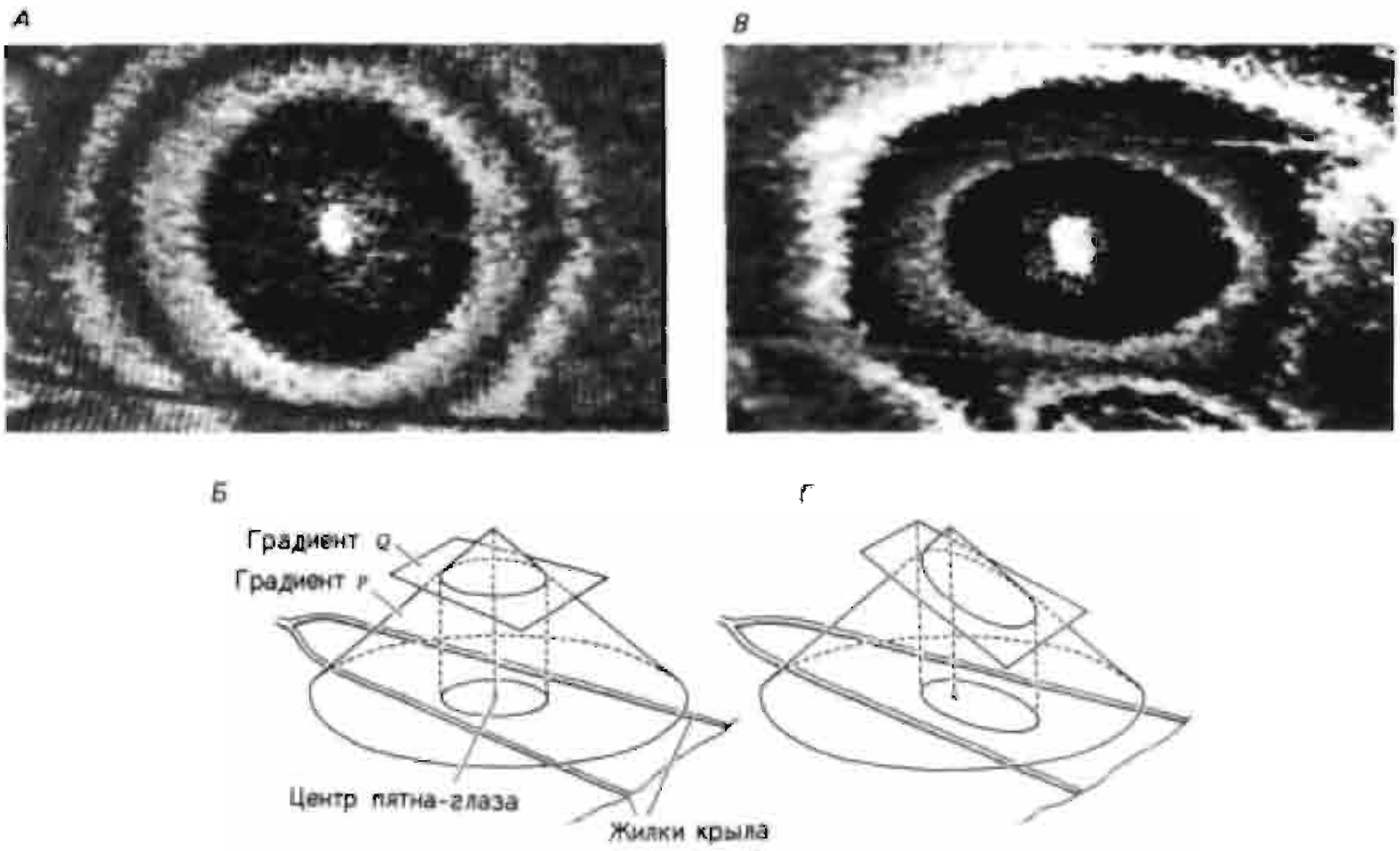


Рис. 17.2. Градиентная модель позиционной информации, предложенная для объяснения образования узора на крыльях бабочки. *А*. Фотография пятна-глаза на крыле бабочки *Morpho peleides*. *Б*. Схема двухградиентной модели, с помощью которой можно объяснить формирование пятна-глаза. Трехмерная форма линейного градиента (т. е. равномерная химическая диффузия во всех направлениях) представляет собой конус (градиент *P*), высота которого отражает концентрацию сигнала. Источник сигнала – вершина конуса, которая соответствует центру развивающегося пятна-глаза. Концентрация *Q* представляет собой уровень вещества, необходимый для достижения порога чувствительности для появления того или иного цвета в клетках крыла. Если чувствительность одинакова по всему крылу, то конус будет рассечен перпендикулярно, в результате чего образуется круглое пятно-глаз. *В*. У других видов, например у *Smyrna blomfildia* пятна-глаза имеют эллипсоидную форму. *Г*. Причиной образования подобного эллипсоидного рисунка может быть разница в направлениях градиента чувствительности *Q*. (По Nijhout, 1981.)

включает интерпретацию этого морфогена; другими словами, порог чувствительности участвующих клеток различается в разных областях крыла. Участие второго градиента выражается в том, что образуются не только круглые пятна, но и пятна эллипсоидной формы (рис. 17.2).

Градиенты у гидры

Развитие гидры может служить иллюстрацией того, как взаимодействующие градиенты детерминируют и судьбу клеток, и размеры организма. Род *Hydra* получил свое название по имени мифического чудовища, способного восстанавливать отрезанные у него головы. Гидры могут размножаться половым путем, но приступают к половому размножению только при неблагоприятных условиях, например при большой скученности или отсутствии пищи[1]. В обычных условиях им свойственно бесполое размножение путем почкования (рис. 17.3). По сути дела, гидра представляет собой узкую трубку, стенка которой состоит из двух слоев клеток; между этими эпителиальными листками находится слой внеклеточного матрикса. Для гидры характерна апикобазальная полярность. Базальный конец представлен секретирующим слизь **базальным диском**, с помощью которого гидра прикрепляется к субстрату. На апикальном конце головы располагается **гипостом**, в центре которого находится рот, окруженный венчиком щупалец. Между гипостомом и базальным диском располагается колонка тела. Почки формируются в виде выростов стенки тела и имеют ту же полярность, что и родительская особь.

Если гидру перерезать пополам, то половина, содержащая базальный диск, сформирует новый гипостом, а половина, содержащая гипостом, сформирует новый базальный диск. Более того, если гидру разрезать на несколько частей перпендикулярно оси тела, то средние кольца ткани регенерируют с образованием полных, пропорционально более мелких, но нормальных животных с гипостомами и базальными дисками. Эти части замещаются не в результате клеточных делений (как это происходит при регенерации конечности или имагинальных дисков у амфибий), а в результате перераспределения и изменения спецификации существующих клеток взрослого организма. Такой тип регенерации, происходящий без клеточных делений, называется **морфаллаксисом**. Итак, любая область тела гидры может дать начало целому организму. Однако гипостомы не формируются где попало: они могут

[1] Показано (Littlefield C. L., Finkemeier C., Bode H. R., 1991), что основным регулятором перехода к гаметогенезу у *H. attenuata* служит сезонное понижение температуры; для лабораторной культуры – от 18–22 °С до 10–12 °С. – *Прим. перев.*



Рис. 17.3. Почкование у *Hydra pirardi*. У гидры слева почек нет; у правой гидры отчетливо видна поляризованная почка. (Фотография с любезного разрешения G. E. Lesh-Laurie.)

сформироваться только на апикальном конце фрагмента. Эта ситуация напоминает «гармонический эквипотенциальный» зародыш морского ежа, и механизм, обусловливающий интеграцию тотипотентных частей в единое поляризованное целое, может быть весьма схож. В обоих случаях пространственная информация, по-видимому, обеспечивается серией градиентов, возникающих на обоих полюсах.

О наличии морфогенетических градиентов у гидры свидетельствуют эксперименты по трансплантации. Если ткань гипостома пересадить в среднюю часть другой гидры, то она сформирует новую апикобазальную ось с направленным наружу гипостомом (рис. 17.4). Если таким же образом трансплантировать ткань базального диска, то сформируется новая ось, но уже с противоположной полярностью – с базальным диском наружу. Более того, если клетки с обоих полюсов вместе трансплантировать гидре-хозяину, то образующаяся почка не будет обладать никакой полярностью (Browne, 1909; Newman, 1974). Другие эксперименты показали (Rand et al., 1926), что нормальная регенерация гипостома может быть подавлена, если вблизи места ампутации имплантировать интактный гипостом.

Интерпретация этих экспериментов связана с представлениями о существовании и градиента активатора головы, и градиента ингибитора головы (Webster, Wolpert, 1966; MacWilliams, 1983a, b). **Градиент активатора головы** можно измерить путем

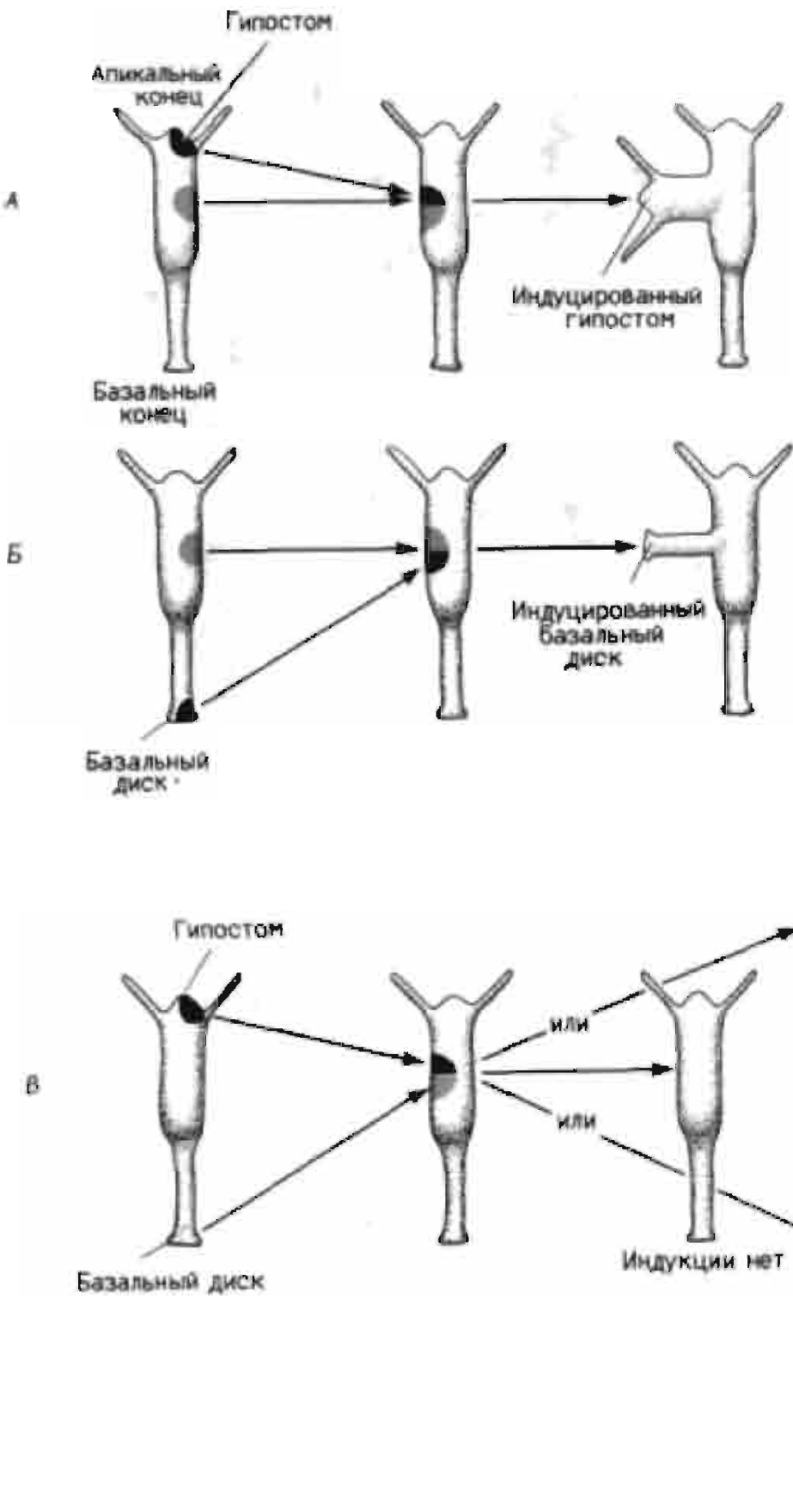


Рис. 17.4. Данные, свидетельствующие о наличии градиентов у гидры. *А*. Латеральная имплантация ткани гипостома вместе с тканью из средней части тела донора в срединую часть тела хозяина вызывает апикальную индукцию (развитие гипостома). *Б*. Совместная пересадка области базального диска и ткани из середины тела вызывает индукцию базального диска. *В*. Гипостом вместе с областью базального диска, пересаженные латерально, не вызывают индукции или вызывают незначительное новообразование без отчетливой полярности. (По Newman, 1974.)

имплантации кольцеобразных фрагментов с разных уровней гидры-хозяина в определенную область туловища хозяина. Чем выше уровень активатора головы в донорской ткани, тем чаще имплантации завершаются формированием гипостомов. Таким образом было показано, что в наивысшей концентрации этот активирующий фактор содержится на апикальном конце и линейно снижается по направлению к базальному. Этот градиент очень устойчив и, вероятно, отвечает за формирование гипостома на апикальном конце гидры. Несмотря на то что любая часть гидры может сформировать голову, этого на самом деле не происходит. Дополнительные головы не образуются потому, что имеющаяся голова является источником ингибирующего влияния, предотвращающего формирование других голов. Этот **градиент ингибитора головы** измерен путем имплантации субгипостомальной ткани (имеющей относительно высокую концентрацию активатора головы) в разные области вдоль тела гидры-хозяина. Чем сильнее ингибирование на данном уровне гидры-хозяина, тем меньшее число транс-

плантатов сформируют головы. Источник этого градиента ингибитора – также гипостом, но ингибирующий фактор, очевидно, представлен очень лабильными и легко диффундирующими молекулами. Он препятствует формированию головы в любом другом месте только при наличии интактной головы. Таким образом, если есть голова, то функционируют оба градиента, но если голова удалена, то лабильный ингибитор исчезает. В результате на дистальном конце кусочка гидры появляется голова (Webster, 1966; Wilby, Webster, 1970). Базальный диск также представляется источником двух градиентов, один из которых активирует развитие подошвы (MacWilliams, Kafatos, 1974; Hicklin, Wolpert, 1973; Grimmelikhuijzen, Schaller, 1977), а другой ингибирует ее (Schmidt, Schaller, 1976). Вещества, возможно служащие активатором и ингибитором, были выделены (Schaller et al., 1979; Berking et al., 1979), и локализация этих небольших молекул находится в соответствии с градиентной гипотезой.

У молодых сформированных гидр градиенты ингибиторов головы и подошвы, по-видимому, блокируют формирование почек. Однако по мере роста гидры источники этих лабильных градиентов все более удаляются друг от друга, образуя в нижней трети туловища область, где оба ингибитора представлены в минимальном количестве. Именно здесь и происходит почкование (рис. 17.5) (Bode, Bode, 1984). Известны мутации, лишающие гидру способности формировать почки; при этом нарушения можно проследить до дефектов в градиентах. Так, мутант L4 у *H. magnipapillata* почкуется очень медленно и лишь по достижении размеров, почти вдвое превышающих длину особей дикого типа. Было обнаружено, что в количественном отношении ингибирующая голову активность этих мутантов значительно выше, чем у гидр дикого типа (Takano, Sugiyama, 1983). Таким образом, выявляется корреляция между размерами животного, местом формирования почек и силой ингибиторных градиентов.

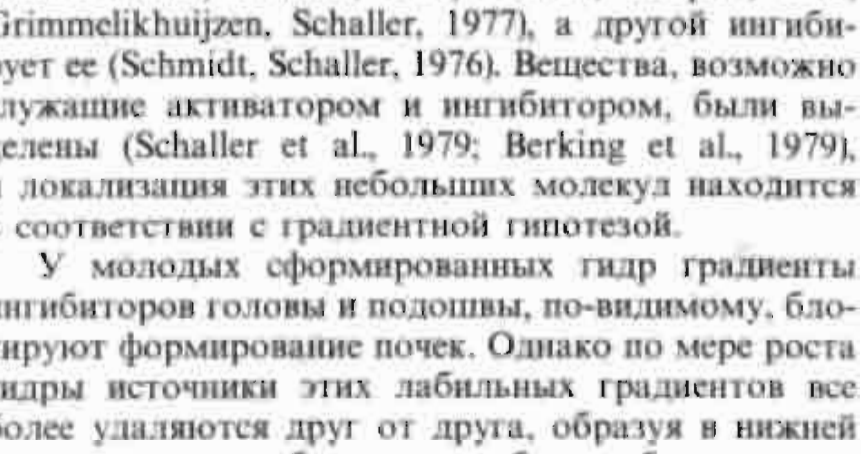


Рис. 17.5. Градиенты ингибирования головы (сплошная линия) и ингибирования подошвы (штриховая линия) у только что отделившейся почки, молодой сформированной гидры и у взрослой почкующейся гидры. (По Bode, Bode 1984.)

Эти градиенты у взрослого животного могут играть дополнительную роль. Несмотря на то что все клетки гидры делятся постоянно, размеры взрослой гидры не увеличиваются. Результаты исследований с применением мечения клеток показали, что эпителиальные клетки постоянно движутся вверх и вниз к полюсам, где и утрачиваются. По мере того как они смещаются к голове или базальной пластинке, они начинают выполнять новые функции и синтезировать новые вещества (Campbell, 1967; Javois et al., 1986). Возможно, градиенты информируют мигрирующие клетки об их положении в теле животного.

При том, что интеграция небольшого поля теоретически может контролироваться диффундирующими веществами, которые образуют градиенты (Crick, 1970), должен существовать некий механизм, гарантирующий, что морфоген не диффундирует в среду или в гастро-васкулярную полость полипа. Уэйкфорд (Wakeford, 1979) показал, что позиционная информация от пересаженных гипостомов сообщается хозяину лишь в том случае, если между клетками хозяина и донора формируются щелевые контакты. Более поздние эксперименты с трансплантациями (Fraser et al., 1987) выявили подавление градиента ингибирования головы антителами против белков щелевых контактов. Таким образом, кажется вполне вероятным, что морфоген переносится от клетки к клетке посредством этих контактов, а не просто путем диффузии через примитивную кишку или циркуляторную систему гидры. Несмотря на то что некоторые из этих соединений выделены, механизм их действия остается не известным.

Регенерация конечности: модель полярных координат позиционной информации

Установление позиционной информации путем градиентов предполагает, что полипотентная клеточная популяция будет дифференциально реагировать на различия в концентрациях растворимого морфогена. Эта модель объясняет формирование пространственной организации у развивающихся животных, подобных гидре, и у животных, претерпевающих морфаллактическую регенерацию. Однако пространственное формирование органов, подвергающихся **эпиморфической регенерации**, по-видимому, создается иным типом позиционной информации. При этом в отличие от морфаллаксиса регенерация включает пролиферацию новых клеток. Все это можно наблюдать на примере регенерирующей конечности у хвостатых амфибий.

Регенерация конечностей у саламандры

Если ампутировать конечность у саламандры, то оставшиеся клетки способны восстановить конечность со всеми ее дифференцированными клетками, расположенными в соответствующем порядке. Замечательно не только то, что конечность регенерирует, но и то, что оставшиеся клетки сохраняют информацию, обусловливающую спецификацию их положения и положения клеток, которые удалены. Другими словами, новые клетки дают только утраченные структуры и не более того; например, при удалении запястья у саламандры формируется новое запястье, а не новое предплечье (рис. 17.6).

После ампутации с краев культи начинают мигрировать эпидермальные клетки, покрывая раневую поверхность. Затем происходит пролиферация этого однослойного эпителия, в результате чего образуется **апикальная эктодермальная шапочка**[1]. Клетки под шапочкой претерпевают глубокую дедифференцировку: костные, хрящевые и нервные клетки, фибробласты, миоциты утрачивают признаки, характерные для их дифференцированного состояния и обособляются друг от друга. В результате на месте хорошо структурированной области культи на границе разреза непосредственно под апикальной эктодермальной шапочкой формируется пролиферирующая масса неотличимых друг от друга дедифференцированных клеток. Эта масса дедифференцированных клеток называется **регенерационной бластемой**; клетки этой бластемы продолжают пролиферировать и дифференцироваться с образованием новых структур конечности. Если разрушить клетки бластемы, то регенерации не происходит (Butler, 1935). Более того, дедифференцируясь при образовании бластемы, клетки вновь приобретают свою эмбриональную пластичность. Карлсон (Carlson, 1972) показал, что если из только что ампутированной конечности саламандры удалить даже 99% мышечных клеток, то регенерирующая конечность будет иметь нормальный набор мышц, занимающих соответствующее положение. Таким образом, иные клетки бластемы, а именно клетки, происходящие из немышечной ткани, должны быть способны формировать мышцы регенерирующей конечности.

В большинстве случаев, однако, для формирования конечности необходима нервная ткань. Было показано (Singer, 1954), что для осуществления регенерации необходим определенный минимум нервных волокон. Предполагается, что нейроны выделяют фактор, стимулирующий митоз и увеличивающий пролиферацию клеток бластемы (Singer, Caston, 1972; Mescher, Tassava, 1975). Один из кандидатов на роль этого нейрального вещества с критическим действием – **фактор роста глии** (ФРГ). Известно, что этот пептид, продуцируемый нервными клетками тритона, присутствует в бластеме и утрачивается при ее денервации. Если добавить ФРГ к денервированной бластеме, то клетки с блокированными митозами вновь приобретают способность к делению (Brockes, Kinter, 1986).



Рис. 17.6. Регенерация передней конечности у саламандры. Вверху представлены интактные конечности. Слева располагается ряд, позволяющий проследить регенерацию конечности после ампутации ниже локтевого сустава; справа – результат ампутации в области плеча. В обоих случаях восстанавливается правильная позиционная информация. (Из Goss, 1969; с любезного разрешения R.J. Goss.)

Итак, мы имеем дело с ситуацией, когда клетки взрослого организма возвращаются в «эмбриональное» состояние и могут приступить к формированию конечности заново. Как и при эмбриональном развитии, бластема формирует более дистальные структуры (Rose, 1962). Следовательно, бластема должна обладать некоторой позиционной информацией, заставляющей бластему культи, содержащей плечевую кость, ни создавать другого плеча, ни тотчас же приступать к образованию пальцев. Бластема регенерирует эти структуры не только начиная с нужного проксимодистального уровня конечности, но при этом сохраняется и полярность переднезадней («большой палец–мизинец») и дорсовентральной

[1] Здесь уместнее использовать термин «апикальная *эпителиальная* шапочка» в отличие от «апикального *эктодермального* гребня», употребляемого для обозначения гомологичной структуры, формируемой эктодермой почки конечности в эмбриогенезе. – *Прим. перев.*



Рис. 17.7. Эксперимент с поворотом бластемы конечности. Если регенерационную бластему конечности отрезать и повернуть на 180° по отношению к телу, то сформируются зеркально-симметричные сверхчисленные пальцы. (По Tickle, 1981.)

(«запястье–ладонь») осей, соответствующих культе.

Полярность регенерирующих конечностей может быть нарушена путем совмещения тканей, в норме не соседствующих друг с другом. Поскольку трансплантацию небольших фрагментов бластемы производить достаточно сложно, этот эксперимент осуществляют путем поворота бластемы относительно культи. Если бластему конечности повернуть на 180° и срастить с культей, то регенерировавшая конечность часто содержит сверхчисленные структуры, что очень сходно с результатом аналогичной операции на развивающейся почке конечности (рис. 17.7) (Bryant, Iten, 1976).

Если механизмы формирования пространственной организации для развивающейся и регенерирующей конечностей одни и те же, то развивающаяся конечность должна реагировать на трансплантацию ткани регенерирующей конечность и наоборот. На примере амбистомы (*Ambystoma mexicanum*) было продемонстрировано (Muneoka, Bryant, 1982), что это действительно так. Если почки конечности трансплантируют на культи с регенерационной бластемой при сохранении первоначальной полярности по отношению к культе, то развиваются нормальные конечности. Однако если полярность переднезадней оси инвертирована по отношению к культе, то формируются сверхчисленные зеркально-отраженные пальцы (рис. 17.8). Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что правила формирования пространственной организации для развивающихся конечностей те же, что и для регенерирующих.

Модель полярных координат

На основе сравнительного изучения эпиморфической регенерации конечностей позвоночных, конечностей насекомых и имагинальных дисков насе-

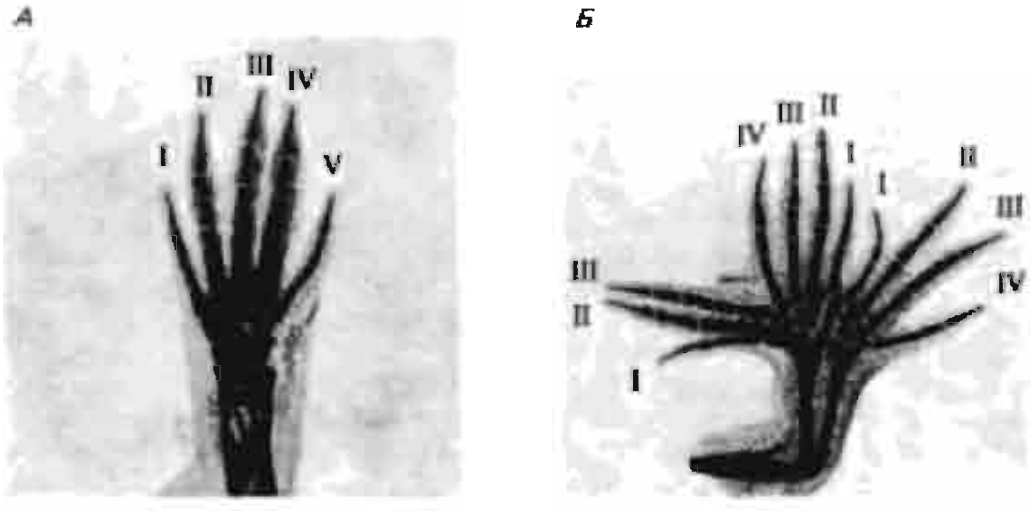


Рис. 17.8. Регуляция роста регенерационной бластемы конечности хвостатой амфибии зоной прогресса развивающейся почки конечности. *А*. Если почку правой задней конечности пересадить на культю правой регенерирующей задней конечности без поворота, то развивается нормальная пятипалая задняя конечность. *Б*. Если трансплантат почки левой задней конечности поместить на культю правой регенерирующей задней конечности, то сформируется аномальная 11-палая конечность. При этом происходит инверсия переднезадних осей хозяина и трансплантата. (Из Muneoka, Bryant, 1962; с любезного разрешения K. Muneoka.)

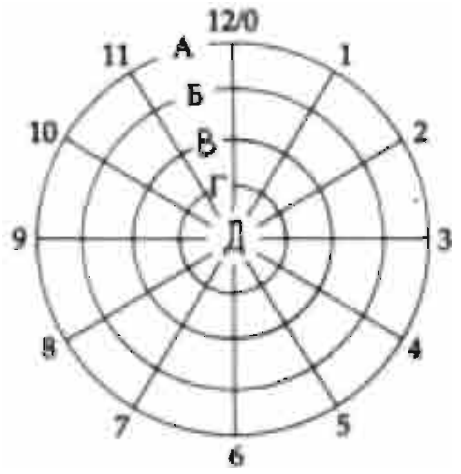


Рис. 17.9. Модель полярных координат, используемая для объяснения спецификации позиционной информации. Каждая клетка обладает двумя позиционными значениями: по окружности (0–12), т.е. по отношению к переднезадней оси, и по радиусу (А–Д), символизирующему проксимо-дистальную ось. (Из French et al., 1976.)

комых Френч и др. (French et al., 1976; Bryant et al., 1981) предложили ряд эмпирических правил, предсказывающих результат разнообразных экспериментальных манипуляций с регенерирующими придатками. Эти авторы исходили из посылки Волперта (Wolpert, 1969), согласно которой пространственная организация возникает на основе узнавания клетками своего относительного положения в развивающейся популяции. Следовательно, по мнению Френча и его коллег, клетка определяет свое физическое положение в системе полярных (подобных циферблату часов) координат (рис. 17.9). В этой системе каждая клетка обладает определенным значением как по окружности (от 0 до 12), так и по радиусу (от А до Д). В случае регенерирующей конечности внешняя окружность представляет проксимальную (плечо) границу поля конечности, а центральная – наиболее дистальные области.

Как мы уже видели, приведение в контакт тканей, в норме не контактирующих друг с другом, но относящихся к одному и тому же полю, вызывает появление дупликаций. Если же ткани не соответствуют одному и тому же полю, то дупликация не возникает. Модель полярных координат оказывается исключительно удобной для предсказания степени дупликации соответствующих структур. **Правило кратчайшей интеркаляции** гласит, что если две в норме не соседствующие клетки совместить, то в месте их соединения начнется рост, продолжающийся до тех пор, пока клетки между этими двумя точками не приобретут все позиционные значения, первоначально существовавшие между исходными точками (рис. 17.10). Последовательность точек на окружности, как и на циферблате, непрерывна, так

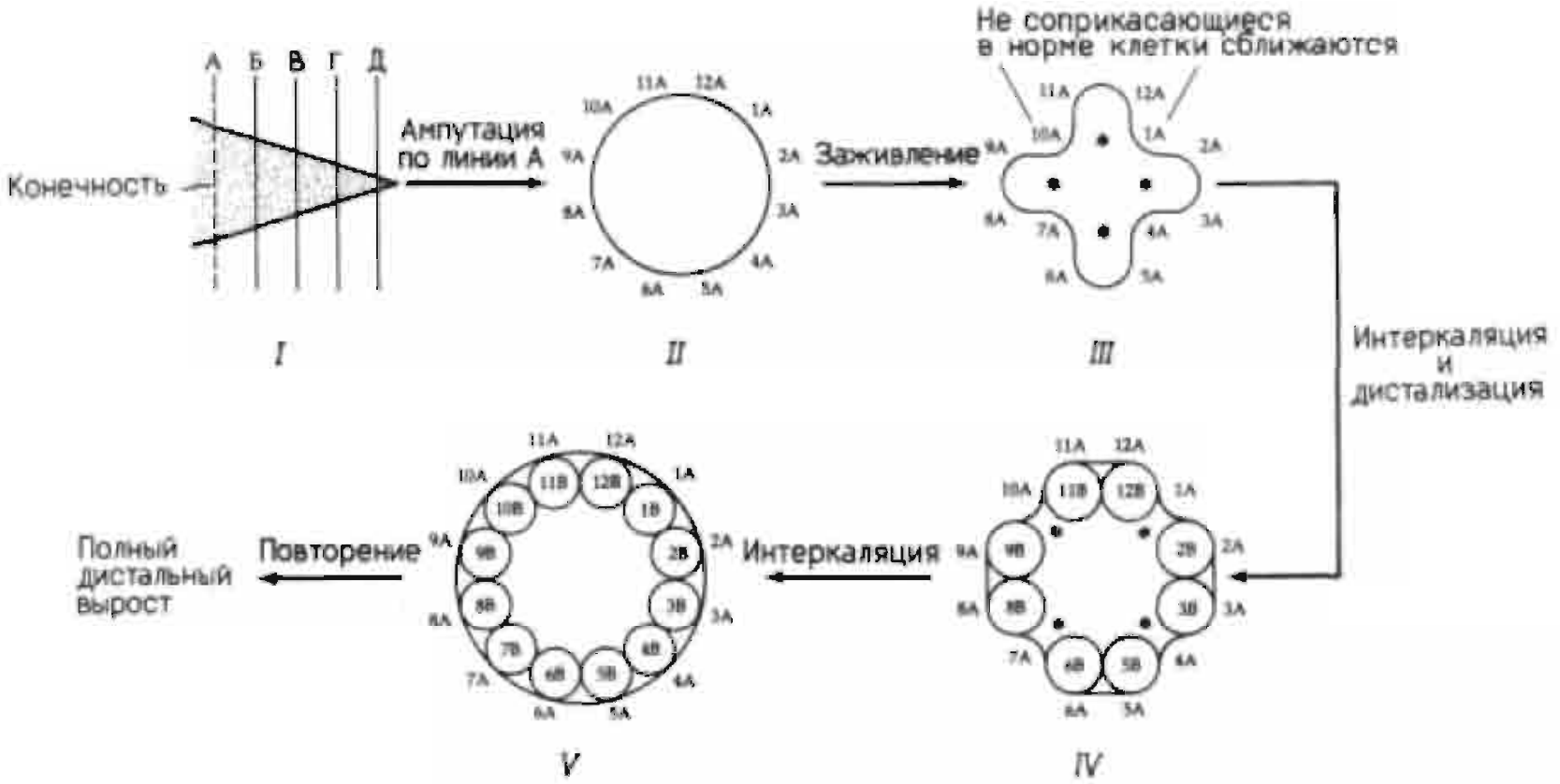


Рис. 17.10. Модель дистального роста. *I, II.* Конечность перерезана по линии А, проксимально по отношению к Б–Д. Эта ампутация экспонирует позиционные значения по окружности А. *III.* Заживление приводит к тому, что не контактирующие в норме клетки (например, 10А и 1А) сближаются у верхушки бластемы. Клетки на границе сблизившихся тканей пролиферируют и приобретают позиционную спецификацию, соответствующую их промежуточному положению. Вместе с тем эти клетки соседствуют с обычно находящимися здесь клетками, разделяя с ними одни и те же позиционные значения на окружности. В соответствии с «правилом дистализации», эти клетки приобретают более дистальное позиционное значение. *IV, V.* Затем происходит интеркаляция этих получивших новую спецификацию клеток (в местах, помеченных звездочками), что приводит к образованию новой поверхности, на которой представлены все значения по окружности. Эта схема повторяется до тех пор, пока не сформируется полная конечность. (По Bryant et al., 1981.)

что 0 равен 12 и не имеет собственного значения. Однако интеркаляция (вставка) между двумя точками на окружности может происходить двумя путями. Если, например, клетки со значениями 4 и 7 поместить рядом, то имеются два возможных пути заполнения промежутка между ними: 4, 5, 6, 7 и 4, 3, 2, 1, 12, 11, 10, 9, 8, 7. В соответствии с моделью выбирается кратчайший путь. Существуют, конечно, исключения, когда клетки обладают значениями, располагающимися в системе координат точно друг против друга; в этом случае кратчайшего пути нет, между противолежащими клетками могут формироваться все структуры.

Второе правило – **правило полного круга для дистальной трансформации.** Как только на раневой поверхности устанавливается полный круг позиционных значений, клетки начинают пролиферировать и давать более дистальные структуры. Механизм, с помощью которого, как полагают, все это происходит, схематически представлен на рис. 17.10; он касается и интеркаляции структур между клетками, обладающими различной позиционной информацией (Bryant et al., 1981). Предсказательная ценность этих правил очевидна в случаях трансплантации между регенерационными бластемами при условии инверсии переднезадней оси (рис. 17.11). Результа-

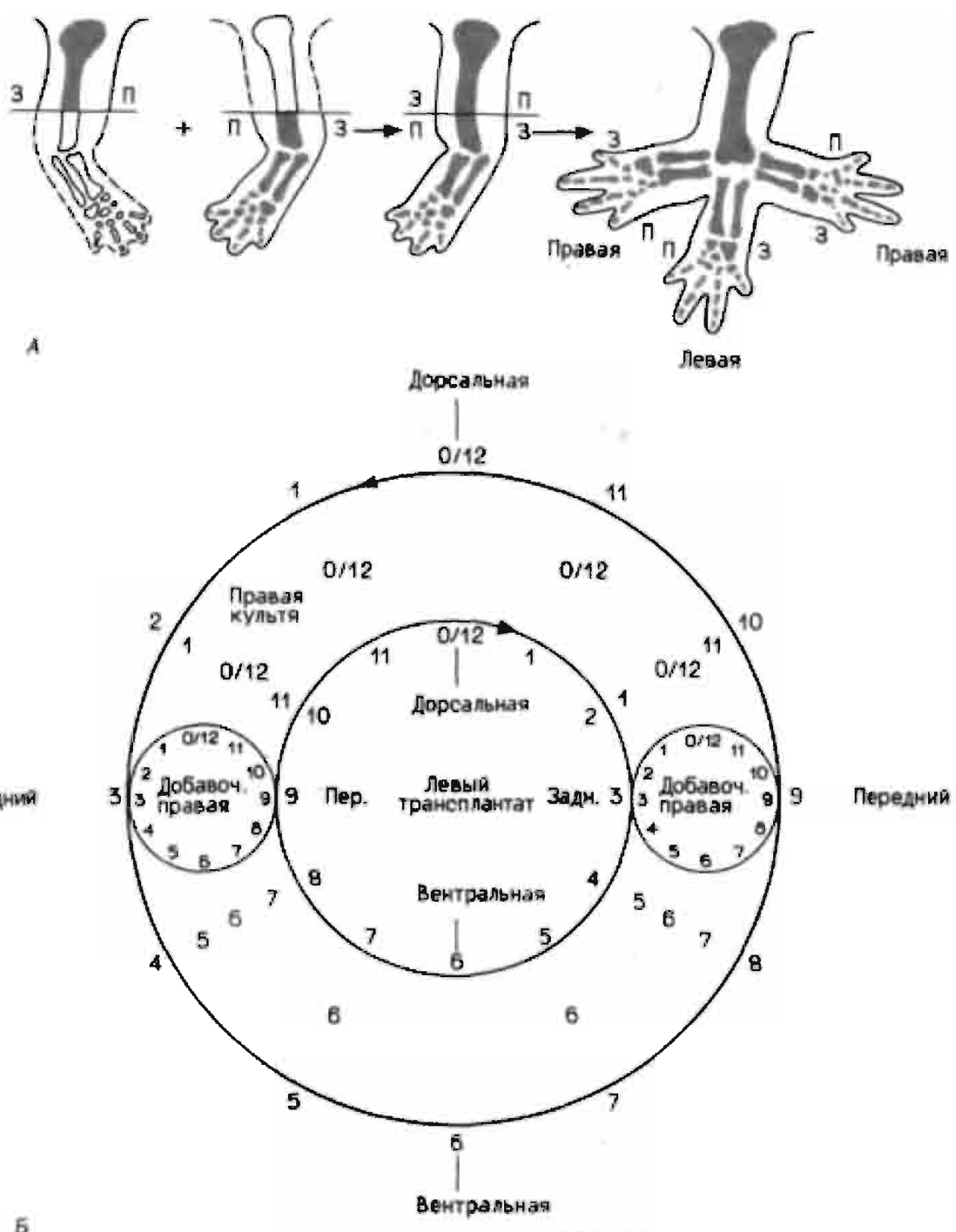


Рис. 17.11. Инверсия переднезадней оси в регенерационной бластеме тритона. *А*. В результате пересадки бластемы левой задней конечности на культю правой задней конечности возникают три набора дистальных структур (ср. с рис. 17.8, *Б*). *Б*. Этот результат может быть предсказан на основе модели полярных координат, в соответствии с которой в дополнение к унаследованным значениям в трансплантированной ткани регенерируют два полных набора промежуточных значений. (По French et al., 1976.)

том такой трансплантации оказывается формирование конечности с тремя дистальными концами (Iten, Bryant, 1975). Это явление можно объяснить, представив на соответствующей координатной плоскости переднезаднюю ось под двумя противоположными номерами,– скажем, 3 и 9. При совмещении значений 3 и 9 образуется полный круг значений на каждом из концов этой оси и небольшие вставочные серии в других местах. В результате получаются три полных круга, которые, по закону дистальной трансформации, дадут три полных конечности, отрастающие от этой позиции дистально.

Модель полярных координат позволяет также предсказать эффект регуляции в случае утраты части ткани. Вследствие того что новообразованные клетки имели бы позиционные значения, промежуточные по отношению к таковым оставшихся клеток, будет восстанавливаться недостающая часть ткани. Можно полагать, что поскольку в основе регенерации лежит узнавание различий между соседствующими тканями, эпиморфическое формирование пространственной организации в ходе регенерации и нормальное формирование пространственной организации в ходе развития эмбриональной конечности являются скорее результатом ближних взаимодействий между соседними клетками, чем результатом градиентов дальнего действия (Bryant et al., 1981).

Формирование пространственной организации в ходе развития конечностей: спецификация осей

Модель полярных координат оказалась исключительно полезной для предсказания хода развития конечности после приведения в контакт клеток, спецификация которых уже произошла. Но что придает клеткам их первоначальное позиционное значение? Полученные в последнее десятилетие данные свидетельствуют о том, что в почке эмбриональной конечности работают градиенты. Конечность позвоночного представляет собой исключительно сложный орган с асимметричной пространственной организацией частей. Кости передней конечности, будь то крыло, рука, ласт или плавник, состоят из плечевой кости (прилежащей к туловищу), лучевой и локтевой костей в средней части и дистальных костей запястья и пальцев (рис. 17.12). Исходно скелет передней конечности представлен хрящевыми структурами, которые позднее замещаются костью. Организацию конечности, а именно положение каждого из ее костей или мышц, можно признать практически совершенной. Что толку в конечности, если пальцы будут расположены между плечом и предплечьем. Полярность можно обнаружить и в других измерениях. Так, каждая рука человека развивается в виде



Рис. 17.12. Скелет крыла курицы. Пальцы пронумерованы в соответствии с общепринятыми обозначениями: II, III, IV. Пальцы I и V в крыле курицы отсутствуют. (По Saunders, 1982.)

зеркального отражения другой. Возможна и иная организация, например развитие больших пальцев на левой стороне обеих рук, однако это не является общим правилом. Так или иначе, но обычно формируется трехмерная организация передней конечности.

Поле конечности

Мезодермальные клетки, дающие начало конечности позвоночного, могут быть идентифицированы несколькими способами: 1) можно удалить те или иные группы клеток и затем наблюдать развитие конечности в условиях их отсутствия (Detwiler, 1918; Harrison, 1918); 2) можно трансплантировать те или иные группы клеток в новые положения и наблюдать, смогут ли они дать начало конечности (Hertwig, 1925); 3) можно маркировать группы клеток красителями или радиоактивными предшественниками макромолекул и наблюдать, какие из потомков маркированных клеток примут участие в развитии конечности (Rosenquist, 1971). Использование этих методов позволило точно локализовать **область проспективной конечности** у зародышей многих позвоночных. На рис. 17.13 представлена область проспективной конечности у хвостатой амфибии *Ambystoma maculatum* на стадии хвостовой почки. Центр диска соответствует клеткам мезодермы боковой пластинки, в норме дающим собственно конечность. Рядом с ней располагаются клетки, которые сформируют перибрахиальную боковую ткань и плечевой пояс. Эти две области и составляют классический «диск конечности», используемый в экспериментах, на которые мы будем ссылаться в этой главе. Однако, если все эти клетки удалить, конечность у зародыша тем не менее образуется, хотя и несколько позже, за счет клеток, окружающих эту область. Если же удалить и эти клетки, то конечность не сформируется. Зона, включающая все

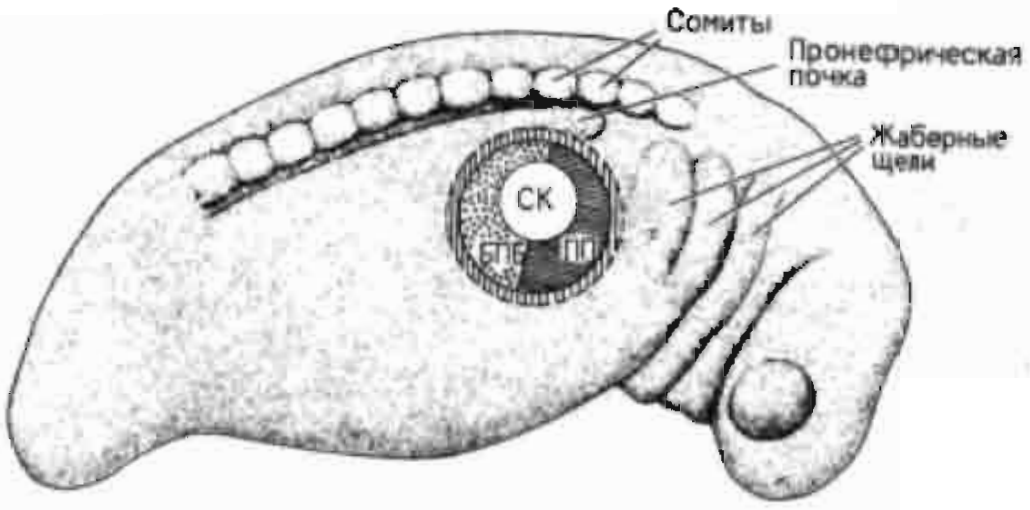


Рис. 17.13. Проспективная карта почки передней конечности *Ambystoma maculatum*. Центральная область представлена клетками, которые дадут начало свободной конечности (СК); клетки, окружающие СК, дадут начало боковой перибрахиальной ткани (БПБ) и плечевому поясу (ПП). Клетки, располагающиеся снаружи от этих областей, обычно не включаются в состав конечности, но могут участвовать в регуляции ее формирования в случае экстирпации центральных тканей. (По Stokum, Fallon, 1982.)

клетки, способные к развитию конечности, называется **полем конечности**. Поле может быть определено как группа клеток, чье положение и судьба обладают спецификацией в пределах одних и тех же границ (Weiss, 1939; Wolpert, 1977).

Поле конечности обладает изначальной способностью к регуляции в случаях утраты или добавления частей. У *Ambystoma* на стадии хвостовой почки любая половина диска конечности при пересадке на новое место способна регенерировать всю конечность (Harrison, 1918). В этом свойстве диска конечности можно также убедиться в результате его вертикального рассечения на два или более сегментов, поместив при этом между сегментами тонкие прокладки, препятствующие их слиянию. В данном случае каждая часть даст полную конечность. Регуляционная способность почки конечности недавно была убедительно продемонстрирована в удивительном эксперименте, поставленном самой природой. В одном из прудов в Санта-Крус (Калифорния) в большом числе были обнаружены многоногие лягушки и саламандры (рис. 17.14). Наличие у них дополнительных конечностей было связано с инвазией личинок паразитическими трематодами. По-видимому, во время закладки почки конечности головастика яйца этих трематод расщепляли ее зачаток в нескольких местах (S. Sessions, неопубликованные данные). Таким образом, поле конечности, как и ранний зародыш морского ежа, представляет собой «гармоническую эквипотенциальную систему», клетки которой инструктированы к формированию любой части конечности.

Поляризация вдоль оси конечности

Позиционная информация необходима для создания конечности, которая функционировала бы в трехмерной системе координат[1]. По-видимому, оси полярности детерминируются в такой последовательности: переднезадняя (соответствующая линии между большим пальцем и мизинцем), дорсовентральная (соответствующая линии между верхней и нижней поверхностями руки) и проксимодистальная (соответствующая линии, соединяющей плечо с кончиком пальца).

Первое изменение при переходе от полипотентного состояния состоит в самодифференцировке переднезадней оси. У куриного зародыша ее спецификация происходит задолго до того, как становится различимой почка конечности. Гамбургер (Hamburger, 1938) показал, что уже на стадии 16 сомитов мезодерма проспективного крыла, трансплантированная на бок зародыша, развивается в конечность с переднезадней и дорсовентральной полярностью донорского трансплантата, а не ткани хозяина (рис. 17.15).

Проксимодистальная ось устанавливается только после индукции апикального эктодермального

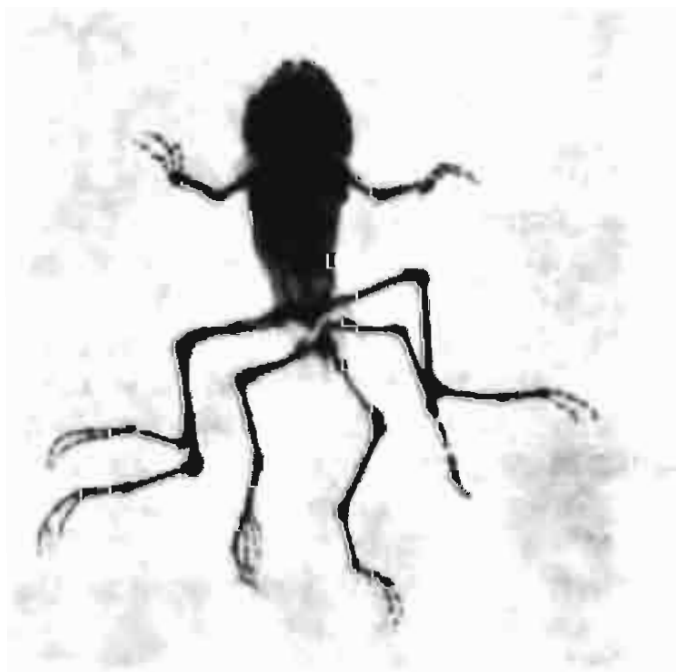


Рис. 17.14. Регуляционные возможности поля конечности, демонстрируемые на примере расщепления полей ранних задних конечностей головастика *Hyla* многочисленными яйцами трематод. (Фотография с любезного разрешения S. Sessions.)

[1] В действительности это четырехмерная система, в которой время служит четвертой осью. Специалисты в области биологии развития привыкают воспринимать природу в четырех измерениях.

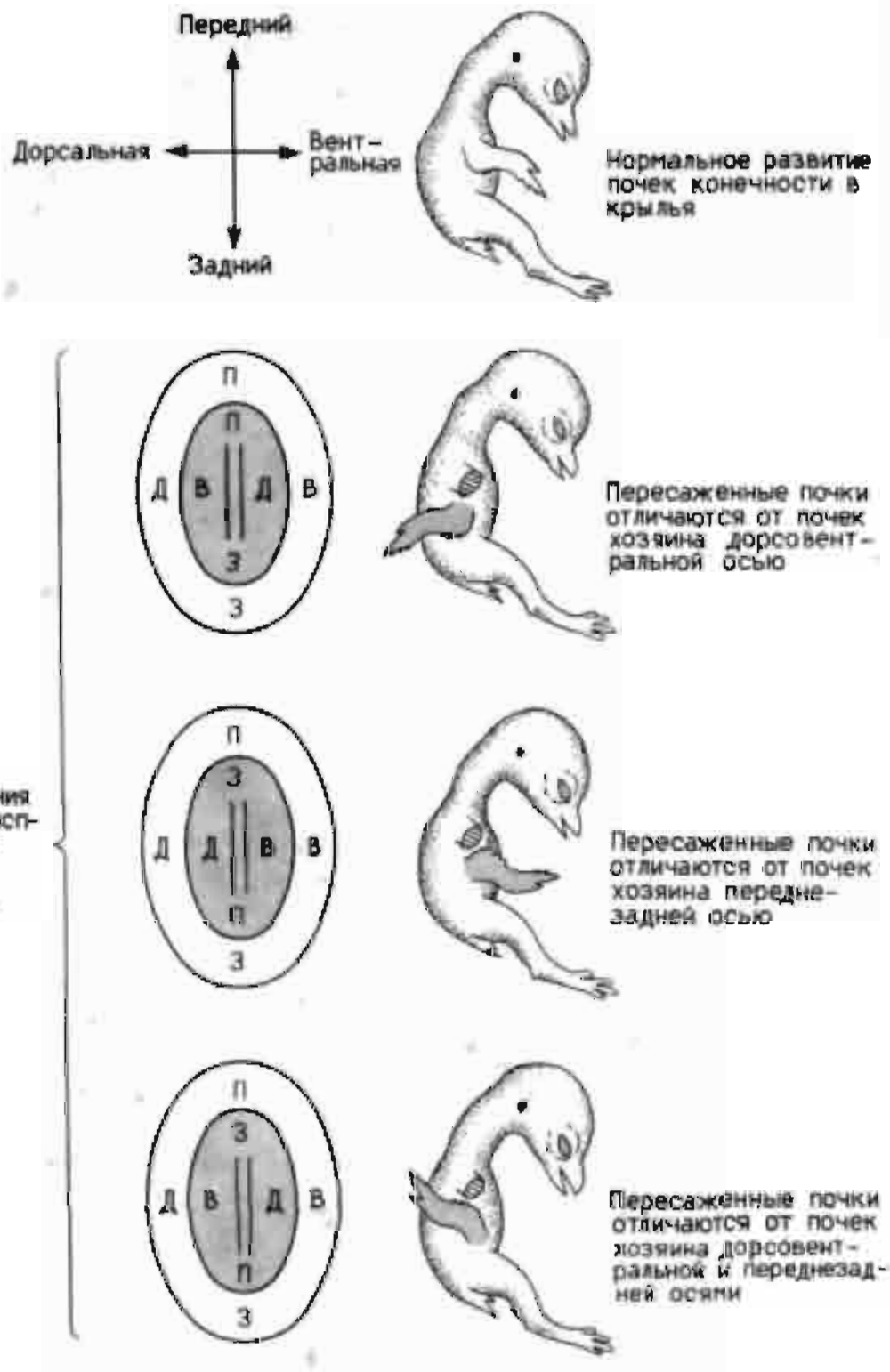


Рис. 17.15. Спецификация переднезадней и дорсовентральной осей крыла куриного зародыша. Пересаженная почка конечности развивается в соответствии со своей собственной полярностью и не воспринимает полярности хозяина. Крылья, развивающиеся из пересаженных почек конечностей, выделены серым цветом. Для того чтобы не перегружать рисунок, нормально развивающееся крыло хозяина не показано. (По Hamburger, 1938.)

гребня (АЭГ) подлежащей мезодермой. Удлинение конечности происходит благодаря пролиферации мезенхимных клеток, располагающихся под АЭГ. Эта область клеточных делений называется **зоной прогресса.** Клетки покидают зону прогресса, получив свои проксимодистальные значения. Первые клетки, вышедшие из зоны прогресса, формируют проксимальные структуры, те же клетки, которые в зоне прогресса многократно делятся, дают более дистальные структуры (Saunders, 1948; Summerbell, 1974). Поэтому если из ранней почки крыла удалить АЭГ, клетки зоны прогресса гибнут и в результате формируется лишь плечевая кость. Если АЭГ удалить несколько позже, формируются также лучевая и локтевая кости (рис. 17.16).

Носителем проксимодистальной полярности (как и двух других осей) служит мезодермальный компартмент конечности. Если бы АЭГ обеспечивал позиционную информацию, каким-то образом инструктируя лежащую под ним недифференцированную мезодерму относительно структур, которые она должна формировать, то при пересадках более старого АЭГ на молодую мезодерму должны были бы образовываться более дистальные структуры. Однако этого не происходит (Rubin, Saunders, 1972), так как при комбинациях молодой мезодермы с АЭГ любого возраста формируется конечность с нормальной последовательностью структур. Но если всю зону прогресса, включая и мезодерму, от раннего зародыша пересадить на почку конечности зародыша более поздней стадии, то в дополнение к старым, уже имеющимся структурам, разовьются новые проксимальные. И наоборот, если старые зоны прогресса поместить в молодые почки конечности,

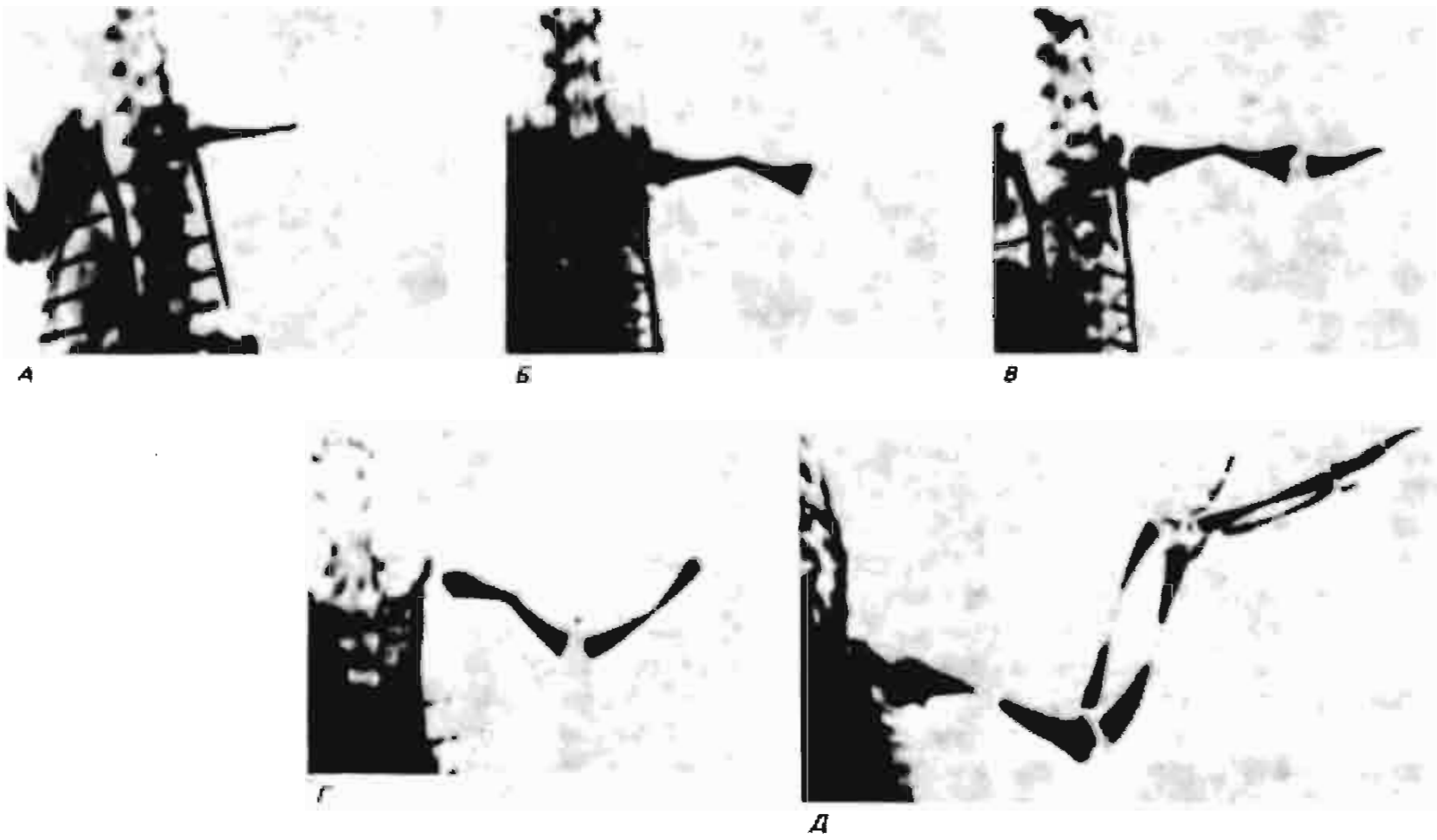


Рис. 17.16. Организация скелета (вид со спинной стороны) на разных стадиях развития куриного зародыша после полного удаления с почки крыла апикального эктодермального гребня (*А – Г*). *Д*. Нормальный скелет крыла. (Из Iten, 1982; с любезного разрешения L. Iten.)

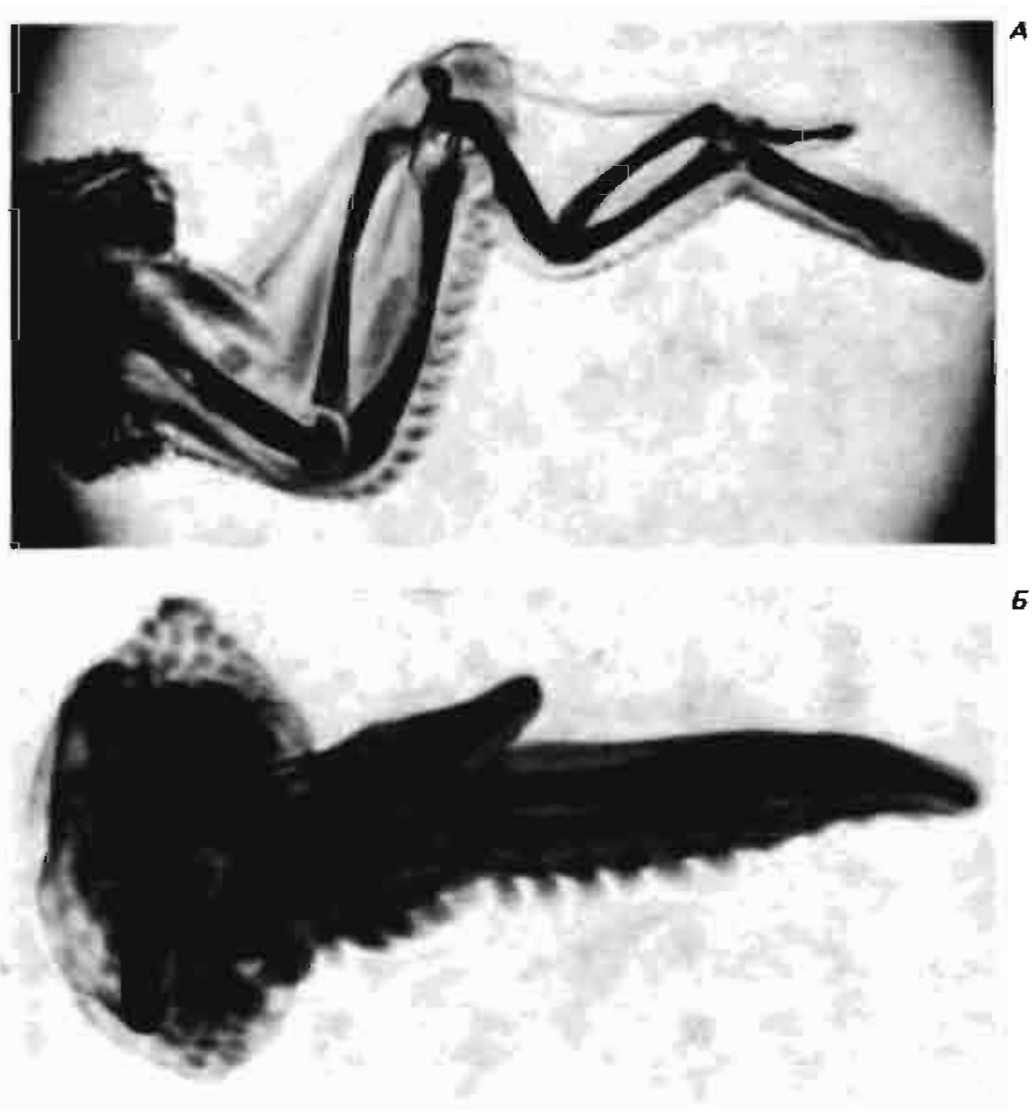


Рис. 17.17. Контроль проксимодистальной спецификации клетками зоны прогресса (ЗП). *А*. Дополнительный набор лучевой и локтевой костей, сформированный в результате трансплантации ЗП ранней почки на позднюю почку крыла, где уже сформировались эти кости. *Б*. Отсутствие промежуточных структур в результате трансплантации ЗП поздней почки конечности на раннюю почку конечности. Скобами отмечено положение трансплантата. (Из Summerbell, Lewis, 1975; с любезного разрешения D. Summerbell.)

то будут формироваться дистальные структуры, т. е. непосредственно за плечевой костью будут располагаться пальцы, а не лучевая и локтевая кости (рис. 17.17). (Summerbell, Lewis, 1975).

Несмотря на то что дифференцировка проксимодистальных структур зависит, предположительно, от числа делений клеток в зоне прогресса, позиционная информация, инструктирующая клетку о ее положении на переднезадней или дорсовентральной осях, должна происходить из других источников. Одна из серий экспериментов (Saunders, Gasseling, 1968; Tickle et al., 1975; Summerbell, 1979) доказала, что переднезадняя ось специфицируется небольшим объемом мезодермальной ткани, располагающейся вблизи задней границы между молодой почкой конечности и стенкой тела. Если эту ткань молодой почки конечности трансплантировать в положение на передней стороне другой почки конечности (рис. 17.18), то число пальцев в сформированном крыле удвоится. Кроме того, дополнительный набор пальцев окажется зеркальным отражением нормального набора. Полярность сохраняется, но информация теперь идет как спереди, так и сзади. Эта область мезодермы была названа **зоной поляризующей активности** (ЗПА).

Распределение и сила активности позиционного сигнализирования ЗПА почек крыла и ноги куриного зародыша были картированы (Honig, Summerbell, 1985; Hinchliffe, Sansom, 1985). Как показано на рис. 17.19, поляризующая активность (измеренная путем пересадок задних маргинальных клеток на передний край почки конечности) наиболее высока в определенной области заднего края и постепенно снижается по мере удаления от нее. Она также ослабевает по мере развития. Было высказано предположение, что ткань ЗПА воздействует путем секреции морфогена, который диффундирует от своего источника, образуя в почке конечности градиент концентрации от ее заднего к переднему концу. Клетки, наиболее близко расположенные к ЗПА, будут подвергаться действию наибольших количеств этого соединения, тогда как клетки, наиболее удаленные от ЗПА, окажутся под действием относительно низких его концентраций. Первое подтверждение этой гипотезы было получено в результате серии экспериментов (Summerbell, 1979), в которых передняя часть почки конечности была отделена от задней части почки непроницаемым барьером. В этих условиях передние структуры не формировались. Интерпретация этих результатов связывалась с ЗПА, которая секретирует морфоген, организующий в почке конечности переднезадний градиент; передние структуры не могли формироваться по той причине, что не получали морфогена (рис. 17.20).

Имеются и другие данные, свидетельствующие о том, что ЗПА синтезирует (или активирует) диффундирующий морфоген. Поляризующая активность ЗПА может быть ослаблена в результате уменьшения числа клеток, пересаживаемых из ЗПА на передний край (Tickle, 1981). Позже Тикл и др. (Tickle et al., 1982, 1985) смогли имитировать активность ЗПА действием известного диффундирующего вещества – *транс*-ретиноевой кислоты. Введя пропитанные ретиноевой кислотой гранулы (бусины) в передний край почки конечности куриного зародыша (рис. 17.21), они получили такую же зеркальную дупликацию пальцев, что и при подсадке ткани ЗПА. Оказалось, что пропитанные ретиноевой кис-



Рис. 17.18. Дупликация пальцев, возникших как зеркальное отражение нормальных пальцев, после пересадки зоны поляризующей активности (ЗПА) в область другой почки конечности. (Из Honig, Summerbell, 1985; фотография с любезного разрешения D. Summerbell.)

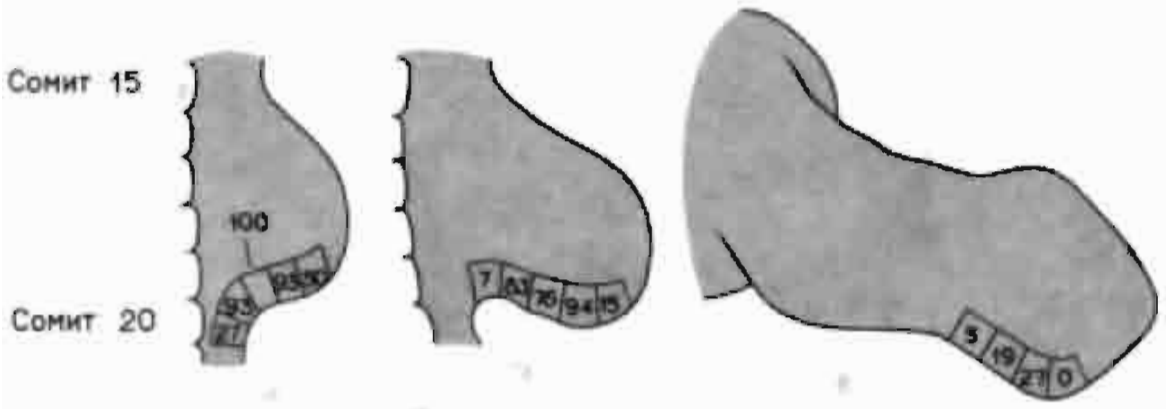


Рис. 17.19. Карта активности позиционного сигнализирования (выраженная в процентах) в процессе развития конечности. Различные области из заднего края почки конечности вырезали и пересаживали в передний край. Сто процентов означает полную дупликацию в случае всех пересадок (как показано на рис. 17.18). (По Honig, Summerbell, 1985.)

лотой гранулы обладают такой же кинетикой действия, как и ткань ЗПА, образуя градиент через почку конечности.

Если ретиноевая кислота действительно служит естественным морфогеном, отвечающим за переднезаднюю полярность конечности куриного зародыша, то должны быть соблюдены четыре условия: 1) ретиноевая кислота должна присутствовать в ранней почке конечности куриного зародыша; 2) она должна образовывать градиент концентрации от заднего (ЗПА) к переднему краю; 3) клетки почки конечности должны экспрессировать белки, связывающие ретиноевую кислоту; 4) ретиноевая кислота должна присутствовать в концентрациях, способных вызывать дупликацию пальцев при экзогенном введении.

Все эти условия можно соблюсти. В 1987 г. Таллер и Эйхель (Thaller, Eichele, 1987) идентифицировали естественно присутствующий градиент ретиноевой кислоты в ранней почке конечности куриного зародыша; этот градиент имел пик в ЗПА. Поскольку биохимический анализ зародышей – задача чрезвычайно сложная (что объясняется их очень малыми размерами), для этой работы потребовались срезы 5536 почек конечностей, причем объем каждой почки составлял около 0,8 мкл. Было обнаружено, что целая почка конечности содержит ретиноевую кислоту в концентрации, равной примерно 25 нМ. При экзогенном введении на переднем крае почки конечности эта концентрация способна вызывать полную зеркальную дупликацию пальцев. В клетках почки конечности были также идентифицированы белки, связывающие ретиноевую кислоту. *Клеточный белок*, связывающий ретиноевую кислоту (связывающий ее в цитоплазме), сосредоточен в почке конечности и в клетках нервного гребня, которые чувствительны к ретиноевой кислоте (Maden et al., 1989). Выделен также специфический *ядерный* рецептор ретиноевой кислоты (белок, сходный со стероидсвязывающими факторами транскрипции). Ген этого белка клонирован, и с помощью радиоактивной кДНК гена удалось локализовать в почке конечности и краниальных производных нервного гребня мРНК ядерного рецептора ретино-

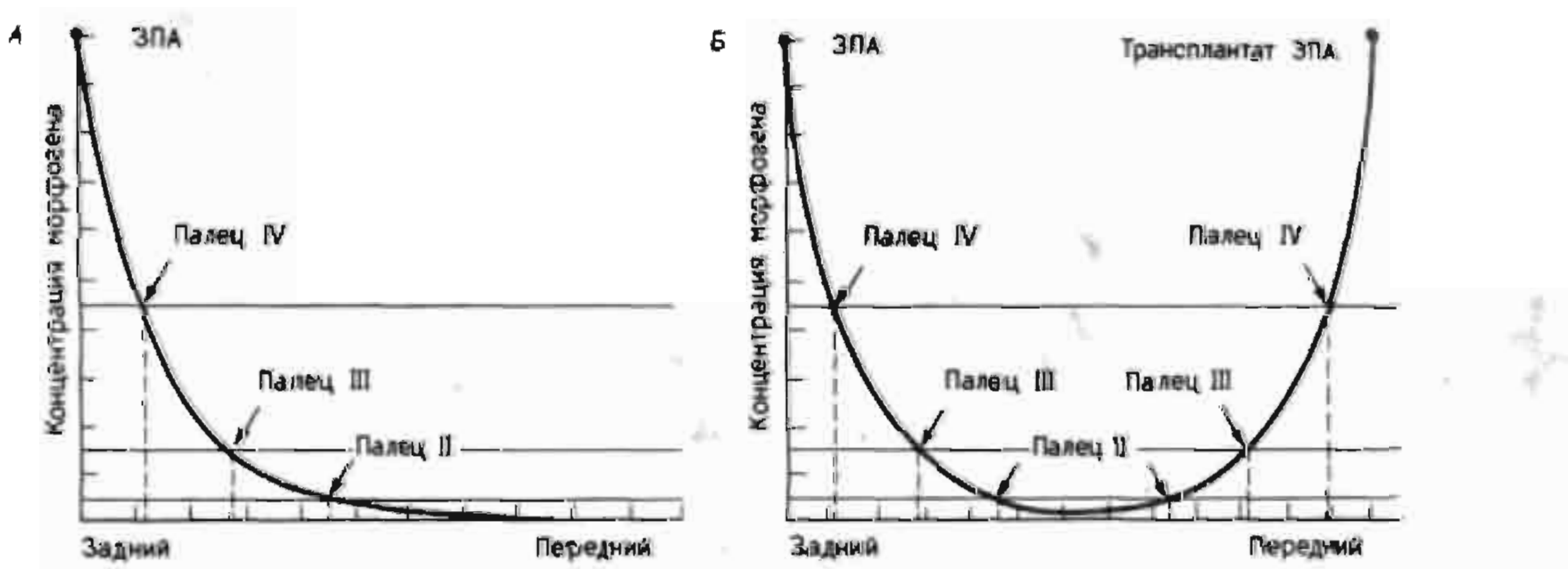


Рис. 17.20. Модель действия диффундирующего морфогена, секретируемого тканью ЗПА. *А*. Нормальная конечность. ЗПА которой синтезирует диффундирующее соединение; градиент концентрации этого соединения снижается по направлению к переднему концу. По мере того как снижение концентрации проходит определенные пороговые уровни, клетки получают инструкцию к формированию того или иного пальца. Задний палец обозначен числом IV, передний – II. *Б*. Пересадка дополнительной ЗПА в переднюю область почки конечности изменяет градиент концентрации этого морфогена, устанавливая симметричное его распределение. Поскольку пороговые условия сохраняют свое значение, развиваются симметричные дополнительные пальцы.

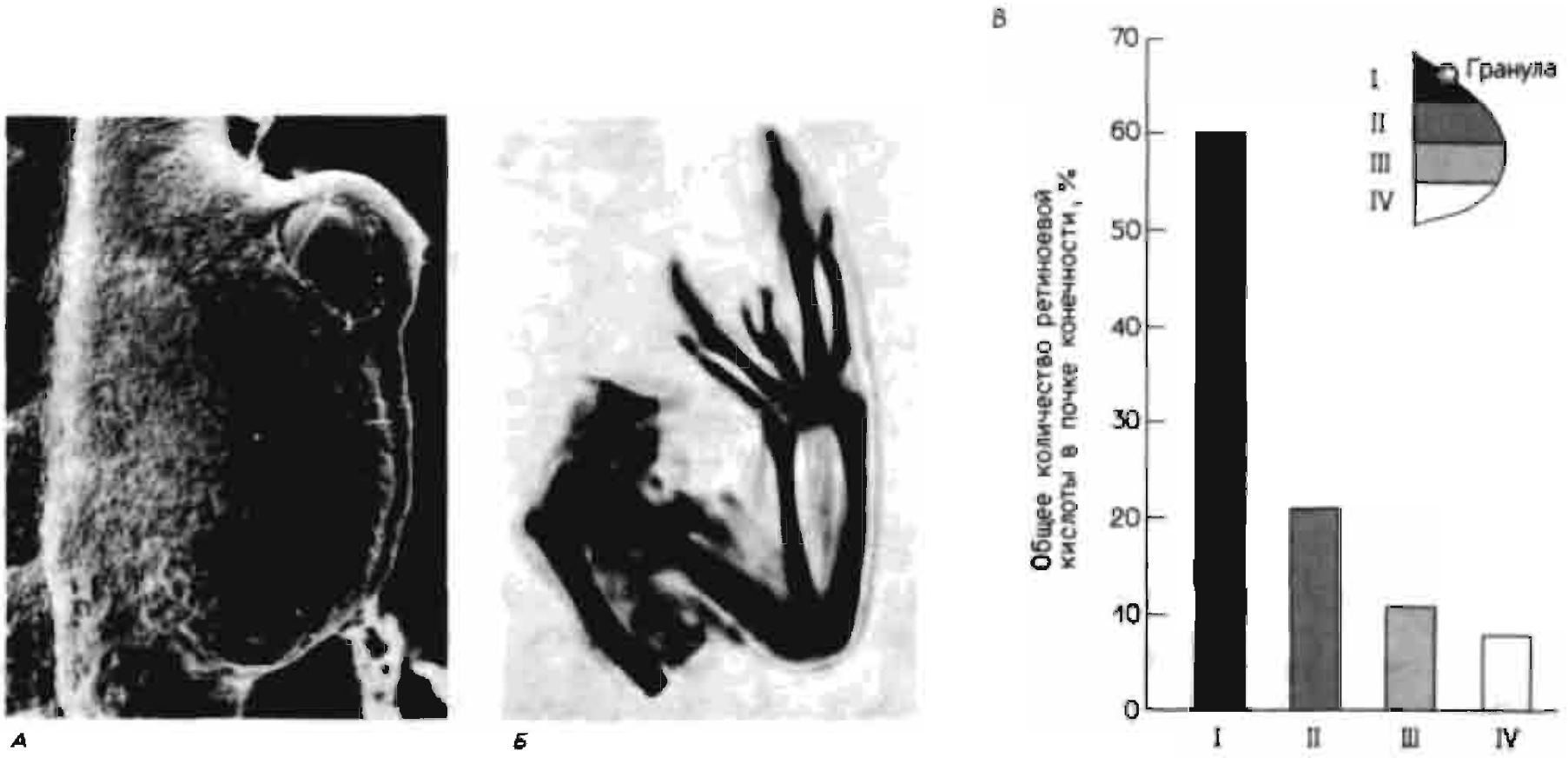


Рис. 17.21. Действие ретиноевой кислоты на развитие конечности у куриного зародыша. *А*. Микрофотография ранней почки конечности куриного зародыша, в которую помещена гранула, пропитанная ретиноевой кислотой. Микрофотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. *Б*. Если в почку конечности помещена гранула, пропитанная ретиноевой кислотой в концентрации 10 мкг·мл$^{-1}$, то образуется удвоенное крыло. *В*. Градиент концентрации ретиноевой кислоты в почке конечности через 6 ч после введения в почку конечности гранулы. (Из Tickle et al., 1985; фотография с любезного разрешения C. Tickle.)

евой кислоты. У 11-дневного зародыша мыши транскрипты рецептора ретиноевой кислоты сначала обнаруживаются по всей почке конечности, а затем локализуются в скоплениях будущих хрящевых клеток (Ruberte et al., 1990). В процессе регенерации конечностей тритона рецепторы ретиноевой кислоты выявляются в бластеме вскоре после ампутации. Наиболее высокий уровень их экспрессии отмечен при дифференцировке хряща; по завершении регенерации этот уровень снижается (Giguère et al., 1989; Ragsdale et al., 1989). Таким образом, создается впечатление, что у позвоночных ЗПА секретирует ретиноевую кислоту, образующую градиент, который обусловливает пространственную организацию пальцев в почке конечности.

Возникает следующий вопрос: если ретиноевая

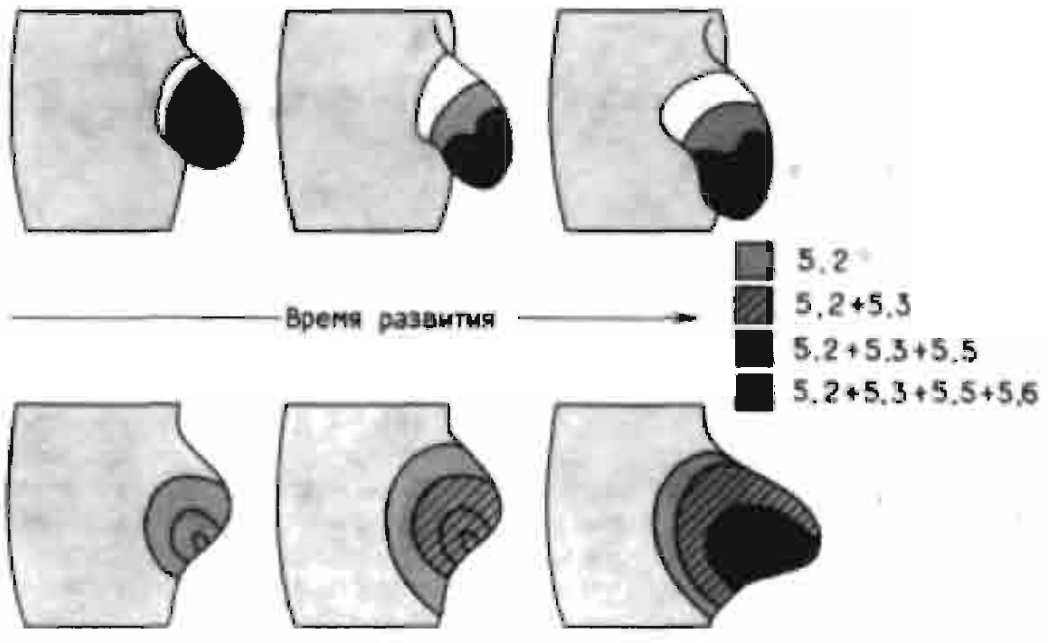


Рис. 17.22. Локализация продуктов гомеобоксодержащего гена *Hox 5* в развивающейся почке конечности куриного зародыша. *Вверху*. Увеличение последовательностей гена *Hox 5* по мере развития почки конечности. *Внизу*. Гипотетическая схема генерации таких картин зоной поляризующей активности. (По Dollé et al., 1989.)

кислота служит морфогеном у позвоночных, то каковы ее функции в клетке? Согласно одной из гипотез, различные концентрации ретиноевой кислоты активируют разные гомеобокссодержащие гены. Последние представляют собой факторы транскрипции и, как известно (гл. 12 и 18), активируют различные батареи генов вдоль переднезадней оси. Было обнаружено (Dollé et al., 1989), что вблизи ЗПА зародыша мыши активны гомеозисные гены *Hox 5.2, 5.3, 5.5* и *5.6*. Несколько выше ЗПА не обнаруживаются транскрипты *Hox 5.6*, а еще выше не наблюдаются транскрипты *Hox 5.5*. По мере удаления от ЗПА транскрипционно активным остается лишь ген *Hox 5.2* (рис. 17.22). Возможно, гены, активируемые этими гомеобоксными факторами транскрипции, отвечают за различные свойства клеток этих областей почки конечности. К числу таких свойств можно отнести особенности клеточной поверхности. Соответствующие молекулы клеточной мембраны, связанные с активностью ретиноевой кислоты, пока не идентифицированы.

Дополнительные сведения и гипотезы

Ретиноевая кислота и формирование пространственной организации

Открытие морфогена у позвоночных явилось бы волнующей кульминацией продолжавшихся в течение десятилетий интенсивных исследований, а подтверждение предположений о том, что ретиноевая кислота служит естественным морфогеном при установлении полярности конечности, было бы особенно интересным, поскольку витамин А и его производные (**ретиноиды**) обладают широким спектром воздействий на развитие. Витамин А играет существенную роль в нормальном развитии костей и глаз млекопитающих. Если диета беременных и кормящих млекопитающих не содержит достаточного количества этого витамина, то у потомства происходит дегидратация и отслаивание роговицы, в сетчатке не накапливается зрительный пигмент, а кости не удлиняются в должной степени. Добавление ретиноидов в рацион таких животных (в остальном развивающихся нормально) оказывает значительное компенсирующее воздействие, которое зависит от дозы и от вида животного (Frolik, 1984). В некоторых работах было продемонстрировано, что ретиноиды необходимы для нормального развития эпителия (Wolbach, Howe, 1925), а применение производных витамина А трансформирует кератинизированный кожный эпителий куриного зародыша в ресничный эпителий, способный секретировать слизь (Fell, Mellanby, 1953). Ретиноевая кислота может вызывать терминальную дифференцировку некоторых злокачественных опухолей, клетки которых перестают делиться (Strickland, Mahadavi, 1978; Beitman et al., 1980).

Растущие конечности реагируют на ретиноиды по-разному в зависимости от 1) дозы ретиноида; 2) вида животного; 3) состояния конечности (т.е. развивается ли она у зародыша или регенерирует у взрослого животного). Как уже было сказано, воздействие ретиноевой кислотой на передний край развивающейся почки конечности куриного зародыша вызывает развитие пестипалой, с зеркальным расположением пальцев конечности. Однако при высоких концентрациях развитие конечности вовсе прекращается и формируется культя. У других животных воздействие ретиноидов на почку конечности приводит к остановке роста кости (Scadding, Maden, 1986). Сходным образом, инъекция витамина А беременным мышам ведет к редукции конечности у плодов (Kochhar, 1977) и к другим аномалиям (см. гл. 5).

Однако в случае *регенерирующих* конечностей эффект оказывается иным. Погружение бластемы регенерирующей конечности саламандры в витамин А вызывает зависимую от дозы проксимодистальную дупликацию структур конечности; другими словами, полная конечность (начиная с наиболее проксимальной кости) отрастает от культи конечности независимо от исходного уровня ампутации (рис. 17.23) (Niazi, Saxena, 1978; Maden, 1982). Создается впечатление, что ретиноевая кислота проксимализует позиционное значение клеток бластемы, заставляя их «забыть» свое дистальное положение и регенерировать больше структур, чем они создали бы при нормальной регенерации. Чувствительность регенерирующих клеток к ретиноидам выше на стадии дедифференцировки и накопления клеток бластемы (Thomas, Stocum, 1984). В случае регенерирующих конечностей лягушки (*Rana*) и амбистомы (*Ambystoma*) воздействию подвергаются как проксимодистальная, так и переднезадняя оси, и в результате формируется зеркально дуплицированная полная конечность, начиная от места ампутации (рис. 17.24).

Способность витамина А и его производных изменять нормальное формообразование дает ключ к пониманию механизмов возникновения позицион-

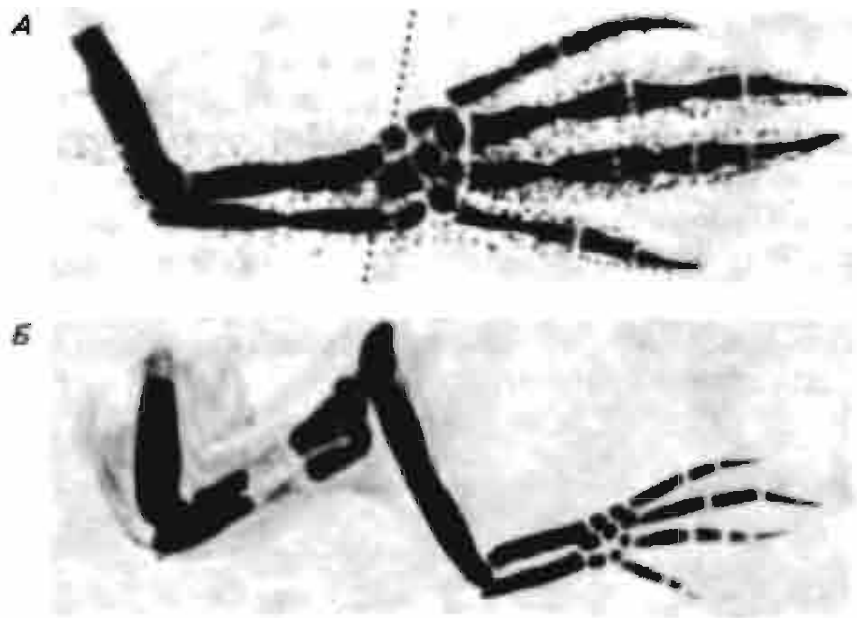


Рис. 17.23. Действие витамина А на регенерирующую конечность хвостатой амфибии. *А*. Нормально регенерирующая конечность аксолотля (×9) с плечевой, локтевой и лучевой костями, а также костями запястья и пальцев. Пунктирной линией обозначен уровень ампутации. *Б*. Регенерация после ампутации на уровне костей запястья в случае помещения бластемы конечности в пальмитат ретинола на 15 сут. Сформировались новая плечевая, локтевая и лучевая кости, а также набор костей запястья и пальцев (×5). (Из Maden, 1982; фотография с любезного разрешения M. Maden.)

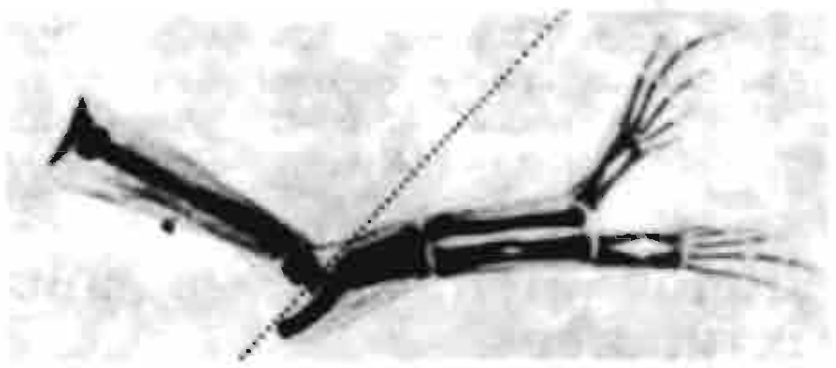


Рис. 17.24. Регенерация полной конечности и дополнительных структур в зеркальном отражении в результате инкубирования регенерирующей конечности лягушки в пальмитате ретинола в течение 6–9 сут. (Пунктиром обозначено место ампутации.) (Из Maden, 1984; фотография с любезного разрешения M. Maden.)

ной информации. Хотя эти механизмы все еще достаточно туманны, исследования, проводимые в лаборатории Дэвида Стокума (см. обзор Stocum, 1986)[1], свидетельствуют о том, что ретиноиды изменяют адгезивность поверхности клеток бластемы. В экспериментах по рассортировке клеток как in vitro, так и in vivo было продемонстрировано (Nardi, Stocum, 1983; Crowford, Stocum, в печати) существование проксимодистального градиента клеток регенерационной бластемы конечности у хвостатых амфибий. В случае нормально регенерирующих конечностей клетки бластем приобретают адгезивность в зависимости от уровня, на котором произведена ампутация (гл. 15). Однако после воздействия ретиноидами все бластемы ведут себя так, как если бы они были бластемами плеча. Например, при пересадке бластем запястья, на которые воздействовали ретинолом, на бластему ампутированной задней конечности эти бластемы запястья, как и бластемы плеча, регенерируют всю переднюю конечность целиком. Эти данные свидетельствуют о том, что ретиноевая кислота, очевидно, модифицирует поверхности клеток бластемы регенерирующей конечности.

Спецификация скелета конечности реакционно-диффузионными процессами

Как бы ни была удобна градиентная модель для объяснения формирования пространственной организации конечности позвоночных, она не охватывает всех сторон этого явления. Модель градиента морфогена не объясняет, каким образом одни клетки конечности становятся хрящевыми, а другие, расположенные на равном расстоянии от источника морфогена, дают начало фибробластам соединительной ткани. Другими словами, градиентная модель допускает, что еще до начала становления пространственной организации конечности имеет место некоторая детерминация клеток, дающих либо линию хондроцитов, либо линию фибробластов. Более того, при трансплантации дополнительной ЗПА на передний край почки конечности вторая плечевая кость не формируется, чего следовало бы ожидать в соответствии с градиентной моделью ЗПА (Wolpert, Hornbruch, 1987).

Стюарт Ньюмен (Newman, 1988; Newman, Frisch, 1979) предложил модель, объясняющую, как в изначально однородной популяции мезенхимных клеток происходит прогрессивная детерминация линий хрящевых клеток и фибробластов. Согласно этой модели, более важное значение имеет не ЗПА, а зона

[1] См. также обзор более поздних данных: Д. Л. Стокум, В. И. Миташов. «Онтогенез», **21**, № 1, 1990. – *Прим. перев.*

прогресса. Мезенхимные клетки почки конечности происходят из двух разных источников. С помощью химер перепел–курица (Christ et al., 1977; Chevallier et al., 1977) и специфических для той или иной линии моноклональных антител (George-Weinstein et al., 1988) было показано, что клетки-предшественники хряща и фибробластов возникают из соматоплевры, тогда как мышечные клетки-предшественники по своему происхождению связаны с сомитами. Таким образом, *мышечные клетки детерминированы еще* до развития конечности. Однако не известно, какие клетки станут хондроцитами, а какие – фибробластами. Формирование хряща начинается в проксимальной области и заканчивается в области пальцев (рис. 17.25). Ему предшествует конденсация клеток мезенхимы с образованием плотных скоплений. Конденсация, возможно, опосредована фибронектином, присутствие которого выявляется в местах, совпадающих с конденсацией. Фибронектин способствует формированию клеточных скоплений, по-видимому, путем связывания протеогликанов на соседних клеточных поверхностях (Frenz et al., 1989). В мезенхимных клетках, образующих скопления, повышается уровень цАМФ, что сопровождается модификацией белков хроматина и транскрипцией новых хрящ-специфических мРНК. Вскоре после этого начинается и секреция специфических для *хряща молекул внеклеточного матрикса* (Solursh, 1984; Newman, 1988).

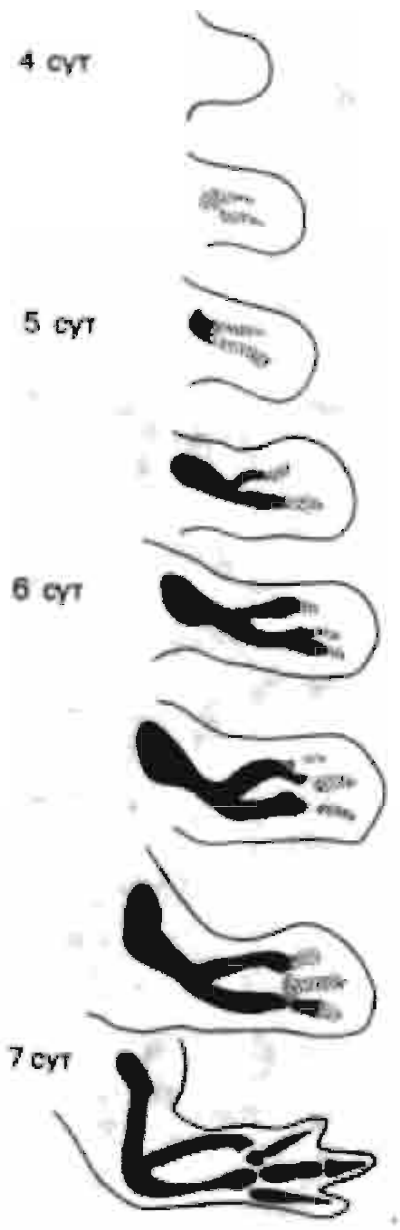


Рис. 17.25. Хрящевые конденсации в почке крыла куриного зародыша между 4 и 7 сутками развития. Точками обозначены новые области конденсации клеток мезенхимы; зачерненные области представляют дефинитивный хрящ. Видно, что формированию хряща предшествует скопление мезенхимных клеток, возникающее примерно за 12 ч до появления хряща. (Из Newman, 1988.)

Но какие клетки должны формировать эти предхрящевые скопления, а какие нет? Простая градиентная модель в данном случае не подходит. Почему, например, для плеча образуется одно скопление хрящевых клеток в наиболее проксимальной области, за ней следуют два скопления для лучевой и локтевой костей в средней части конечности и, наконец, для формирования пальцев – целый набор скоплений? Алан Тьюринг (Turing, 1952) – один из основателей компьютерной теории (математик, расшифровавший немецкий код "Enigma" во время второй мировой войны) предложил модель, объясняющую возникновение стабильного гетерогенного паттерна в растворе двух веществ, взаимодействие которых друг с другом формирует из хаоса упорядоченные структуры.

В реакционно-диффузионной модели Тьюринг описал поведение двух веществ, одно из которых, S, ингибирует продукцию другого – P. Вещество P способно к автокатализу и катализу вещества S. Если вещество S диффундирует быстрее P, то в соответствии с уравнением Тьюринга концентрация вещества P будет представлять собой волнообразную кривую с резкими пиками (рис. 17.26). Подобные волны можно наблюдать в некоторых химических реакциях (Prigogine, Nicolis, 1967; Winfree, 1974), причем они распространяются в трех измерениях (рис. 17.27; Welsh et al., 1983).

Реакционно-диффузионная модель предсказывает для некоторых веществ чередование областей высокой и низкой концентрации. Когда концентрация такого вещества превысит пороговый уровень, клетка (или группа клеток) получает инструкции к дифференцировке в определенном направлении. Важной особенностью модели Тьюринга является увеличение амплитуды волн одного химического вещества при подавлении волн другого. Увеличение локальной концентрации P приводит к формированию в том же месте пика концентрации S, однако вследствие быстрой диффузии S он может быть описан более пологой кривой. Локальное увеличение S ингибирует формирование других пиков P. Но какие из многочисленных пиков P будут сохраняться? Это зависит от размеров и формы ткани, в которой распространяются волны. (Описанный

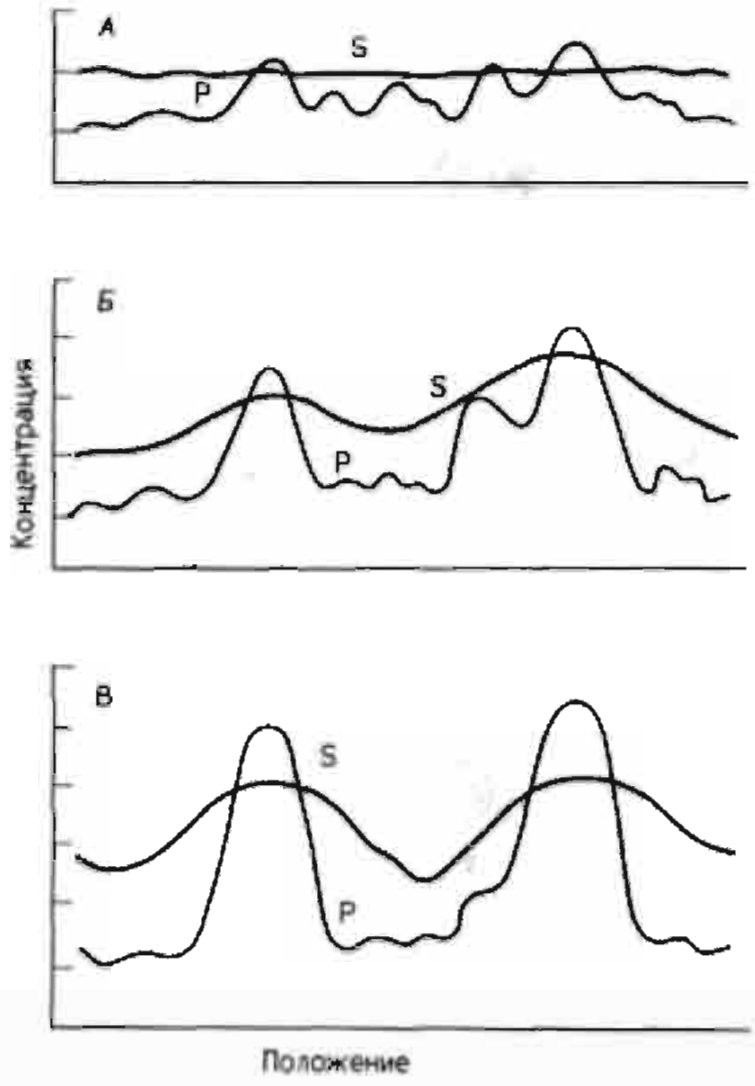


Рис. 17.26. Возникновение периодической пространственной гетерогенности в реакционной смеси веществ S и P при условии, что S ингибирует P, P катализирует образование как S, так и P, а S диффундирует быстрее P. *А*. Исходно неструктурированное распределение начинает быстро флуктуировать. *Б*, *В*. Локальное увеличение концентрации P вызывает усиленный синтез S, которое ингибирует появление других близлежащих пиков P. В результате возникает серия устойчивых пиков вещества P, расположенных через определенные интервалы (стоячая волна).

процесс аналогичен гармонике вибрирующих струн, как, например, у гитары, где разрешаются лишь определенные резонансные вибрации, определяемые длиной струны.)

Математическое описание того, какие волны отбираются при определенной длине, представлено сложными многочленами, называемыми **функциями Бесселя**. С помощью этих уравнений (Newman, Frisch, 1979; Oster et al., 1988) мы можем предсказать, что размер исходной почки конечности позволит образоваться только одному такому пику – и, следовательно, только одному хрящевому скоплению (рис. 17.28). Однако по мере роста почки конечности наступит момент, когда в размеры почки уместятся две волны. В результате из гомогенной мезенхимной ткани возникнут два хрящевых зачатка. Продолжение роста вдоль проксимодистальной оси и дальнейшее увеличение размеров приведет к тому, что в этой области смогут уложиться несколько полных волн диффундирующих соединений и, таким образом, возникнут условия для закладки пальцев.

В соответствии с реакционно-диффузионной гипотезой хрящевые агрегаты активно включают все больше клеток из своего окружения и ингибируют латерально формирование других очагов конденсации. Число таких очагов, следовательно, определяется геометрией ткани и силой латерального ингибирования. Если интенсивность ингибирования остается на одном и том же уровне, то объем ткани должен возрастать, с тем чтобы там, где раньше допускался лишь один очаг, теперь могли сформироваться два. Реакционно-диффузионная модель позволяет предсказать, что небольшое изменение размеров дистальной почки конечности приведет к изменению числа пальцев. Такие факты и в самом деле наблюдались и, возможно, представляют собой наиболее простой путь приобретения или утраты пальцев в эволюции (см. гл. 23). Подобные стабильные волны создают **пространственную предорганизацию** (предпаттерн) конечности. Реакционно-диффузионный механизм не исключает наличие предлокализованных морфогенов или градиентов (чему есть надежные свидетельства), поскольку он может существовать в качестве самостоятельного

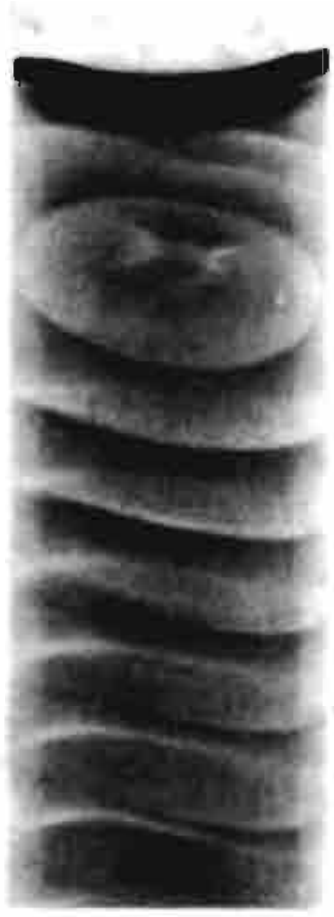


Рис. 17.27. Фотография пробирки диаметром 10 мм со стоячими волнами, возникающими в исходно гомогенной реакционной среде при окислении яблочной кислоты броматом в присутствии ионов церия. Волны выявлены с помощью красителя ферроина на уровне церий$^{3+}$/церий$^{4+}$. (Из Welsh et al., 1983.)

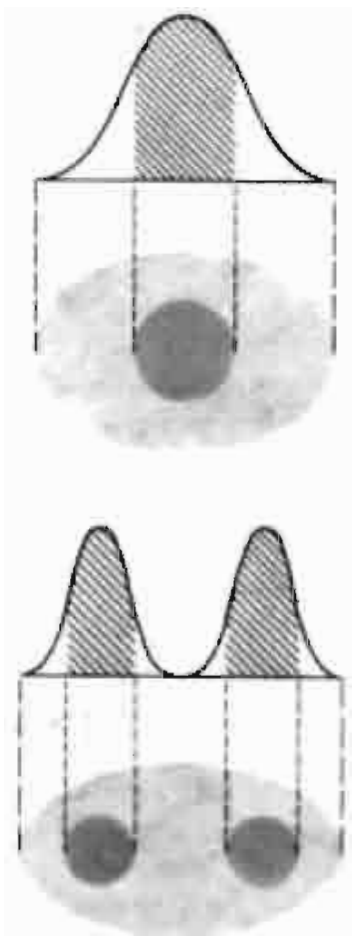


Рис. 17.28. Число стоячих волн, укладывающихся в данной области, зависит от размеров этой области. По мере ее роста создаются условия, позволяющие укладываться в ней возможно большему числу полных длин волн. *А*. Когда поперечный срез конечности вмещает единственную волну, возникает одна конденсация. *Б*. Если форма домена изменяется так, что в его поперечном сечении укладываются две полные длины волны, то возникают две конденсации. (По Oster et al., 1988.)

морфогенетического механизма, обусловливающего структуру зародыша.

Молекула, формирующая эти стоячие волны (и, следовательно, ответственная за организацию предхрящевых скоплений), пока не идентифицирована. Ньюмен и др. (Newman et al., 1988) полагают, что здесь может участвовать трансформирующий фактор роста β (ТФР-β). Известно, что этот белок стимулирует свой собственный синтез. Кроме того, имеются данные о том, что он стимулирует образование фибронектина, объединяющего клетки. Реакционно-диффузионная модель и модель ЗПА не исключают друг друга; возможно, функционирование обеих обеспечивает позиционную информацию, необходимую для создания такого сложного органа, как конечность. Создание или поддержание полярности конечности могут обеспечивать другие механизмы, ответственные за формирование пространственной организации (например, модель полярных координат).

Формирование пространственной организации в нервной системе

До сих пор мы обсуждали относительно простые проблемы, связанные с формированием пространственной организации, а именно регенерацию у гидр или развитие почки конечности у куриного зародыша. Эти проблемы, возможно, будут решены еще при нашей жизни. Теперь перейдем к рассмотрению данных проблем применительно к нервной системе. Из всех известных материальных структур наиболее упорядоченной является человеческий мозг. В большинстве тканей любая клетка может взаимодействовать определенным образом не более чем с дюжиной соседних клеток, что же касается нейрона, то он обладает способностью специфически взаимодействовать с тысячами подобных клеток. В мозге человека насчитывается более 10^{12} нейронов, и любой крупный нейрон (такой, как клетка Пуркинье или мотонейрон) может получать импульсы от более чем 10^5 других клеток, образуя в то же время связи с приблизительно тысячей клеток (Gershon et al., 1985). Эта сложность – одна из причин того, что человеческий мозг, как и мозг других позвоночных, до сих пор изучен довольно плохо. Бóльшая часть наших знаний о нервной системе основана на исследованиях нервной системы беспозвоночных, у которых она состоит из небольшого числа крупных, легко идентифицируемых нейронов.

Функционирование мозга позвоночных зависит не только от дифференцировки и положения нервных клеток, но и от специфических связей, устанавливаемых этими клетками между собой. Иными словами, нервы, отходящие от любого сенсорного органа, например глаза, должны устанавливать связи с особыми нейронами мозга, способными интерпретировать зрительные стимулы, и аксоны нервной системы должны пересекать большие пространства, занятые другими тканями, прежде чем иннервировать соответствующую ткань-мишень. Каким образом аксон нейрона «знает», что ему следует мигрировать многочисленные потенциальные клетки-мишени, чтобы установить свою специфическую связь? Харрисон (Harrison, 1910) продемонстрировал, что специфичность роста аксонов является следствием наличия **пионерских нервных волокон**, которые идут впереди других аксонов и выполняют роль гидов. Это наблюдение упрощает, но не решает проблему формирования нейронами определенной картины взаимных связей. Харрисон заметил, однако, что нейроны должны расти по плотному субстрату, и предположил, что различия между эмбриональными поверхностями должны обусловливать миграцию нейронов в нужных направлениях. Окончательные связи устанавливались бы в результате

комплементарных взаимодействий клеточных поверхностей.

«О необходимости некоего взаимодействия поверхности каждой разновидности нервного волокна и иннервируемой им периферической структуры свидетельствует тот факт, что чувствительные и двигательные нейроны, идущие рядом в одном и том же пучке, тем не менее формируют соответствующие периферические связи: один – с эпидермисом, другой – с мышцей... Приведенные выше факты позволяют предположить, что здесь должна быть определенная аналогия с объединением яйца и спермия».

Блестящие экспериментальные работы и гипотезы Харрисона заложили основу для изучения пространственной организации нейронов, так же, как другие его исследования послужили отправным пунктом наших знаний о формировании пространственной организации конечности.

Механизм направленного роста аксонов

ГИПОТЕЗА КОНТАКТНОГО ОРИЕНТИРОВАНИЯ. Одна из первых гипотез, предложенная для объяснения специфичности роста аксонов, включала представления о **контактном ориентировании (стереотропизме)**. Согласно этой гипотезе, рост аксона направляют физические свойства субстрата. Используя предложенную Харрисоном методику роста аксонов на кровяном сгустке, Вейс (Weiss, 1955) отметил, что растущие аксоны не только нуждаются в твердом субстрате, по которому мигрируют, но что миграция зависит и от топографии субстрата. Если волокна кровяного сгустка ориентированы беспорядочно, то и аксоны растут неупорядоченно. Но если волокна кровяного сгустка идут параллельно в результате натяжения поверхности сгустка, то аксоны нейронов мигрируют вдоль этих волокон, не отклоняясь от их направления (см. рис. 15.14). Это свидетельствует о том, что в контактном ориентировании участвуют физические факторы. Сингер и др. (Singer et al., 1979) получили данные, согласно которым подобные физические факторы действуют и in vivo. Эти авторы обнаружили между эпендимными клетками развивающегося спинного мозга тритона обширные каналы, по которым мигрируют растущие аксоны. Было высказано предположение, что эти каналы обусловливают ориентированный рост аксонов к соответствующим областям мозга. Клеточные каналы описаны и в сетчатке мыши (Silver, Sidman, 1980); очевидно, они направляют аксоны ганглиозных клеток сетчатки в глазной стебелек во время своего развития.

ГИПОТЕЗА МЕЧЕНЫХ ПУТЕЙ. У *Drosophila*, кузнечиков и *Caenorhabditis* (и, по-видимому, у большинства беспозвоночных) движение аксонов является удивительно точным процессом. В эмбриональной эктодерме насекомых содержатся кластеры клеток, которые становятся либо эпидермальными, либо нервными тканями. Эксперименты с использованием лазерного излучения для избирательного удаления клеток (Taghert et al., 1984) продемонстрировали, что выбор направления дифференцировки (т. е. станут ли клетки нервными или эпидермальными) зависит от взаимодействий клетка–клетка в пределах этих кластеров, и после того как выбор сделан, предшественники нервных клеток претерпевают серию делений, дающих в результате семейство нейронов.

Например, в каждом сегменте кузнечика возникает 61 нейробласт (30 с каждой стороны и 1 в центре). Остальная эктодерма формирует эпидермис. Один кластер эктодермальных клеток отвечает за образование нейробласта 7-4 (рис. 17.29). Если лазерным лучом разрушить весь кластер, то нейробласт 7-4 не сформируется. Если же, однако, избирательно уничтожить клетку увеличенных размеров, готовящуюся к формированию этого нейробласта, то ее место будет занято соседней клеткой, которая и даст нейробласт 7-4.

Нейробласт 7-4 – стволовая клетка; она дает начало семейству из шести нейронов, обозначаемых как C, G, Q1, Q2, Q5 и Q6. Это семейство нейронов представлено на рис. 17.29 (на одной из сторон обложки они обозначены желтым цветом). Конусы роста этих нейронов достигают своих мишеней, следуя по специфическим путям, проложенным другими, предшествующими нейронами. Q1 и Q2 сначала идут вместе прямым путем, минуя многочисленные клетки, пока не встретят аксон нейрона-предшественника из дорсальной средней линии (dMP2), который они будут сопровождать назад. Другие четыре нейрона из семейства 7-4 мигрируют через аксон dMP так, будто его не существует. Аксоны нейронов C и G долго идут вместе; в конце концов C присоединяется к нервам X1 и X2 и сопровождает их к задней части сегмента, тогда как G прилипает к аксонам P1 и P2 (идущим назад) и движется вперед по их поверхностям (Goodman et al., 1984).

Конус роста G по мере своего продвижения встретится более чем с сотней различных поверхностей, к которым он мог бы прилипнуть, но его адгезионная способность специфична лишь в отношении нейронов P. Если нейроны P убить лазером, то в поведении конуса роста G появятся аномалии: его филоподии будут совершать беспорядочные поисковые движения, пытаясь найти подходящую поверхность для миграции. Если же разрушить любой другой из 100 или более аксонов, то на поведении конуса роста G это не скажется.

Теоретическое объяснение механизма, с по-

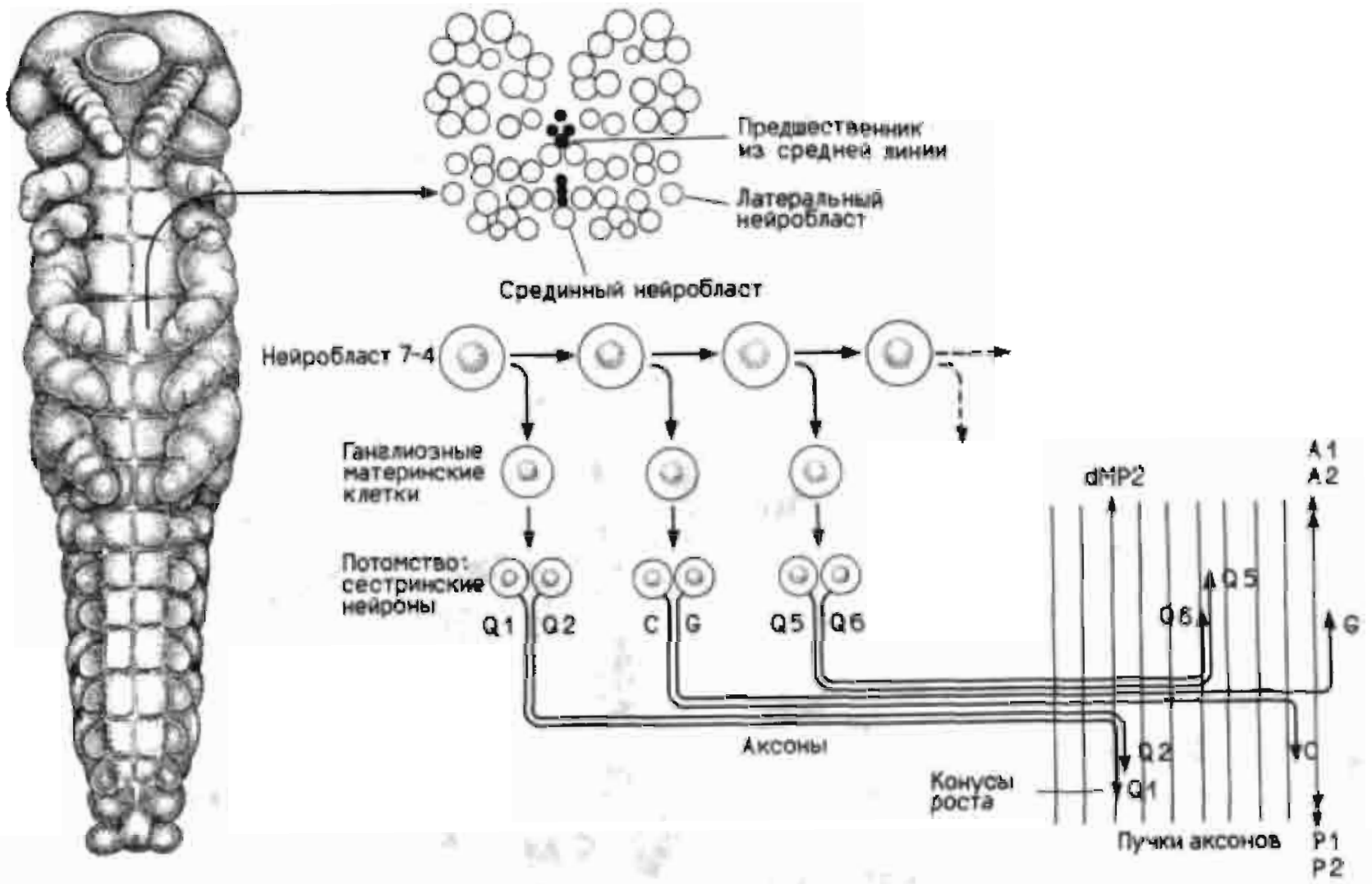


Рис. 17.29. Каждый из 17 сегментов раннего зародыша кузнечика характеризуется одинаковым набором и расположением нейробластов. С каждой стороны располагается по 30 латеральных нейробластов, 1 срединный нейробласт и 7 предшественников нейронов средней линии. Эти последние делятся один раз, тогда как латеральные нейробласты, служащие стволовыми клетками, осуществляют ряд повторных делений, формируя «материнские ганглиозные клетки». Каждая материнская ганглиозная клетка делится один раз, давая начало двум сестринским нейронам. Представленный здесь нейробласт 7–4 образует потомство примерно из 100 нервных клеток, первые шесть поколений которых приведены на схеме. (По Goodman, Bastiani, 1984.)

мощью которого аксоны насекомых ищут пути для своего роста, получило название **гипотезы меченых путей**, так как в ее основе лежит представление о том, что любой данный нейрон способен специфически узнавать поверхность другого нейрона, уже проложившего свой путь впереди него. Подтверждение этой специфичности было получено с помощью моноклональных антител (Bastiani et al., 1987). Нейроны aCC и pCC представляют собой *сестринские нейроны* (*оба происходят от нейробласта* 3-1), имеющие совершенно различную судьбу. Кроме того, к каждому из них прилипают разные наборы аксонов, формирующие независимые пучки. При обработке нейронов 10-дневных зародышей моноклональными антителами было обнаружено, что они специфически связываются с веществом, присутствующим на двух нейронах aCC каждого сегмента, но не связываются с нейронами pCC. К 11-му часу, однако, эту поверхностную молекулу начинают экспрессировать другие нейроны (но не pCC). Это именно те нейроны (RP1, RP2, U1, U2), которые образуют пучки с aCC.

Исследования на позвоночных намного отстают от исследований, выполненных на насекомых, но последние данные, полученные для двигательных нейронов рыбы данио, свидетельствуют о том, что и здесь могут функционировать меченые пути. Эйзен и др. (Eisen et al., 1986) наблюдали удлинение аксонов трех эмбриональных нейронов. Покинув спинной мозг, они следуют по одному и тому же пути вдоль мышцы, пока не достигнут нужного места в зародыше. От этой точки их пути расходятся по трем направлениям.

ГИПОТЕЗА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ. Модели меченых путей при всей их важности не могут объяснить проблемы в целом. Что, например, заставляет нейрон G мигрировать вперед по поверхности аксонов P1 и P2, которые сами мигрируют к задней части сегмента? Каким образом аксон узнает о необходимости сделать поворот и откуда первые аксоны получают инструкции о том, что они должны стать опорой для следующих за ними? Одна из гипотез, с помощью которой пытаются найти ответ на эти вопросы,– **гипотеза дифференциальной**

адгезивной специфичности (гаптотаксиса). Согласно этой модели, вдоль пути аксона существуют градиенты адгезивности, о которых уже шла речь (гл. 15) в связи с объяснением миграции ткани протока пронефроса.

Конусам роста часто приходится мигрировать по внеклеточному матриксу, и молекулы внеклеточного матрикса весьма существенно влияют на рост аксона. Так, например, ткань нейральной сетчатки не будет посылать аксоны по поверхности пластмассовой культуральной чашки. Если же поверхность такой чашки покрыть фибронектином или

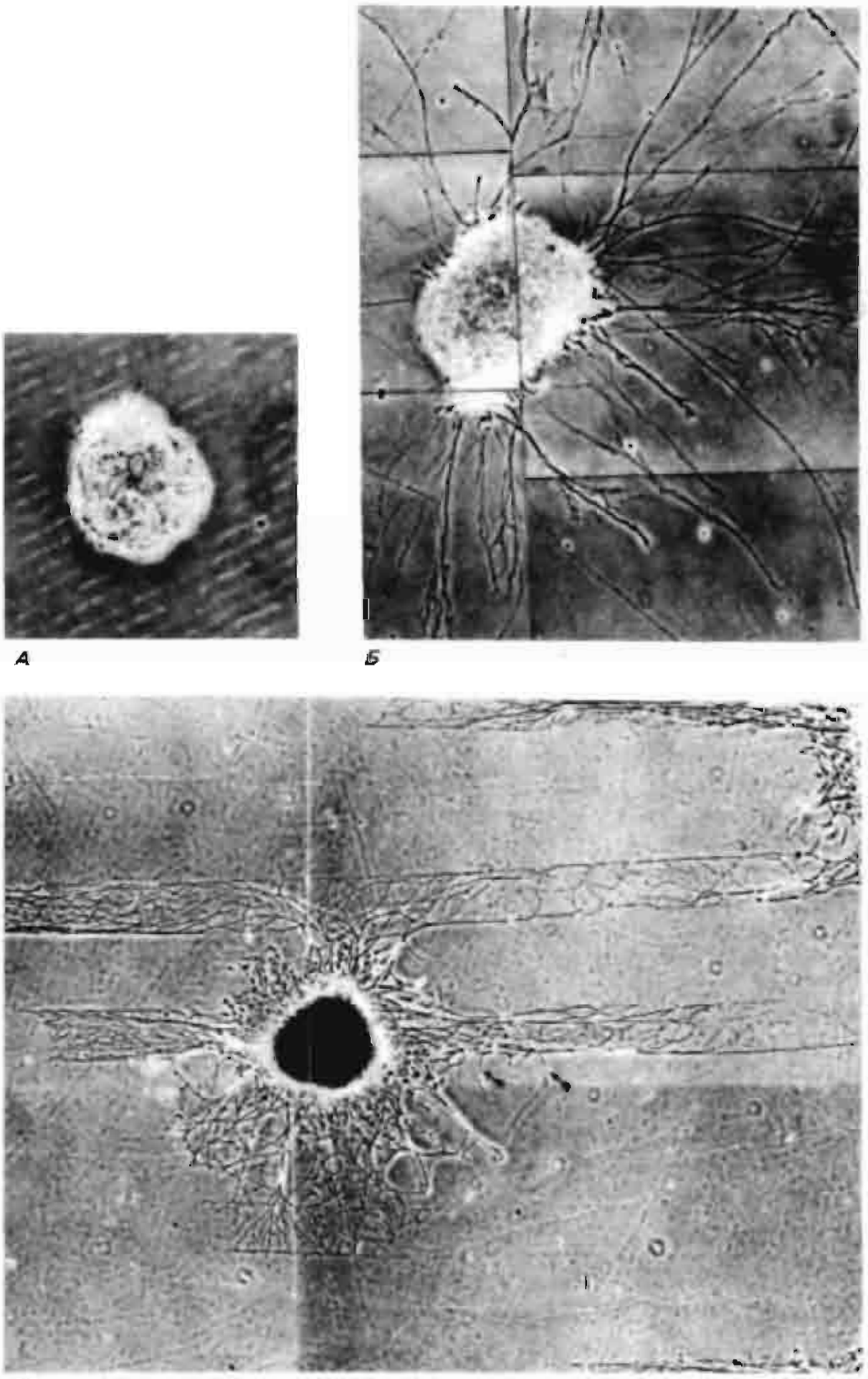
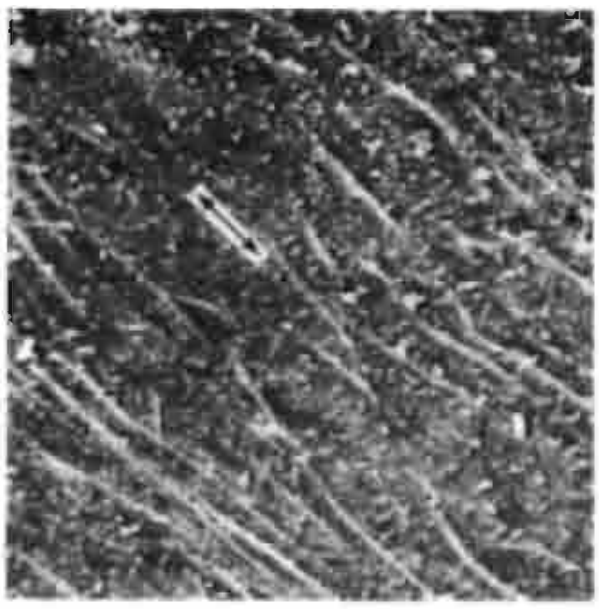


Рис. 17.30. Действие субстратов и растворимых факторов на формирование нервных отростков. *А*, *Б*. Действие фибронектина на образование аксонных отростков у агрегатов нейральной сетчатки. Агрегат, представленный на *А*, в течение 36 ч культивировали на необработанной поверхности пластика. Агрегат, представленный на *Б*, культивировали на пластике, обработанном раствором фибронектина в концентрации 50 мкг · мл$^{-1}$. *В*. Рост чувствительных аксонов на структурированном субстрате, состоящем из параллельных полос ламинина, нанесенного на слой коллагена типа IV. (*А*, *Б*—из Akers et al., 1981; *В*—из Gundersen, 1987. Фотографии с любезного разрешения J. Lilien, R. W. Gundersen.)



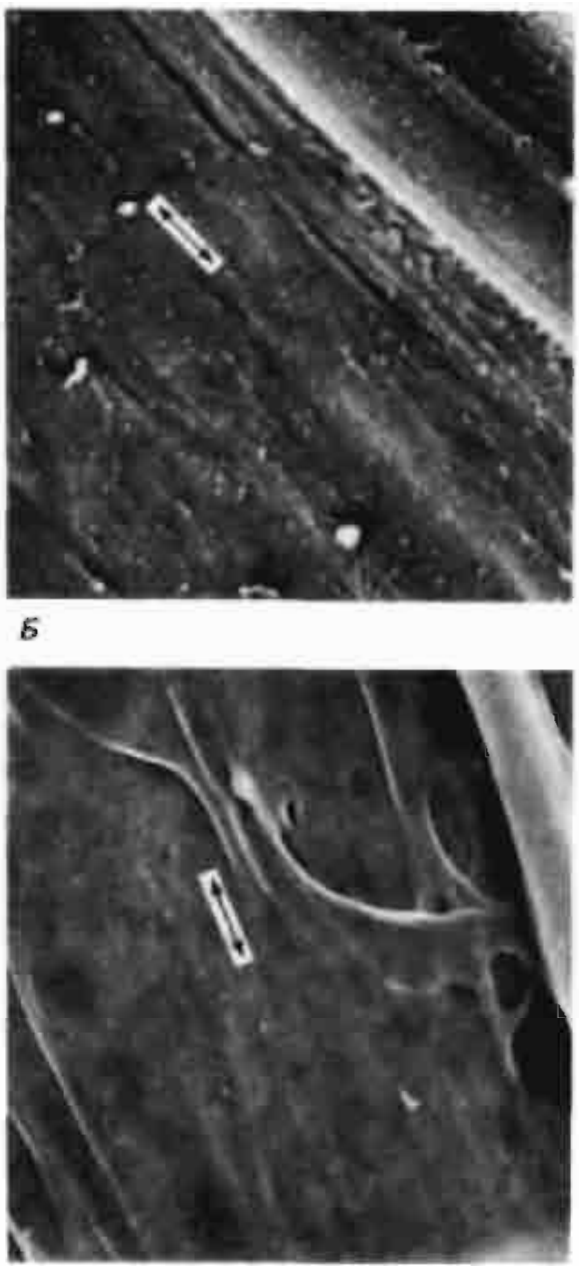


Рис. 17.31. Градиент фибрилл внеклеточного матрикса в развивающемся крыле бабочки *Manduca sexta*. Обоюдоострые стрелки обозначают проксимодистальную ось. Микрофотографии трех участков крыла, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа заимствованы из работы Nardi, 1983 (с любезного разрешения этого автора.)

ламинином, то клетки начинают посылать длинные аксонные выросты. Присутствие таких молекул может обозначить пути миграции по зародышу (рис. 17.30) (Akers et al., 1981; Gundersen, 1987). И напротив, гликозаминогликаны – другой набор молекул, связанных с внеклеточным матриксом, – может препятствовать образованию нервных отростков (Tosney, Landmesser, 1985). Таким образом, аксон, оказавшись перед выбором двух альтернативных поверхностей, должен отдать предпочтение одной из них.

Вывод о наличии адгезионного градиента этого типа был сделан на основе изучения некоторых миграций аксонов у насекомых. Нарди (Nardi, 1983) наблюдал, что отростки чувствительных нейронов, расположенных в области верхушки крыла куколки бабочки, растут к центральной нервной системе в тесной связи с внеклеточным матриксом лежащего выше эпителиального слоя. Поместив трансплантаты вдоль пути развития аксона, Нарди обнаружил, что нейроны более плотно присоединяются к проксимальной ткани (ткани, расположенной ближе к центральной нервной системе), чем к дистальной. На микрофотографиях внеклеточного матрикса, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа, видно, что матрикс вдоль этого пути изменяется. По мере приближения к центральной нервной системе он становится все более «шишковатым» и фибриллярным (рис. 17.31). Другими авторами (Berlot, Goodman, 1984) также были получены данные о том, что чувствительные нейроны кузнечика, появляющиеся в антенне, растут по направлению к центральной нервной системе, очевидно следуя градиенту адгезивности.

ГИПОТЕЗА ХЕМОТАКСИСА. Рост аксонов от ганглия к ткани-мишени может направляться растворимыми молекулами, источником которых служит сама мишень. Предполагается, что конус роста аксона мигрирует по градиенту концентрации этих молекул (хемотаксис). В пользу этой точки зрения свидетельствуют результаты опытов по подсадке ганглиев вблизи различных потенциальных тканей-мишеней, но так, чтобы они не касались этих тканей. Лумсден и Дэвис (Lumsden, Davies, 1983, 1986) вырезали у мышиных зародышей тройничные ганглии чувствительных нейронов до того, как устанав-

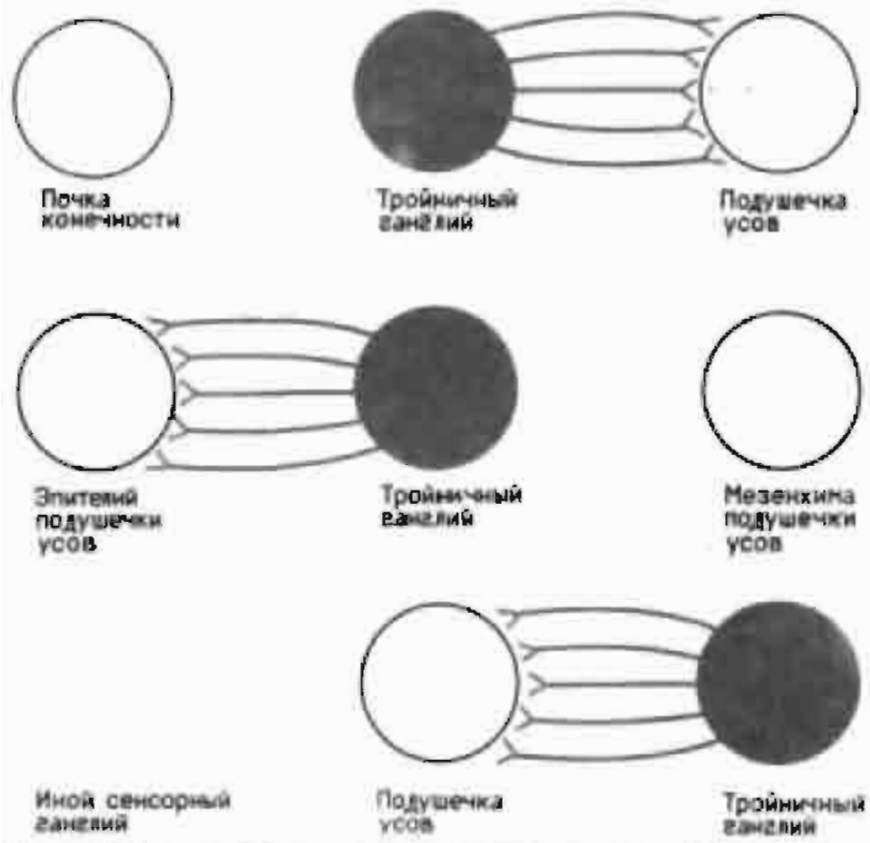


Рис. 17.32. Суммарная схема экспериментов Лумсдена и Дэвиса, продемонстрировавших хемотаксис между нервной тканью (тройничный ганглий) и ее мишенью (область иннервации вибрисс, или «усов»). Хемотаксис специфичен в отношении мишени (*вверху*) и эпителиальных клеток мишени (*в середине*). Кроме того, хемотактическое привлечение областью вибрисс является специфичным для нейронов ганглия тройничного нерва (*внизу*).

ливался контакт нейронов с их нормальными мишенями – подушечками вибрисс (усов). Будучи помещены вблизи различных потенциальных мишеней в условиях культуры, тройничные нейроны мигрируют только к ткани подушечек усов. А если их культивировать между эпителиальной и мезенхимной тканью подушечек усов, то тройничные нервы будут расти только к эпителиальной ткани этой структуры (рис. 17.32). Наилучшим образом эти данные можно было бы объяснить, постулируя секрецию эпителием подушечек усов некоего хемотактического вещества. Хемотактический рост тройничного нерва к подушечкам усов не только специфичен в отношении мишени, но и в отношении нейронов. Ткань подушечек усов не привлекает аксоны, идущие от других чувствительных ганглиев.

Хемотаксис характеризуется временны́ми параметрами. Было обнаружено (Pollack, Muhlach, 1981), что миграция аксонов из спинного мозга в мезодерму незрелой конечности головастика может быть имитирована в культуре. Ранние (стадия 5) эксплантаты спинного мозга могут посылать аксоны в раннюю (стадия 5) почку конечности, но ранние эксплантаты спинного мозга не способны посылать аксоны в более поздние (стадия 15) почки конечностей (рис. 17.33). Следовательно, эксплантаты конечности, выделяя какие-то диффундирующие молекулы, привлекают растущие аксоны лишь на определенных стадиях развития.

Наиболее полно охарактеризованной молекулой нейрального хемотаксиса является **фактор роста нервов** (ФРН), представляющий собой гликопротеин, состоящий из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 13 000 дальтон. ФРН поддерживает жизнеспособность симпатических и чувствительных нейронов в процессе развития, а экзогенно введенный ФРН влияет на направление роста нервов (Angeletti, Vigneti, 1971; Levi-Montalcini, 1976; Ebendal et al., 1982). В 1989 г. Эдвардс и др. (Edvards et al., 1989) представили убедительные данные, свидетельствующие о том, что синтез клетками ФРН приводит к иннервации этих клеток. Они сконструировали плазмиду, содержащую мышиный ген ФРН, присоединенный к регуляторным элементам гена инсулина II крысы. Иначе говоря, они поместили ген ФРН под контроль факторов, ответственных за транскрипцию инсулина в β-клетках поджелудочной железы. Затем этот ген был инъецирован зародышам мыши. Наблюдения над секрецией ФРН в трансгенных мышах показали, что β-клетки их поджелудочной железы не только продуцировали большие количества ФРН, но и индуцировали отчетливо выраженную собственную иннервацию симпатическими нейронами. Действие ФРН оказалось локальным. Новые нейроны не образовывались, а иннервация происходила за счет исключительно интенсивного ветвления и направленного роста нейронов, находившихся вблизи этой области. При нормальном развитии ФРН синтезируется многочисленными тканями-мишенями, в том числе железами, подушечками на лапах и другими нейронами.

По-видимому, ФРН является как нейротропическим фактором (т.е. непосредственно влияющим на направленный рост нейронов), так и нейротрофическим фатором. Нейротрофические факторы – это соединения, необходимые для обеспечения жизнеспособности нейронов. В ходе нормального развития центральной и периферической нервной системы наблюдается массированная гибель нейронов (см. разд. «Дополнительные сведения и гипотезы» на стр. 124). Удаление ткани-мишени часто вызывает гибель нейронов из-за недостатка нейротрофических факторов, при этом, очевидно, происходит конкуренция между нейронами за небольшое количество факторов, секретируемых тканью-мишенью. В результате из многочисленных нейронов, приступивших к иннервации ткани-мишени, спустя несколько дней обычно остается лишь один. ФРН необходим для выживания симпатических и чувствительных нейронов. Воздействие на зародышей мыши антителами к ФРН снижает число тройничных нейронов и нейронов ганглиев спинных корешков до 20% от контрольного числа (Levi-Montalcini, Booker, 1960;

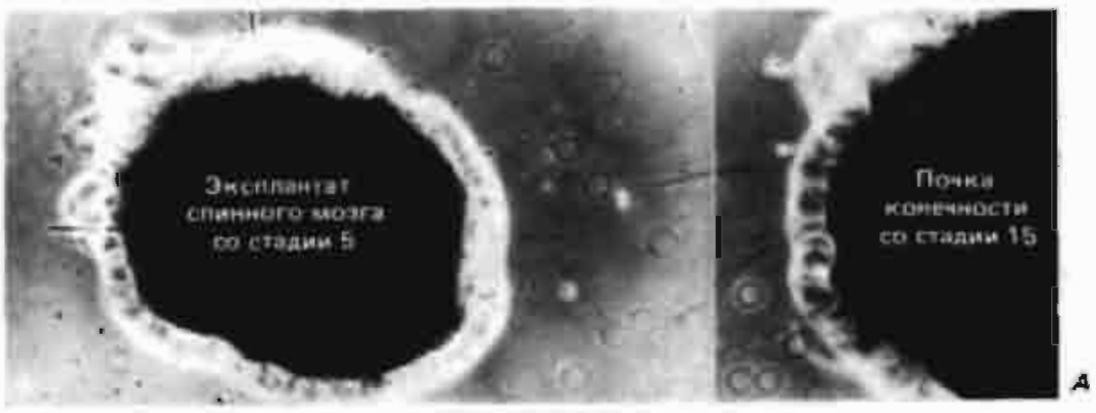


Рис. 17.33. Рост аксонов у культивируемых эксплантатов спинного мозга головастиков лягушки в зависимости от стадии развития. *А*. Ранний (стадия 5) эксплантат спинного мозга при совместном культивировании с поздней (стадия 15) почкой конечности не посылает отростков. *Б*. Рост аксонов у эксплантатов спинного мозга, взятых на стадии 5, резко усиливается при совместном культивировании с почками конечности, также находящимися на стадии 5. (Из Pollack, Muhlach, 1981; с любезного разрешения авторов.)

Pearson et al., 1983). Обнаружено, что ткани-мишени симпатических нейронов секретируют ФРН, и удаление этих тканей вызывает гибель нейронов, которые могли бы их иннервировать. Кроме того, существует хорошая корреляция между количеством секретируемого ФРН и выживаемостью нейронов, иннервирующих эти ткани (Korsching, Thoenen, 1983; Harper, Davies, 1990).

Охарактеризованы по меньшей мере два других нейротрофических белка. Эти белки – нейротрофический фактор мозга (НТФМ) и нейротрофин-3 (НТ-3) – имеют в основном ту же структуру, что и ФРН. Они, однако, способствуют выживанию нейронов, относящихся к несколько различающимся группам. Если одни нейроны могут реагировать на все три фактора, то другие отвечают либо на два, либо на один из них. Печень и скелетные мышцы синтезируют НТ-3, способный поддерживать выживание висцеральных нейронов, которые не чувствительны к ФРН. Вместе с тем ФРН может поддерживать жизнеспособность нейронов симпатических ганглиев, которые не реагируют на НТ-3 (Hohn et al., 1990; Maisonpierre et al., 1990).

Одно из интересных наблюдений касается нейромедиаторов: выделяемые одним из конусов роста нерва, они могут ингибировать или ускорять удлинение других конусов роста. Нейромедиаторы влияют на картину межнейронных связей у моллюска *Helisoma*. Секретируя серотонин, нейрон 5 не дает нейрону 19 образовывать синаптические контакты (рис. 17.34). Влияние серотонина на скорость роста аксонов этих двух нейронов показано на рис. 17.35. Не действуя на нейрон 5, серотонин способен полностью ингибировать рост аксонов нейрона 19, вызывая сокращение филоподий его конуса роста (Haydon et al., 1985; Kater, 1985).

Кроме того, нервы могут влиять на конусы роста других нейронов посредством электрической активности. Коль скоро установятся электрические потенциалы (как в нервно-мышечных соединениях), потенциал действия может приостанавливать образование аксонального отростка для других нейронов (Cohan, Kater, 1986).

МНОЖЕСТВЕННОСТЬ ПУТЕВОДНЫХ ВЕХ. Одно из наиболее загадочных явлений нейробиологии развития позвоночных касается иннервации мышц конечности. Аксональные выросты двигательных нейронов появляются в развитии очень редко, до того как тела этих нейронов мигрируют к своим дефинитивным ганглиям, а мезенхима конденсируется в мышцы. Эта стадия иллюстрирована на рис. 16.29, *Б*. Таким образом, во время иннервации конечности

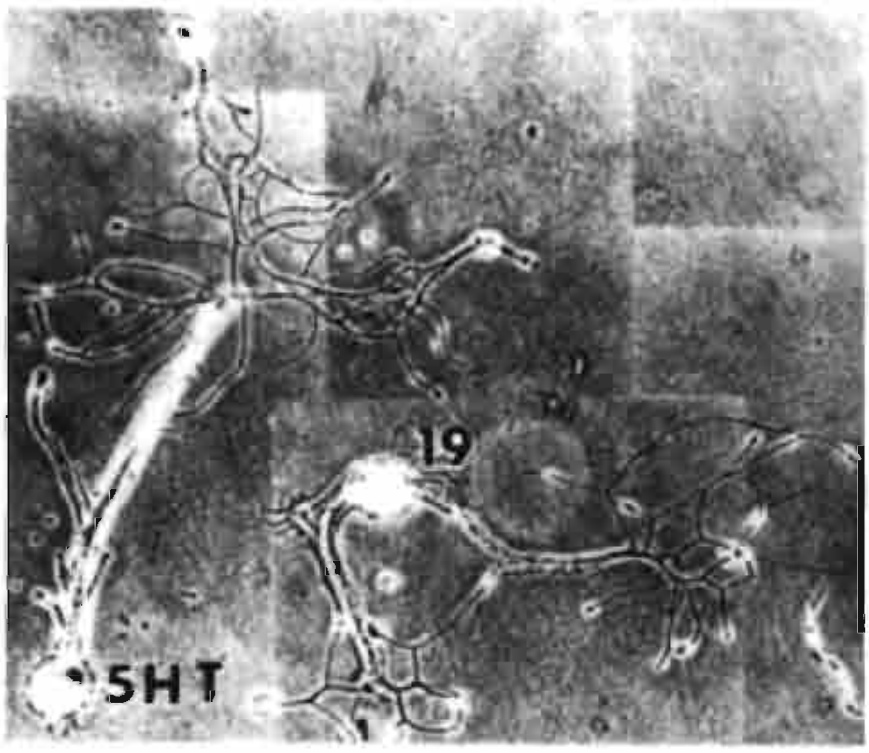


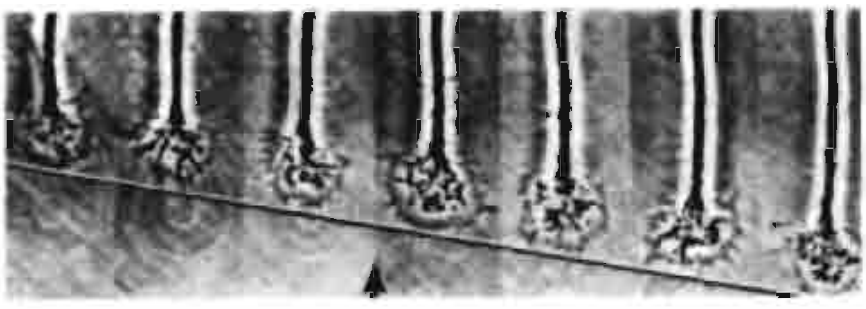
Рис. 17.34. Особенности роста нервных отростков. Конусы роста нейрона 19 отклоняются от выделяющего серотонин нейрона 5 (5HT) при совместном культивировании этих двух нейронов *Heliosoma*. При совместном культивировании двух других нейронов (например, двух нейронов 19) наблюдается их сближение в результате взаимного привлечения (не показано). (Из Kater, 1985; фотография с любезного разрешения S. B. Kater.)

аксонами ни нейроны, ни их мишени, ни пути миграции не представляются достаточно определенными (Hollyday, 1980; Landmesser, 1978). И тем не менее они очень хорошо определены в другом отношении. Если направить в конечность нейроны из другого источника (другого ганглия), то характер ветвления этих нейронов будет нормальным. Иными словами, конечность способна диктовать характер иннервации набору аксонов, в норме конечность не иннервирующих (Hamburger, 1939; Hollyday, et al., 1977). Более того, если перевернуть сегменты спинного мозга цыпленка так, что двигательные нейроны займут новые положения, то их аксоны все равно найдут нужные мишени (рис. 17.36) (Lance-Jones, Landsmesser, 1980). В то же время, если сконструировать конечности таким образом, что они будут иметь дуплицированные области (например, два бедра), то нейронами, иннервирующими второе бедро, будут не специфические «нейроны бедра», а нейроны, которые обычно иннервируют мышцы голени (Whitelaw, Hollyday, 1983). Результаты этих экспериментов представляют собой парадокс, не разрешенный до сих пор (Purves, Lichtman, 1985): «Нейроны обязаны расти к своим специфическим мишеням, однако аксоны из различных источников двигательных нейронов могут заменять друг друга при установлении нормальной картины иннервации». Наиболее приемлемым объяснением служит допущение одновременного действия множественных механизмов, которые обеспечивают рост аксонов к соответствующим местам.

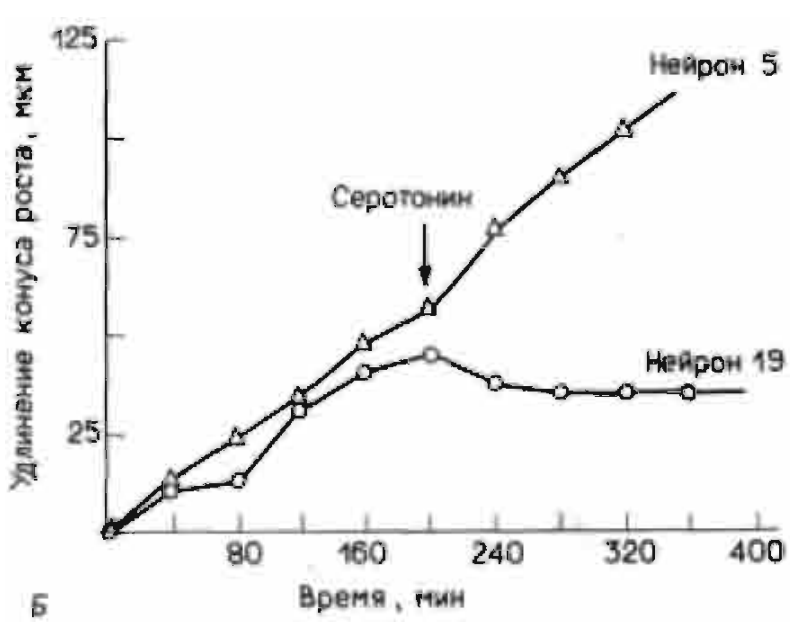
Идея множественности путеводных вех привлекается и для объяснения того, каким образом индивидуальные нейроны сетчатки зародышей *Xenopus laevis* могут посылать аксоны в нужную область мозга, будучи трансплантированы на расстоянии от зрительного нерва (Harris, 1986). Это свойство заставляет полагать, что путеводные вехи распределены не только вдоль нормальных путей, но существуют по всему мозгу зародыша. Ориентировка роста аксона у зародыша от тела нервной клетки к месту назначения представляет собой сложный процесс, и Шпеман (Spemann, 1938), очевидно, прав, предположив одновременное использование нескольких различных типов вех, обеспечивающих установление правильных связей.

Механизмы синаптической специфичности

КАЧЕСТВЕННЫЕ РАЗЛИЧИЯ: ГРАДИЕНТЫ. Достижение аксоном органа-мишени еще не решает всей



А



Б

Рис. 17.35. Удлинение конуса роста нейрона 19 и нейрона 5 *Heliosoma* при культивировании их в присутствии 10^{-7} *M* серотонина. Стрелкой отмечено время внесения серотонина в культуру. Конус роста нейрона 5 (представлен на *А*) в среде с серотонином продолжает расти, тогда как филоподии аксонов нейрона 19 под действием серотонина элиминируются, а рост прекращается. (По Kater, 1985; фотография с любезного разрешения S. B. Kater.)

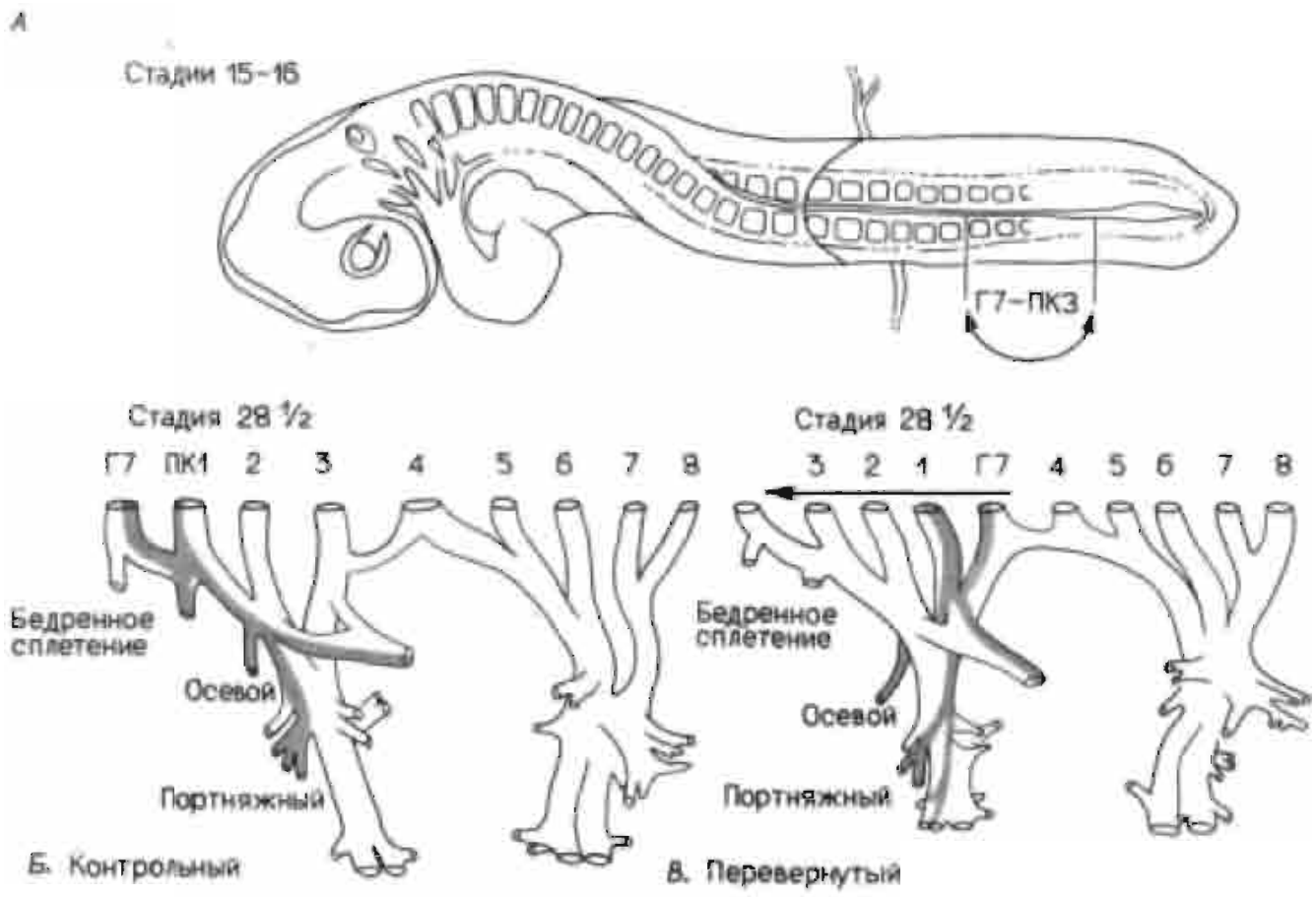


Рис. 17.36. Компенсация небольших изменений в положениях мест инициации аксонов у куриного зародыша. *А*. Участок спинного мозга, включающий сегменты Г7-ПК3 (с седьмого грудного по третий поясничио-крестцовый сегменты), перевернут у 2,5-суточного куриного зародыша. *Б*. Нормальное направление роста аксона в различные мышцы на 6 сутки. *В*. Направление роста аксонов в перевернутом сегменте. Нейроны, оказавшиеся в эктопическом положении, в конце концов находят правильные пути и иннервируют соответствующие им мышцы. (Из Lance-Jones, Landmesser, 1980.)

задачи. Смысл функционирования нервной системы заключается в ее способности формировать специфические связи между аксоном одного нейрона и другой клеткой или группой клеток. Образование таких связей называется **синаптической специфичностью** и может быть превосходно иллюстрировано примером установления связей аксонами, идущими от ганглиозных клеток сетчатки. Ганглиозные клетки сетчатки посылают аксоны, формирующие зрительный нерв. У позвоночных, за исключением млекопитающих, эти аксоны проходят обширные области мозга, не образуя ни единого соединения, и заканчиваются формированием синапсов с клетками **зрительного тектума** [1]. Каждый аксон сетчатки посылает импульсы к одному специфическому участку (клетке или небольшой группе клеток) в пределах тектума (Sperry, 1951). Как показано на рис. 17.37, в мозге имеются два зрительных тектума. Аксоны из левого глаза входят в правый зрительный тектум, а аксоны правого глаза формируют синапсы с клетками левого зрительного тектума.

Подробная карта связей сетчатки со зрительным тектумом (**ретино-тектальная проекция**) была составлена Маркусом Джекобсоном (Jacobson, 1967). Джекобсон создал эту карту, освещая узким пучком света небольшие ограниченные области сетчатки и регистрируя с помощью электрода, вживленного в тектум, возбужденные тектальные клетки. Ретино-тектальная проекция *Xenopus laevis* представлена на

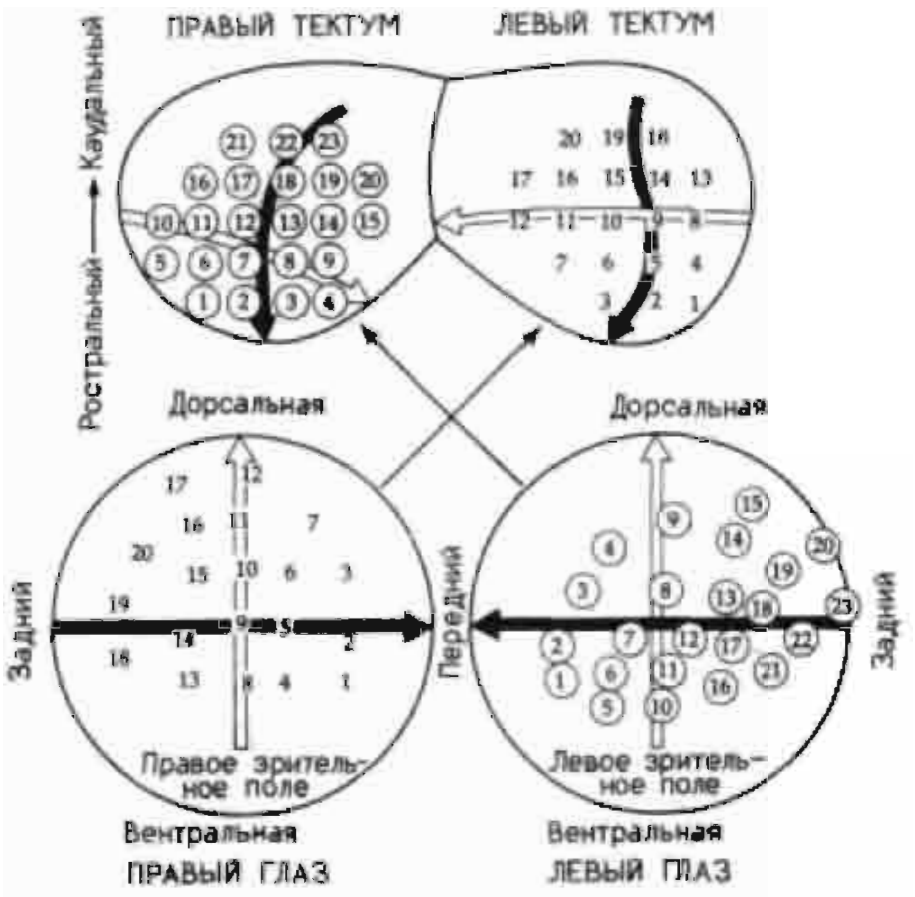


Рис. 17.37. Карта нормальной ретино-тектальной проекции у взрослых *Xenopus*. Правый глаз иннервируется от левого тектума; левый глаз иннервируется от правого тектума. *Цифры на зрительных полях (сетчатке) и тектумах* показывают области соответствия, т.е. стимуляция пятна 15 на правой сетчатке посылает электрические импульсы к левой тектальной области 15. Черные и белые стрелки обозначают пути световых импульсов в глазу и соответствующие пути стимуляции в тектуме. (По Jacobson, 1967.)

[1] У низших позвоночных – это крыша среднего мозга, а у высших – верхнее двухолмие. – *Прим. перев.*

рис. 17.37. По мере того как свет перемещается с вентральной к дорсальной поверхности сетчатки, он стимулирует клетки от латеральной к медиальной стороне тектума. Если свет падает на клетки, начиная от заднего конца сетчатки к переднему ее концу, то тектальная стимуляция идет от каудального к ростральному концу. Таким образом, мы видим, что между клетками сетчатки и клетками тектума имеет место топографическое соответствие. Когда активируется небольшая группа клеток сетчатки, то соответственно оказывается возбужденной небольшая группа тектальных клеток. Кроме того, можно видеть, что эти точки образуют континуум; иными словами, соседствующие точки сетчатки проецируются на соседствующие точки тектума. Подобная организация позволяет лягушке видеть нерасчлененное изображение.

Эта усложненная специфичность привела к созданию **гипотезы хемоаффинитета** – химического сродства (или **гипотезы нейральной специфичности**). В 1965 г. Сперри (Sperry, 1965) писал:

> «Переплетения нервных волокон мозга растут, объединяются и самоорганизуются благодаря использованию сложных химических кодов под генетическим контролем. Нервные клетки, исчисляющиеся миллионами, приобретают рано в развитии и затем сохраняют индивидуальные идентификационные ярлыки химической природы, при помощи которых их можно распознавать и отличать друг от друга».

Как мы убедились на примере развития конечности, изначально все клетки способны участвовать в формировании любой части конечности, но по мере развития позиционная информация клеток специфицируется. Джекобсон обнаружил 5-часовой период развития, во время которого происходит детерминация ретино-тектальных осей. Если на ранней стадии развития головастика *Xenopus* (стадия 28) перевернуть его глаз на 180°, так что верхняя сторона глаза окажется внизу, то ретино-тектальные оси останутся нормальными. Иными словами, аксоны новой вентральной поверхности сетчатки проследуют в латеральную сторону тектума, как это следовало ожидать от аксонов неперевернутого глаза. Головастик видит нормально. Если же перевернуть глаз несколько позже – на стадии 30, – то дорсовентральная ось остается прежней, но переднезадняя инвертируется на 180°. Если поворот осуществить на стадии 31 или еще позже, то инвертируются и переднезадняя, и дорсовентральная оси, в результате чего лягушка, желая достать пищу, расположенную чуть выше, будет наклонять голову (рис. 17.38).

Подобный эффект можно наблюдать и в серии экспериментов с ротациями, когда зачатки глаз на разных стадиях пересаживали под разными углами молодым головастикам (рис. 17.39) (Hunt, Jacobson, 1972). Если трансплантат был взят от головастика до стадии 30, то возникала нормальная ретино-тектальная проекция; следовательно, ни одна ось еще не детерминирована. После стадии 30 ретино-тектальные проекции поворачивались по сравнению с нормой в той же степени, в какой был повернут глаз. В случаях трансплантатов со стадии 30 наблюдали разнообразие результатов, в том числе карты с нормальной дорсовентральной осью, но с повернутой переднезадней. Таким образом, мы видим



А. НОРМАЛЬНАЯ ЛЯГУШКА

Б. ГЛАЗА ПЕРЕВЕРНУТЫ НА 180°

Рис. 17.38. Поворот сетчатки после стадии 30 вызывает у лягушки затруднения при ловле мух. *А*. Глаза и зрительные тектумы нормальной лягушки. *Б*. Глаза и зрительные тектумы лягушки, у которой оба глаза были повернуты на 180° по отношению к переднезадней оси. Проекции мухи и четырех точек на сетчатке обозначены на правом и левом тектумах соответственно. Изображение, проецируемое перевернутым глазом, заставит лягушку ошибиться при определении положения мухи. (По Lund, 1976.)



Рис. 17.39. Ориентация ретино-тектальной карты у *Xenopus* после трансплантации зачатка глаза головастику-хозяину. Глазные зачатки молодых (стадии 22–28) головастиков дают нормальные карты (верхний ряд), будучи трансплантированы в четырех различных ориентациях по отношению к хозяину. Глазные зачатки старших (после стадии 31) головастиков дают карты (нижний ряд), показывающие отклонение от нормы на тот же угол, что и угол смещения глаза по отношению к его нормальному анатомическому положению. (По Hunt, 1975.)

последовательную спецификацию осей, что было уже показано на примере конечности. Следует заметить, что эта спецификация позиционной информации осуществляется задолго до того, как аксоны действительно достигают тектума, что происходит примерно на стадии 40.

Однако и при этих обстоятельствах еще возможна регуляция. Если на стадии 32 сконструировать сложную сетчатку, состоящую из левой половины одной сетчатки и вентральной половины другой, то можно ожидать, что аксоны не будут заходить в ту область тектума, которая в норме получает аксоны из правого дорсального квадранта (к тому же можно было бы предполагать увеличение вдвое числа аксонов, входящих в области, иннервируемые левым вентральным квадрантом, который представлен дважды). Этого, однако, не происходит. Ретинотектальная проекция от такой сетчатки оказывается нормальной. Точно так же, если удалить половину тектума, то вся проекция сконцентрируется так, чтобы уместиться на меньшей площади (Gaze, 1978). Следовательно, в основе формирования специфичности сетчатки и тектума лежит механизм узнавания градиентного типа. Предположение о том, что каждый нейрон снабжен точным кодом, отличаясь качественно от всех остальных, должно уступить место представлению о градиентах, которые информируют клетки об их относительном положении на дорсовентральной и проксимодистальной осях. В случае развивающегося глаза цыпленка способность к регуляции показана особенно четко. Кроссленд и др. (Crossland et al., 1974) удаляли у куриного зародыша фрагменты глазной бляшки на разных стадиях развития сетчатки и наблюдали иннервацию тектума оставшимися нейронами. Если части сетчатки были удалены до 3-го дня, то у цыпленка развивалась нормальная тектальная проекция, т. е. оставшиеся нейроны достигали всех областей тектума. Если же эта операция была сделана позже, то удаление частей сетчатки приводило к появлению неиннервированных отделов тектума.

Количество данных, свидетельствующих о наличии функциональных градиентов в сетчатке и тектуме, постоянно возрастает. Различными авторами (Roth, Marchase, 1976; Marchase, 1977) было обнаружено, что клетки, удаленные из вентральной половины нейральной сетчатки цыпленка, обладают преимущественной адгезией к дорсальным половинам тектума (рис. 17.40). Было также обнаружено (Gottlieb et al., 1976), что нейроны, взятые из наиболее дорсальной части сетчатки цыпленка, имеют преимущественную адгезию в отношении наиболее вентральной области тектума, а самые вентральные нейроны сетчатки – в отношении наиболее дорсальных отделов тектума. Эти результаты нашли подтверждение в других экспериментах, где использовались не нейроны, а концы аксонов (Halfter et al., 1981).

На поверхности клеток нейральной сетчатки были выявлены градиенты специфических соедине-

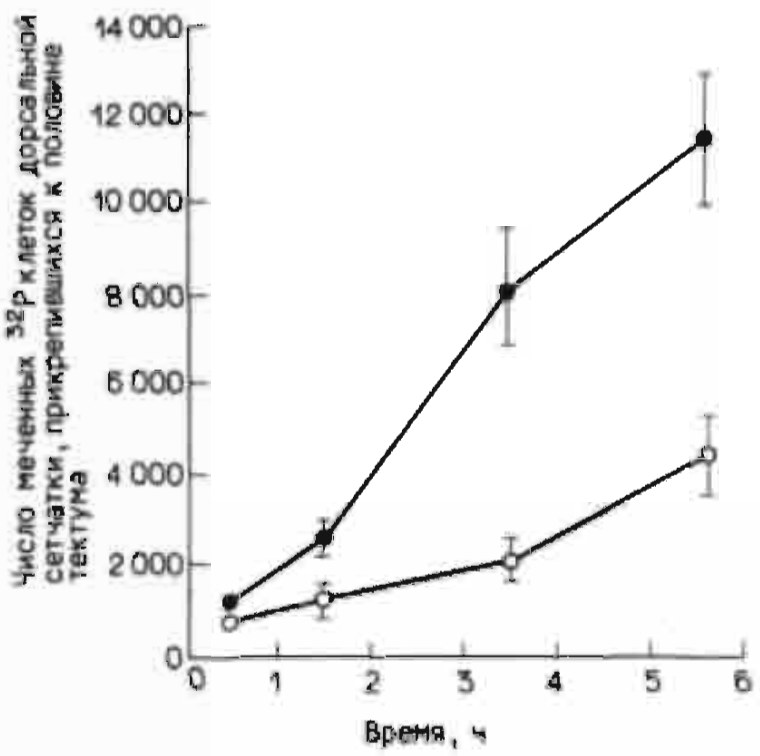


Рис. 17.40. Дифференциальная адгезия дорсальной радиоактивно меченной сетчатки куриного зародыша к дорсальной и вентральной половинам тектума. Радиоактивные клетки дорсальных половин сетчаток 7-дневных куриных зародышей были добавлены к дорсальным (белые кружки) и вентральным (черные кружки) половинам зрительных тектумов 12-дневных куриных зародышей. Данные свидетельствуют об избирательной адгезии клеток дорсальной сетчатки к вентральной тектальной ткани. (По Roth, Marchase, 1976.)

ний, но функции этих соединений пока не известны. При использовании моноклональных антител к клеткам нейральной сетчатки цыпленка удалось обнаружить, что одно антитело локализуется на поверхности сетчатки в виде градиента. Антиген, идентифицированный этим антителом, имеет в 35 раз большую концентрацию в дорсальной области сетчатки, чем у ее вентральной границы (рис. 17.41). Кроме того, те же самые молекулы присутствуют на поверхности клеток зрительного тектума, где градиент противоположен. Поскольку клетки дорсальной сетчатки посылают аксоны к вентральному

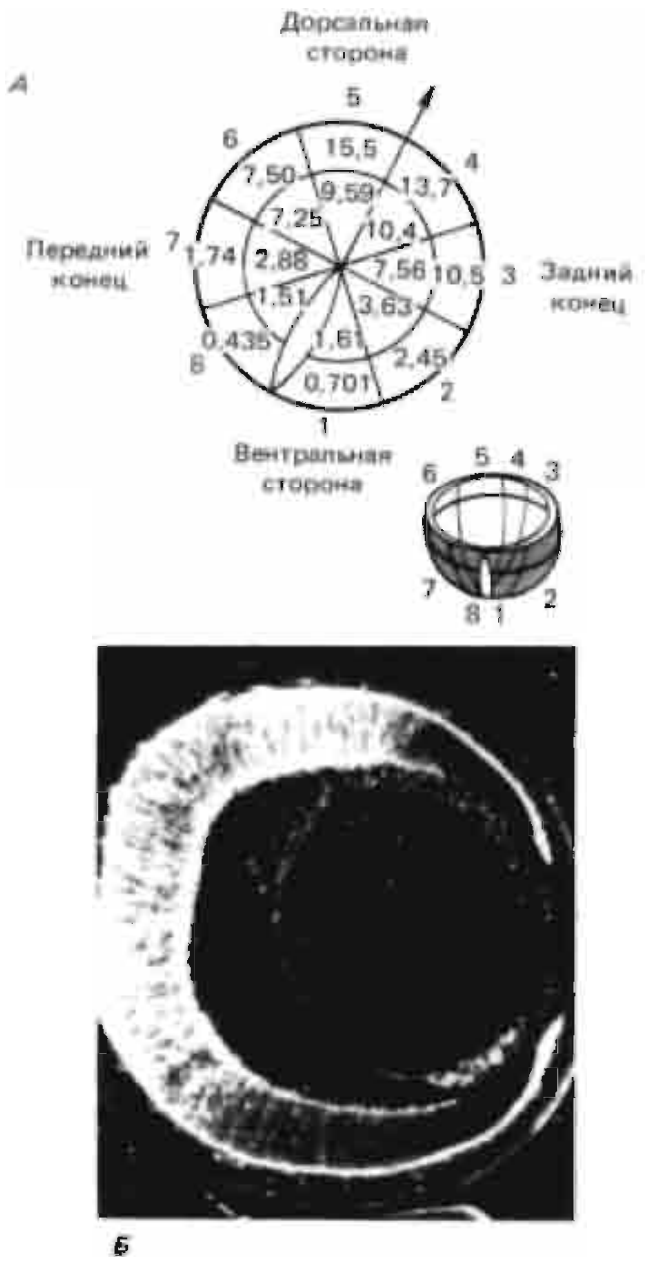


Рис. 17.41. Градиент антигенов на клетках нейральной сетчатки. *А*. Градиент антигенов, связавшихся с поверхностными молекулами клеток нейральной сетчатки 14-дневного куриного зародыша. Каждая сетчатка была разделена на восемь 45-градусных секторов и подразделена на внутренние и наружные секторы. Затем были добавлены радиоактивные моноклональные антитела. Цифрами обозначено число импульсов в минуту на 1 мг белка. *Б*. Градиент в сетчатке выявлен с помощью флуоресцирующих моноклональных антител, связывающихся с поверхностными молекулами нейральной сетчатки 13-дневной крысы. (*А* – по Trisler, 1987. *Б* – из Constantine-Paton et al., 1986; фотография с любезного разрешения этих авторов.)

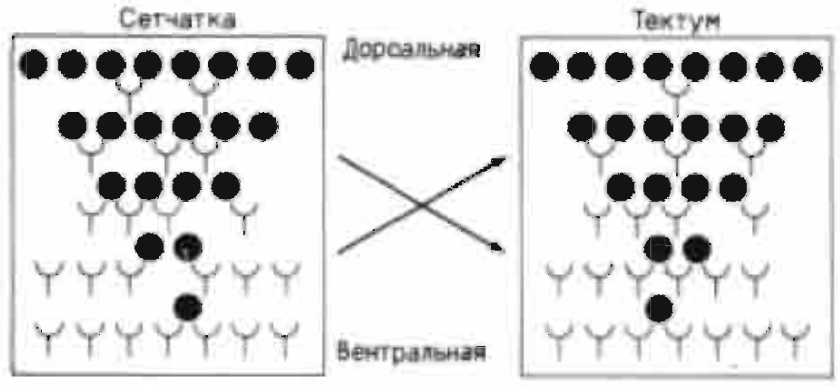


Рис. 17.42. Модель ретино-тектальной специфичности, основанная на взаимодействии двух градиентов комплементарных молекул вдоль дорсовентральной оси. И в сетчатке, и в тектуме один тип молекул сконцентрирован в дорсальной области, а другой – в вентральной области. Поэтому наиболее стабильные связи формируются между дорсальной сетчаткой и вентральным тектумом и наоборот. (По Marchase, 1977.)

тектуму (а клетки вентральной сетчатки проецируются на дорсальный тектум), этот антиген может участвовать в ориентации специфических аксонных связей (Trisler, Collins, 1987). При инъекциях в стекловидную влагу глаза 11-дневного куриного зародыша эти антитела подавляли формирование синапсов (Trisler et al., 1986; Trisler, 1987), что еще раз подтверждало причастность этого топологического асимметричного антигена к нейральному узнаванию. У крысиных зародышей обнаружен другой антиген, образующий на сетчатке дорсовентральный градиент (рис. 17.41, *Б*) (Constantine-Paton et al., 1986). По своему строению этот антиген кажется вообще не связанным с антигеном клеток сетчатки цыпленка.

Исследуется также и биохимия подобных градиентов. Были предприняты попытки свести на нет различия в способности дорсальной и вентральной половин тектума связывать дорсальные клетки сетчатки, используя серию ферментов (Marchase, 1977). Это удалось при обработке либо дорсальных клеток сетчатки, либо дорсальных половин тектума ферментом гексозаминидазой, которая специфически отщепляет *N*-ацетилгексозамины от концов гликопротеинов или гликолипидов. Тот же самый фермент оказывал незначительное воздействие на вентральные клетки как тектума, так и сетчатки. Модель Марчейза, представленная на рис. 17.42, демонстрирует два типа молекул, распределенных в виде противоположных градиентов на клеточных поверхностях сетчатки и тектума. Первый градиент – это градиент гликопротеина (или гликолипида), несущего *N*-ацетилгалактозамин. Это вещество представляет собой сахар, узнаваемый ферментом, нарушающим специфичность ретино-тектального связывания in vitro. Концентрация этого вещества наиболее высока в дорсальных частях и сетчатки, и тектума. Второй градиент состоит из молекул, способных

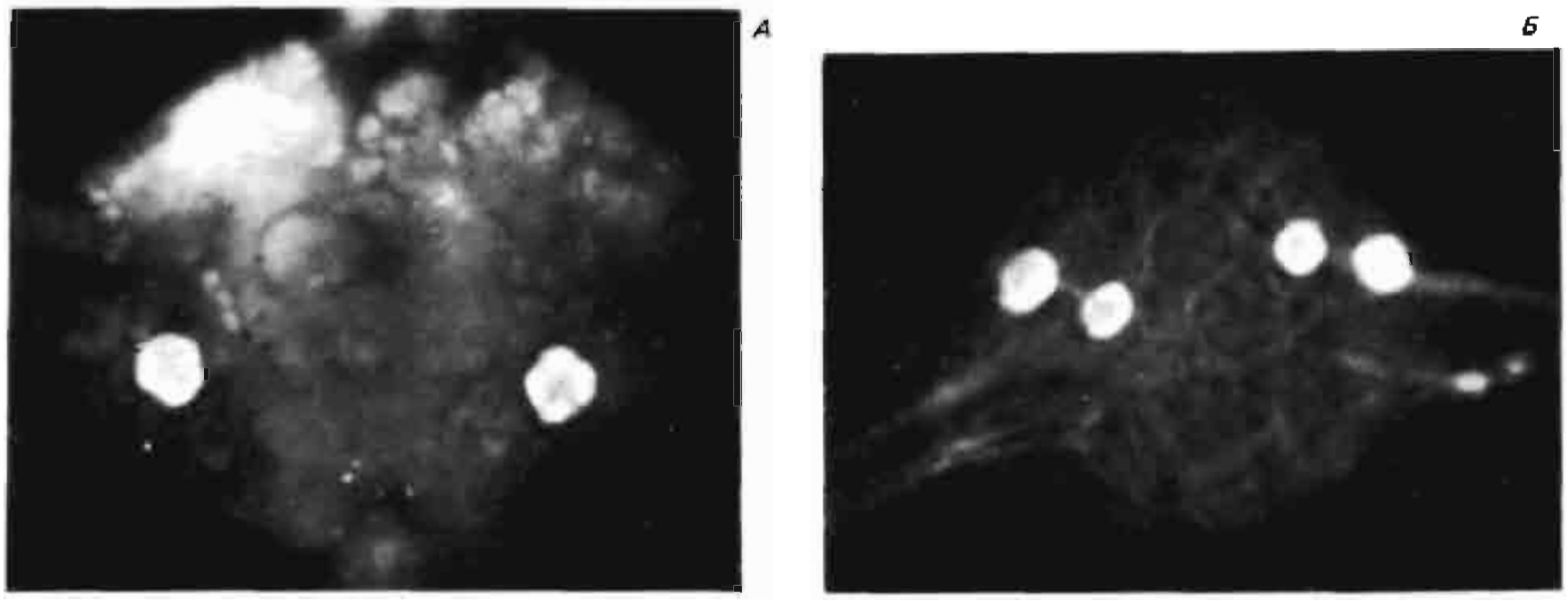


Рис. 17.43. *Специфические функциональные нейроны, маркированные моноклональными антителами к компонентам клеточной поверхности. А.* Антитела Lan 3-1 узнают единственную пару нейронов в определенном ганглии. Функция этих нейронов связана с выворачиванием полового органа. *Б.* Набор нейронов, узнаваемых антителами Lan 3-2; эти нейроны отвечают на повреждающее стимулирование кожи пиявки. (Из Zipser, McKay, 1981; с любезного разрешения B. Zipser.)

распознавать *N*-ацетилгалактозамин. Предполагается, что это гликозилтрансфераза – фермент, способный образовывать с *N*-ацетилгалактозамином комплекс по типу ключ–замок. Таков механизм специфического узнавания дорсальной части сетчатки вентральной областью тектума и наоборот.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ НЕЙРОНАМИ. Предыдущая модель представляет собой гипотезу количественного типа, согласно которой все клетки снабжены одним и тем же клеем, но в разных количествах. Эти представления могут быть полезны для объяснения общего направления роста аксонов, но сомнительно, чтобы код такого рода мог точно указать специфические места назначения. Исследования, выполненные на других организмах, свидетельствуют о том, что каждый нейрон может иметь качественно различные молекулы клеточной поверхности, и эти молекулы могут играть важную роль в установлении синаптической специфичности. Так, нервная система пиявки представлена 34 спаренными ганглиями, в состав каждого из которых входит около 400 нейронов. Индивидуальные нейроны идентифицированы, функции многих нейронов известны. После инъецирования мышей материалом нервной системы пиявки (Zipser, McKay, 1981) были получены сотни моноклональных антител, связывающихся с различными отделами нервной системы. Из 300 исходных моноклональных антител 41 узнавало разные отделы нервной системы пиявки, что свидетельствует о различиях клеточных поверхностей нейронов. В некоторых случаях эти различия коррелируют с функциями. Моноклональные антитела Lan 3-1 специфически связывались с единственной парой нейронов срединных ганглиев и узнавали в каждом ганглии такие же правый и левый нейроны (рис. 17.43). Известно, что эти пары нейронов контролируют процесс выворачивания полового органа у спаривающихся пиявок. Другие моноклональные антитела – Lan 3-2 – узнавали все четыре нейрона, отвечающие на повреждающие механические стимулы. «Эта ситуация,– пишут Зипсер и Мак-Кей,– кажется совершенно аналогичной разноцветному электрическому кабелю, состоящему из многочисленных помеченных цветом проводов, где каждый провод снабжен собственной молекулой (краской), чтобы легче было узнать его и правильно соединить концы».

Дополнительные сведения и гипотезы

Адреса-маркеры клеточной поверхности и миграция лимфоцитов

Представление о том, что специфические маркеры клеточной поверхности обусловливают миграцию аксонов и установление связей между ними, остается пока гипотетическим, однако известен по крайней мере один случай, когда в эмбриогенезе взаимодействие клеточных поверхностей определяет

конечный результат миграции. Зрелые лимфоциты – подвижные клетки, постоянно циркулирующие между лимфоидными органами,– а именно селезенкой, миндалинами и связанной с кишечником лимфатической тканью, посредством кровеносной и лимфатической систем. Каким-то образом лимфоциты должны узнавать, когда и где им следует покинуть кровеносное русло и войти в лимфоидный орган. Более того, определенные лимфоциты мигрируют лишь в определенные органы, например только в лимфатические узлы или лимфоидную ткань, связанную с кишечником. В-клетки предпочитают оседать в лимфатической ткани, связанной с кишечником, тогда как Т-клетки заселяют периферические узлы. В основе механизма такой специфичности лежит, по-видимому, способность клеток особым образом взаимодействовать с эндотелиальными клетками, выстилающими кровеносные сосуды, которые обслуживают эти органы. Этот эндотелий обнаружен в **наружных эндотелиальных венулах** (НЭВ), располагающихся сразу за капиллярной сетью этих органов. Некоторые лимфоциты связываются in vitro с НЭВ лимфоидной ткани, *связанной с кишечником*, тогда как другие предпочитают НЭВ *периферических узлов*. Иммунизировав мышей злокачественными лимфоцитами, в норме специфически связывающимися с НЭВ периферических узлов, Галлатен и др. (Gallatin et al., 1983, 1986) получили моноклональные антитела, блокирующие специфическую адгезию лимфоцитов к НЭВ периферических узлов. После того как мышиные лимфоциты обрабатывали этими антителами, лимфоциты сохраняли способность связываться лимфоидной тканью кишечника, но их способность к связыванию с НЭВ периферических узлов почти полностью утрачивалась (рис. 17.44). Было показано, что эти антитела узнают на поверхности лимфоцитов белок с молекулярной массой 80 000 дальтон. Таким образом, очевидно, что это именно тот белок на поверхности лимфоцитов, который отвечает за взаимодействие с НЭВ периферических узлов; блокирование этого белка антителами ингибирует специфическую адгезию лимфоцитов к этим НЭВ.

Итак, миграция клеток к специфическим органам коррелирована со специфическим взаимодействием клетка–клетка.

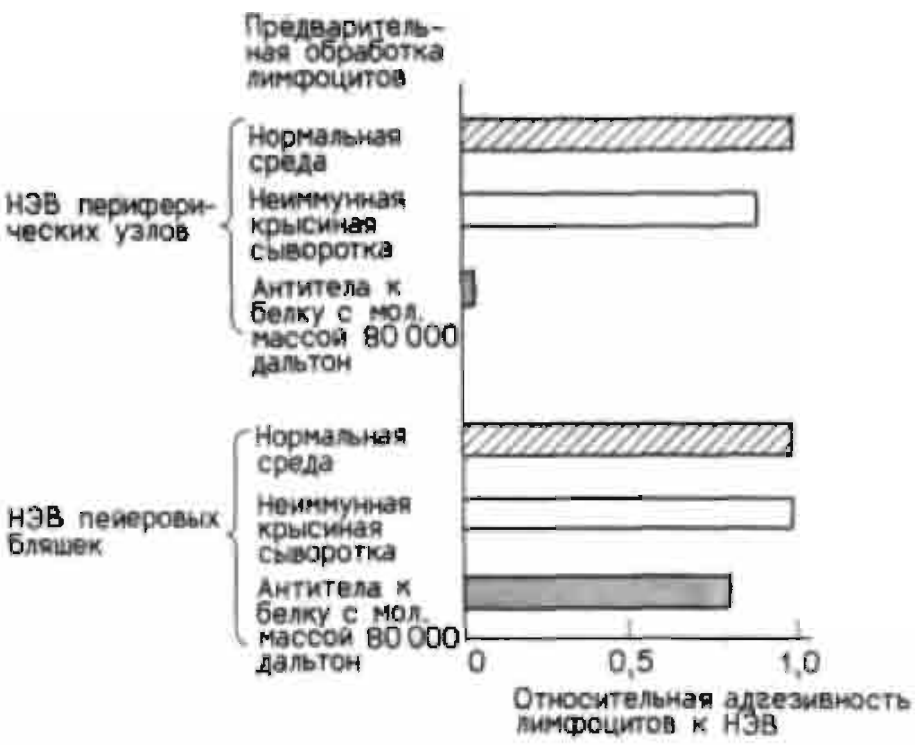


Рис. 17.44. Предварительная обработка лимфоцитов моноклональными антителами против специфического белка с молекулярной массой 80 000 дальтон блокирует их нормальное связывание с НЭВ периферических узлов, но не блокирует связывание с НЭВ пейеровых бляшек. Лимфоциты обрабатывали нормальной средой, средой с неиммунной крысиной сывороткой или средой, содержащей крысиные антитела к специфическому белку. Затем обработанные таким образом лимфоциты отмывали от среды и несвязавшихся антител и инкубировали с замороженными срезами НЭВ. После инкубации срезы промывали и прикрепившиеся клетки подсчитывали. (По Gallatin et al., 1983.)

Развитие поведения

Один из наиболее волнующих аспектов нейробиологии касается корреляции определенных нервных связей с теми или иными поведенческими реакциями. Не менее впечатляющи наблюдения, свидетельствующие о том, что многие типы поведения являются врожденными, находясь «на вооружении» мозга при рождении. Например, 19-дневный куриный зародыш реагирует на материнский сигнал тревоги тем, что у него учащается сердцебиение; никакие другие сигналы не вызывают такой реакции (Gottlieb, 1965). Более того, только что вылупившийся цыпленок немедленно поспешит в укрытие при появлении тени ястреба. При этом нет необходимости в настоящем ястребе: такой ответ может провоцировать даже тень от бумажного силуэта ястреба,– но только ястреба, а не какой-либо другой птицы (Tinbergen, 1951). Следовательно, у высших позвоночных должны существовать определенные нервные связи, обусловливающие врожденное поведение.

Некоторые из наиболее интересных исследований, касающихся организации нервной системы у млекопитающих, связаны с изучением эффектов сенсорной депривации при развитии зрительной системы у котят и обезьян. Пути, по которым электрические импульсы у млекопитающих направляются

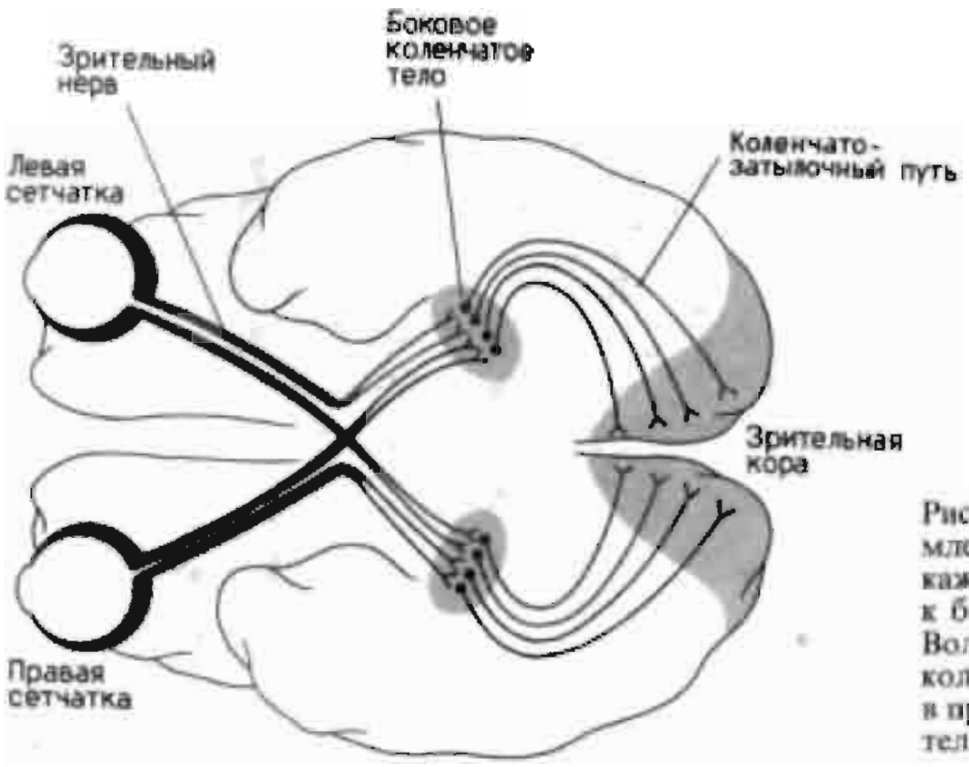
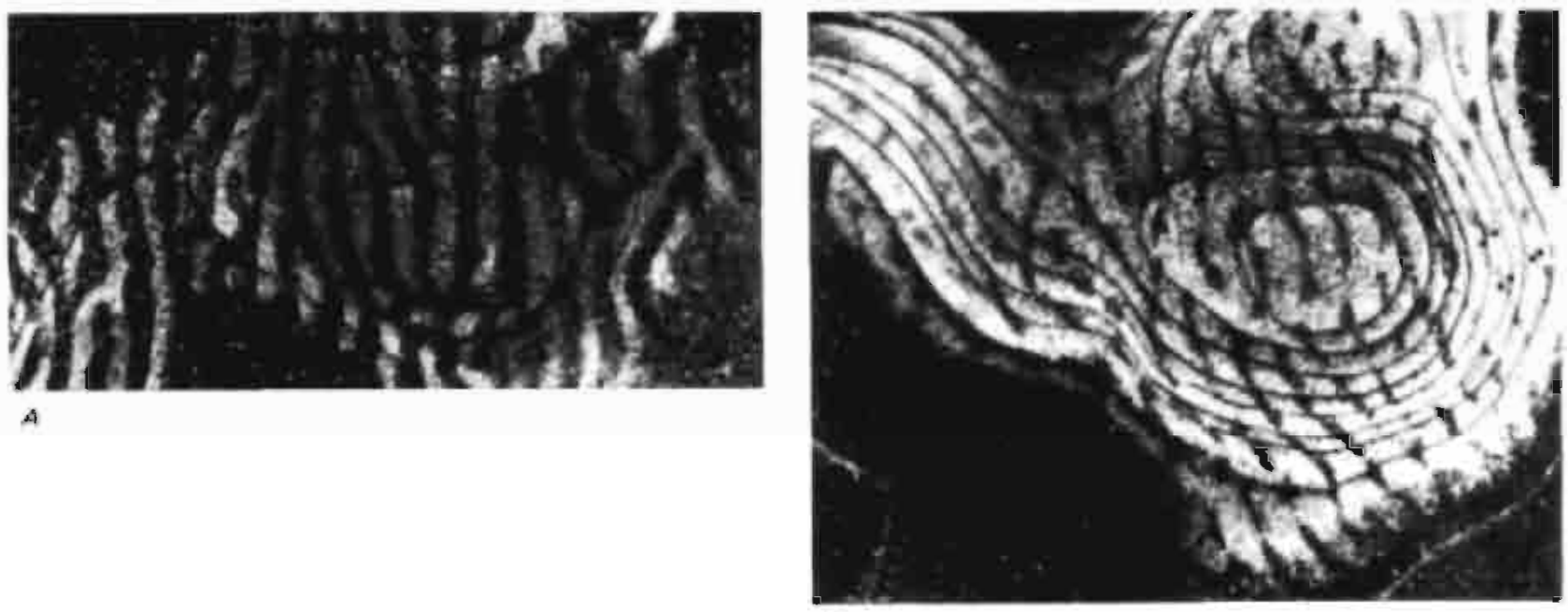


Рис. 17.45. Основные проводящие пути зрительной системы млекопитающих. У млекопитающих зрительный нерв от каждого глаза разветвляется, посылая нервные волокна к боковому коленчатому телу на каждой стороне мозга. Волокна от левой стороны обеих сетчаток входят в левое коленчатое тело, а волокна от их правой стороны входят в правое коленчатое тело. Волокна из боковых коленчатых тел входят в зрительную кору каждый со своей стороны.

от сетчатки к мозгу, представлены на рис. 17.45. Аксоны ганглиозных клеток сетчатки образуют два зрительных нерва, встречающихся в зрительном перекресте. Как и у головастиков *Xenopus*, некоторые из волокон идут на противоположную (**контрлатеральную**) сторону мозга, но в отличие от большинства других позвоночных клетки сетчатки у млекопитающих посылают нервные волокна в ту же самую (**ипсилатеральную**) сторону мозга. Эти нервы заканчиваются в двух **боковых коленчатых телах**. Здесь проводящие пути от каждого глаза обособлены друг от друга – в самую верхнюю и переднюю область идут волокна от контрлатерального глаза, а в среднюю область – волокна от ипсилатерального глаза. Ситуация усложняется еще более благодаря тому, что нейроны боковых коленчатых тел, связаны с нейронами **зрительной коры**. Более 80% нервных клеток зрительной коры соединены проводящими путями с обоими глазами. Этим обеспечивается бинокулярное зрение и глубина восприятия. Еще одно замечательное открытие заключается в том, что ретино-кортикальная проекция оказывается одной и той же для обоих глаз. Если кортикальный нейрон стимулирован вспышкой света через область левого глаза под углом 5° над и 1° левее зрительного нерва, то он будет также стимулирован вспышкой света через область правого глаза под углом 5° выше и 1° левее от зрительного нерва. Более того, ответная реакция, возникающая в клетке коры при стимуляции обоих глаз сильнее, чем при стимуляции каждого глаза по отдельности.

Хьюбел и др. (Hubel, 1967) показали, что развитие нервной системы в определенной степени зависит от индивидуального опыта во время критического периода развития. Другими словами, не все, что характеризует развитие нервной системы, закодировано в геноме: некоторые черты появляются в процессе обучения. Опыт, по-видимому, усиливает или стабилизирует нервные связи, уже существующие при рождении. Основаниями для этих заключений послужили эксперименты с частичным блокированием сенсорной информации. В своих опытах Хьюбел и его коллеги зашивали веки правых глаз у новорожденных котят, оставляя их закрытыми на 3 месяца, после чего швы с век снимали. У таких котят клетки коры не стимулировались импульсами от правого глаза. Практически все сигналы в зрительную кору шли от левого глаза, и в поведении котят проявилась неполноценность их правых глаз. Если у таких котят закрывали левые глаза, то котята оказывались функционально слепыми. Поскольку нейроны бокового коленчатого тела получают стимулы от обоих глаз – и правого, и левого, – можно полагать, что физиологический дефект возникает между боковыми коленчатыми телами и зрительной корой. У макаков-резусов наблюдалось аналогичное явление; в этом случае дефект коррелировал с недостаточным синтезом белка нейронами бокового коленчатого тела, к которому подходили нервные волокна от закрытого глаза (Kennedy et al., 1981).

Напрашивается вывод о том, что причиной развивающейся в эксперименте слепоты послужило отсутствие способности устанавливать нужные зрительные связи. Однако это не так. Котята скорее всего рождаются со всеми установившимися необходимыми нервными связями в зрительной системе (Hubel, Wiesel, 1963). Все дело в том, что если на раннем этапе жизни котенка или обезьяны один глаз остается закрытым, его связи со зрительной корой устанавливает другой глаз (рис. 17.46). Происходит конкуренция, и роль опыта заключается в усилении



А

Б

Рис. 17.46. Темнопольные радиоавтографы стриатной коры обезьяны через 2 недели после того, как в стекловидную влагу одного глаза был инъецирован ^{3}H-пролин. Каждый нейрон сетчатки включает радиоактивную метку и переносит ее в клетки, с которыми образует синапсы. *А*. Нормальное включение метки. Белые полосы означают, что примерно половина нервных пучков включает метку, тогда как другая половина не включает; характер такого мечения свидетельствует о том, что половина клеток иннервируется меченым глазом, а другая половина – немеченым. *Б*. Включение метки в случае, когда немеченый глаз был в течение 18 мес закрыт наложением швов. Аксонные проекции от нормального (меченого) глаза располагаются над областями, которые в норме иннервируются защитым глазом. (Из Wiesel, 1982; фотография с любезного разрешения T. Wiesel.)

связей от одного или от другого глаза. Таким образом, если у котенка на 3 месяца зашить оба глаза, то их зрительная система останется интактной. Функциональны оба глаза. У котенка критическим периодом для оценки нейральных связей является период с четвертой по шестую неделю. Монокулярное зрение вплоть до четвертой недели вызывает небольшой физиологический дефект или вообще не вызывает физиологического дефекта, но после шестой недели развиваются характерные нейральные изменения. Итак, в развитии зрительной системы млекопитающих просматриваются еще два принципа. Во-первых, нервные связи, обеспечивающие зрение, уже присутствуют еще до того, как животное начинает видеть; во-вторых, опыт играет важную роль для определения дальнейшей судьбы данных связей.

Дополнительные сведения и гипотезы

Морфогенез путем специфической гибели клеток

При развитии нервной системы, как и при развитии конечности, важную роль в формировании окончательной пространственной организации играет гибель клеток. Почти во всех отделах развивающейся нервной системы позвоночных происходит избыточное образование нейронов, которые затем в определенных областях погибают. Это явление способствует становлению стратификации, характерной для тканей центральной нервной системы. Кроме того, наблюдается резкое уменьшение числа аксонов, иннервирующих периферические ткани. Такая редукция ведет к тому, что аксоны, ветвление которых обеспечивало иннервацию нескольких мишеней, ограничиваются иннервацией одной-единственной мишени. В этом легко убедиться на примере элиминации мышечных синапсов плода. Иннервация мышц плода или новорожденного значительно отличается от иннервации мышц взрослых животных (рис. 17.47). У взрослых млекопитающих каждый двигательный аксон стимулирует единственное мышечное волокно при помощи нескольких соединений. Однако у новорожденных млекопитающих каждый аксон может иннервировать несколько различных мышечных волокон (Redfern, 1970; Bagust, 1973). Такое сокращение аксонных соединений происходит в течение первых недель жизни.

Возможно, эта элиминация определяется конкуренцией за нейротрофические факторы, продуцируемые тканью-мишенью, и активностью нейрона.

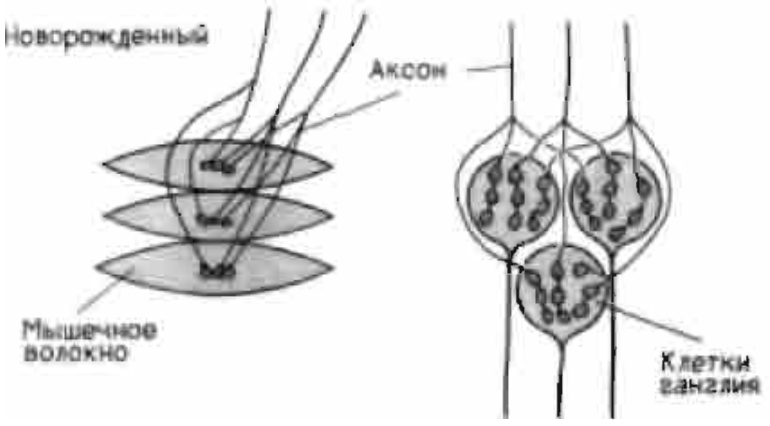


Рис. 17.47. Схема элиминации синапсов в развивающихся скелетной мышце (*слева*) и симпатических ганглиях (*справа*). У новорожденного млекопитающего каждый аксон стимулирует нескольких мышечных волокон или ганглиозных клеток; у взрослых млекопитающих, однако, каждый аксон стимулирует лишь одно волокно или одну клетку. (По Purves, Lichtman, 1985.)

Чем выше активность, тем сильнее конкуренция и тем скорее элиминируются избыточные синапсы. Пурвес и Лихтман (Purves, Lichtman, 1980; Lichtman, Purves, 1983) предположили, что именно несбалансированная активность ведет к конкуренции и элиминации синапсов у котят с экспериментальным одноглазием и что нормальная несбалансированная активность таким же образом служит причиной элиминации синапсов в других отделах нервной системы. Согласно этим представлениям, существует своего рода «естественный отбор», в результате которого наиболее интенсивно используемые синапсы будут продолжать свое функционирование и сохранятся. Идея такой конкуренции впервые была высказана Ру в 1881 г., но до сих пор не принималась всерьез. Элиминация лишних синапсов может обусловить у взрослого организма более эффективные ответы, а прогрессирующее ограничение аксонов единственной мишенью может быть причиной снижения пластичности нервной системы, которая наблюдается в детстве.

Гибель клеток играет существенную роль в формировании конечностей, сердца и скелета. В развитии животных есть примеры, с очевидностью свидетельствующие о том, что гибель клеток может быть генетически запрограммирована и сохранена отбором в ходе эволюции. Один из таких примеров – наличие или отсутствие перепонки на конечностях. Ноги утки и курицы отличаются друг от друга дифференциальной гибелью или сохранностью клеток между пальцами (рис. 17.48). Полагают, что гибель клеток играет важную роль в обособлении лучевой и локтевой костей. Саундерс и др. (Saunders et al., 1962) обнаружили, что после определенной стадии развития клетки, обреченные на гибель, будут погибать даже в том случае, если их пересадить в другие области зародыша; пересадка клеток до этой критической стадии может спасти их. В период между временем, когда происходит детерминация гибели клеток, и временем, когда эта гибель осуществляется фактически, наблюдается резкое снижение уровня синтеза ДНК, РНК и белка (Pollak, Fallon, 1976).



Рис. 17.48. Картина гибели клеток в зачатке ноги куриного зародыша (*А*) и зародыша утки (*Б*). Затемнены области гибели клеток. (По Saunders, Fallon, 1966.)

ЛИТЕРАТУРА

Akers R.M., Mosher D.E., Lilien J.E. (1981). Promotion of retinal neurite outgrowth by substratum-bound fibronectin, Dev. Biol., **86**, 179–188.

Angeletti P., Vigneti E. (1971). Assay of nerve growth factor (NFG) in subcellular fractions of peripheral tissues by microcomplement fixation, Brain Res., **33**, 601–604.

Bagust J., Lewis D.M., Westerman R.A. (1973). Polyneuronal innervation of kitten skeletal muscle, J. Physiol. (Lond.), **229**, 241–255.

Bastiani M.J., Harrelson A.L., Snow P.M., Goodman C.S. (1987). Expression of fasciclin I and II glycoproteins on subsets of axon pathways during neuronal development in the grasshopper, Cell, **48**, 745–755.

Berking S. (1979). Analysis of head and foot formation in hydra by means of an endogenous inhibitor, Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech, Org., **186**, 189–210.

Berlot J., Goodman C.S. (1984). Guidance of peripheral pioneer neurons in the grasshopper: Adhesive hierarchy of epithelial and neuronal surfaces, Science, **223**, 493–496.

Bode P.M., Bode H.R. (1984). Patterning in *Hyrda*. In: G.M. Malacinski and S.V. Bryant (eds.), Pattern Formation, Macmillan, New York, pp. 213–241.

Boveri T. (1901). Über Polarität des Seeigeleiers, Eisverh. Phys. Med. Ges. (Würzburg), **34**, 145–175.

Breitman T.R., Selonick S.E., Collins S.J. (1980). Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid, Proc. Natl Acad. Sci. USA, **77**, 2936–2940.

Brockes J.P., Kinter C.R. (1986). Glial growth factor and nerve-dependent proliferation in the regeneration blastema of urodele amphibians, Cell, **45**, 301–306.

Browne E.N. (1909). The production of new hydranths in *Hydra* by the insertion of small grafts, J. Exp. Zool., **7**, 1–23.

Bryant S.V., French V., Bryant P.J. (1981). Distal regeneration and symmetry, Science, **212**, 993–1002.

Bryant S.V., Iten L.E. (1976). Supernumerary limbs in amphibians: Experimental production in *Notophthalamus viridescens* and a new interpretation of their formation, Dev. Biol., **50**, 212–234.

Butler E.G. (1935). Studies on limb regeneration in X-rayed *Ambystoma* larvae, Anat. Rec., **62**, 295–307.

Campbell R.D. (1967). Tissue dynamics of steady-state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement, J. Morphol., **121**, 19–28.

Carlson B.M. (1972). Muscle morphogenesis in axolotl limb regenerates after removal of stump musculature, Dev. Biol., **28**, 487–497.

Child C.M. (1941). Patterns and Problems of Development, University of Chicago Press, Chicago.

Cohan C.S., Kater S.B. (1986). Suppression of neurite elongation and growth cone motility by electrical activity, Science, **232**, 1638–1640.

Constantine-Paton M., Blum A.S., Mendez-Otero R., Barnstable C.J. (1986). A cell surface molecule distributed in a dorsoventral gradient in the perinatal rat retina, Nature, **324**, 459–462.

Crawford K., Stocum D.L. (in press). Pattern and cell recognition property in regenerating limbs are coordinately proximalised by retinoic acid, Development.

Crick F.H. (1970). Diffusion in embryogenesis, Nature, **225**, 420–422.

Crossland W.J., Cowan W.M., Rogers C.A., Kelly J. (1974). The specification of the retinal-tectal projection in the chick, J. Comp. Neurol., **155**, 127–164.

Davies A.M., Bandtlow C., Heumann R., Kosching S., Rohrer H., Thoenen H. (1987). Timing and site nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor, Nature, **326**, 353–358.

Detwiler S.R. (1918). Experiments of the development of the shoulder girdle and the anterior limb of *Amblystoma punctatum*, J. Exp. Zool., **25**, 499–538.

Ebendal T., Hedlund K.-O., Norrgran G. (1982). Nerve growth factor in chick tissues, J. Neurosci. Res., **8**, 153–164.

Eisen J., Meyers P.Z., Westerfield M. (1986). Pathway selection by growth cones of identified motoneurones in live zebra fish embryos, Nature, **320**, 269–271.

Fell H.B., Mellanby E. (1953). Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A, J. Physiol., **119**, 470–488.

Fraser S.E. Green C.R., Bode H.R., Gilula N.B. (1987). Selective disruption of gap junctional communication interferes with a patterning process in hydra, Science, **237**, 49–55.

French V., Bryant P.J., Bryant S.V. (1976). Pattern regulation in epimorphic fields, Science, **193**, 969–981.

Frolik C.A. (1984). Metabolism of retinoids. In: M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D. Goodman (eds.), The Retinoids, Vol. 2, Academic, New York, pp. 177–208.

Gallatin W.M., St. John T.P., Siegelman M., Reichert R., Butcher E.C., Weissman I.L. (1986). Lymphocyte homing receptors, Cell, 44, 673–680.

Gallatin W.M., Weissman I.L., Butcher E.C. (1983). A cell surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes, Nature, **304**, 30–35.

Gaze R.M. (1978). The problem of specificity in the formation of nerve connections. In: D.R. Garrod (ed.), Specificity of Embryological Interactions, Chapman and Hall, London, pp. 51–96.

Gershon M.D., Schwartz J.H., Kandel E.R. (1985). Morphology of chemical synapses and pattern of interconnections. In: E.R. Kandel and J.H. Schwartz, Principles of Neural Science, 2nd Ed. Elsevier, New York, pp. 132–147.

Goodman C.S., Bastiani M.J., Doe C.Q., du Lac S., Helfand S.L., Kuwada J.Y., Thomas J.B. (1984). Cell recognition during neuronal development, Science, **225**, 1271–1287.

Goodman C.S., Bastiani M.J. (1984). How embryonic nerve cells recognize one another, Sci. Am., **251(6)**, 58–66.

Goss R.J. (1969). Principles of Regeneration, Academic, New York.

Gottlieb D.I., Rock K., Glaser L. (1976). A gradient of adhesive specificity of developing avian retina, Proc, Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 410–414.

Gottlieb G. (1965). Prenatal auditory sensitivity in chickens and ducks, Science, **147**, 1596–1598.

Grimmelikhuijzen C.J.P., Schaller H.C. (1977). Isolation of a substance activating food formation in hydra, Cell Differ., **6**, 297–305.

Gundersen R.W. (1987). Response of sensory neurites and growth cones to patterned substrata of laminin and fibronectin in vitro, Dev. Biol., **121**, 423–431.

Halfter W., Claviez M., Schwarz U. (1981). Preferential adhesion of tectal membranes to anterior embryonic chick retina neurites, Nature, **292**, 67–70.

Hamburger V. (1938). Morphogenetic and axial self-differentiation of transplanted limb primordia of 2-day chick embryos, J. Exp. Zool., **77**, 379–400.

Hamburger V. (1939). The development and innervation of transplanted limb primordia of chick embryos, J. Exp. Zool., **80**, 347–389.

Hamburger V., Bruno-Bechtold J.K., Yip J.W. (1981). Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor, J. Neurosci., **1**, 60-71.

Harris W.A. (1986). Homing behavior of axons in the embryonic vertebrate brain, Nature, **320**, 266–269.

Harrison R.G. (1910). The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement, J. Exp. Zool., **9**, 787–848.

Harrison R.G. (1918). Experiments on the development of the

forelimb of *Amblystoma*, a self-differentiating equipotential system, J. Exp. Zool., **25**, 413–461.
Haydon P.G., Cohan C.S., McCobb D.P., Miller H.R., Kater S.B. (1985). Neuron-specific growth cone properties as seen in identified neurons of *Helisoma*, J. Neurosci. Res., **13**, 135–147.
Hertwig G. (1925). Haploidkernige Transplante als Organisatoran diploidkeniger Extremitaten be *Triton*, Anat. Anz. [Suppl.], **60**, 112–118.
Hicklin J., Wolpert L. (1973). Positional information and pattern regulation in hydra: Formation of the foot end, J. Embryol. Exp. Morphol., **30**, 727–740.
Hinchliffe J.R., Sansom A. (1985). The distribution of the polarizing zone (ZPA) in the legbud of the chick embryo, J. Embryol. Exp. Morphol., **86**, 169–175.
Hollyday M. (1980). Motoneuron histogenesis and the development of limb innervation, Curr. Top. Dev. Biol., **15**, 181–215.
Hollyday M., Hamburger V., Farris J.M.G. (1977). Localization of motor neuron pools supplying identified muscles in normal and supernumary legs of chick embryos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3582–3586.
Honig L.S., Summerbell D. (1985). Maps of strength of positional signaling activity in the developing chick wing bud, J. Embryol. Exp. Morphol., **87**, 163–174.
Hubel D.H. (1967). Effects of distortion of sensory input on the visual system of kittens, Physiologist, **10**, 17–45.
Hubel D.H., Wiesel T.N. (1963). Receptive fields of cells in striate cortex of very young, visually inexperienced kittens, J. Neurophysiol., **26**, 944–1002.
Hunt R.K. (1975). Developmental program for retinotectal patterns, Ciba Found. Symp., **29**, 131–150.
Hunt R.K., Jacobson M. (1972). Development and stability of positional information in *Xenopus* retinal ganglion cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **69**, 780–783.
Iten L.E. (1982). Pattern specification and pattern regulation in the embryonic chick limb bud, Am. Zool., **22**, 117–129.
Iten L.E., Bryant S.V. (1975). The interaction between blastema and stump in the establishment of the anterior-posterior and proximal distal organization of the limb regenerate, Dev. Biol., **44**, 119–147.
Jacobson M. (1967). Retinal ganglion cells: Specification of central connections in larval *Xenopus laevis*, Science, **155**, 1106–1108.
Javois L.C., Wood R.D., Bode H.R. (1986). Patterning of the head in hydra as visualized by a monoclonal antibody. I. Budding and regeneration, Dev. Biol., **117**, 607–618.
Kater S.B. (1985). Dynamic regulators of neuronal form and conductivity in the adult snail *Helisoma*. In: A.L. Selverston (ed.), Model Neural Networks and Behavior, Plenum, New York, pp. 191–209.
Kennedy C., Suda S., Smith C.B., Miyaoka M., Ito M., Sokoloff L. (1981). Changes in protein synthesis underlying functional plasticity in immature monkey visual system, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 3950–3953.
Kochhar D.M. (1977). Cellular basis of congenital limb deformity induced in mice by vitamin A. In: D. Bergsma and W. Lenz (eds.), Morphogenesis and Malformation of the Limb, Alan. R. Liss, New York, pp. 111–154.
Lance-Jones C., Landmesser L. (1980). Motoneurone projection patterns in chick hindlimb following partial reversals of the spinal cord, J. Physiol., **302**, 581–602.
Landmesser L. (1978). The development of motor projection patterns in the chick hindlimb, J. Physiol., **284**, 391–414.
Levi-Montalcini R. (1976). The nerve-growth factor: Its role in growth, differentiation, and formation of the sympathetic adrenergic neuron, Prog. Brain Res., **45**, 235–258.
Lichtman J.W., Purves D. (1983). Activity-mediated neural change, Nature, **301**, 563–564.
Lumsden A.G.S., Davies A.M. (1983). Earliest sensory nerve fibers are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor, Nature, **306**, 786–788.
Lumsden A.G.S., Davies A.M. (1986). Chemotropic effect of specific target epithelium in the developing mammalian nervous system, Nature, **323**, 538–539.
Lund R.D. (1976). Development and Plasticity of the Brain: An Introduction, Oxford University Press, New York.
MacWilliams H.K. (1983a). Hydra transplantation phenomena and the mechanism of hydra head regeneration. I. Properties of head inhibition, Dev. Biol., **96**, 217–238.
MacWilliams H.K. (1983b). Hydra transplantation phenomena and mechanism of hydra head regeneration. II. Properties of head activation, Dev. Biol., **96**, 239–272.
MacWilliams H.K., Kafatos F.C. (1974). The basal inhibition of hydra may be mediated by a diffusible substance, Am. Zool., **14**, 633–645.
Maden M. (1982). Vitamin A and pattern formation of the regenerating limb, Nature, **295**, 672–675.
Maden M. (1984). Retinoids as probes for investigating the molecular basis of pattern formation. In: G.M. Malacinski and V. Bryant (eds.), Pattern Formation, Macmillan, New York, pp. 539–555.
Maden M., Summerbell D. (1986). Retinoic acidbinding protein in the chick limb bud; Identification at developmental stages and binding affinities of various retinoids, J. Embryol. Exp. Morphol., **97**, 239–250.
Marchase R.B. (1977). Biochemical investigations of retinotectal adhesive specificity, J. Cell Biol., **75**, 237–257.
Mescher A.L., Tassava R.A. (1975). Denervation effects on DNA replication and mitosis during the initiation of limb regeneration in adult newts, Dev. Biol., **44**, 187–197.
Muneoka K., Bryant S.V. (1982). Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same, Nature, **298**, 369–371.
Nardi J.B. (1983). Neuronal pathfinding in developing wings of the moth *Manduca sexta*, Dev. Biol., **95**, 163–174.
Nardi J.B., Stocum D.L. (1983). Surface properties of regenerating limb cells: Evidence for gradation along the proximodistal axis, Differentiation, **25**, 27–31.
Newman S.A. (1974). The interaction of the organizing regions in hydra and its possible relation to the role of the cut end in regeneration, J. Embryol. Exp. Morphol., **31**, 541–555.
Niazi I.A., Saxena S. (1978). Abnormal hind limb regeneration in tadpoles of the toad *Bufo andersonii* exposed to excess vitamin A, Folia Biol., (Krakow), **26**, 3–8.
Nijhout H.F. (1981). The color patterns of butterflies and moths, Sci. Am., **245 (5)**, 140–151.
Pollack E.D., Muhlach W.L. (1981). Stage dependency in eliciting target-dependent enhanced neurite outgrowth from spinal cord explants in vitro, Dev. Biol., **86**, 259–263.
Pollak R.D., Fallon J.F. (1976). Autoradiographic analysis of macromolecular synthesis in prospectively necrotic cells of the chick limb bud. II. Nucleic acids, Exp. Cell Res., **100**, 15–22.
Purves D., Lichtman J.W. (1980). Elimination of synapses in the developing nervous system, Science, **210**, 153–157.
Purves D., Lichtman J.W. (1985). Principles of Neural Development, Sinauer, Sunderland, MA.
Rand H.W., Board J.F., Minnich D.E. (1926). Localization of formative agencies in hydra, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **12**, 565–570.
Redfern P.A. (1970). Neuromuscular transmission in newborn rats, J. Physiol., **209**, 701–709.
Rose S.M. (1962). Tissue-arc control of regeneration in the amphibian limb. In: D. Rudnick (ed.), Regeneration, Ronald, New York, pp. 153–176.
Rosenquist G.C. (1971). The origin and movement of the limb-bud epithelium and mesenchyme in the chick embryo as determined by radioautographic mapping, J. Embryol. Exp. Morphol., **25**, 85–96.

Roth S., Marchase R. B. (1976). An in vitro assay for retinotectal specificity. In: S. H. Barondes (ed.), Neuronal Recognition, Plenum, New York, pp. 227–248.
Roux W. (1881). Der Kampf der Thiele im Organismus. Ein Beitrage zur Vervollständingung der mechanischen Zweckmässigkeitslehre, W. Engelmann, Leipzig.
Rubin L., Saunders J. E., Jr. (1972). Ectodermal–mesodermal interactions in the growth of limbs in the chick embryo; Constancy and temporal limits of the ectodermal induction. Dev. Biol., **28**, 94–112.
Saunders J. W., Jr. (1948). The proximal–distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm, J. Exp. Zool., **108**, 363–404.
Saunders J. W., Jr. (1982). Development Biology, Macmillan, New York.
Saunders J. W., Jr., Fallon J. F. (1966). Cell death in morphogenesis. In: M. Locke (ed.). Major Problems of Developmental Biology, Academic, New York, pp. 289–314.
Saunders J. W., Jr., Gasseling M. T. (1968). Ectodermal–mesodermal interactions in the origin of limb symmetry. In: R. Fleischmajer and R. E. Billingham (eds.), Epithelial-Mesenchymal Interactions, Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 78–97.
Saunders J. W., Jr., Gasseling M. T., Saunders L. C. (1962). Cellular death in morphogenesis of the avian wing. Dev. Biol., **5**, 147–178.
Scadding S. R., Maden M. (1986). The effects of local application of retinoic acid on limb development and regeneration in tadpoles of *Xenopus laevis*, J. Embryol. Exp. Morphol., **91**, 55–63.
Schaller H. C., Schmidt T., Grimmelikhuijzen C. J. P. (1979). Separation and specificity of action of four morphogens from hydra, Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org., **186**, 139–149.
Schmidt T., Schaller H. C. (1976). Evidence for a foot-inhibiting substance in hydra, Cell Differ., **5**, 151–159.
Silver J., Sidman R. L. (1980). A mechanism for guidance and topologic patterning of retinal ganglion cell axons, J. Comp. Neurol., **189**, 101–111.
Singer M. (1954). Induction of regeneration of the forelimb of the postmetamorphic frog by augmentation of the nerve supply, J. Exp. Zool., **126**, 419–472.
Singer M., Norlander R., Egar M. (1979). Axonal guidance during embryogenesis and regeneration in the spinal cord of the newt: The blueprint hypothesis of neuronal pathway patterning, J. Comp. Neurol., **185**, 1–22.
Singer M., Caston J. D. (1972). Neurotrophic dependence of macromolecular synthesis in the early limb regenerate of the newt, *Triturus*, J. Embryol. Exp. Morphol., **28**, 1–11.
Spemann H. (1938). Embryonic Development and Induction, Yale University Press, New Haven.
Sperry R. W. (1951). Mechanisms of neural maturation. In: S. S. Stevens (ed.), Handbook of Experimental Psychology, Wiley, New York, pp. 236–280.
Sperry R. W. (1965). Embryogenesis of behavioral nerve nets. In: R. L. DeHaan and H. Ursprung (eds.), Organogenesis, Holt, Rinehart and Winston, New York, pp. 161–186.
Stocum D. L. (1986). Retinoids: Probes for understanding pattern regeneration in regenerating amphibian limbs. In: R. M. Gorczynski (ed.). Receptors in Cellular Recognition and Developmental Processes, Academic, New York, pp. 165–181.
Stocum D. L., Fallon J. F. (1982). Control of pattern formation in urodele limb ontogeny: A review and a hypothesis, J. Embryol. Exp. Morphol., **69**, 7–36.
Strickland S., Mahadavi V. (1978). The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid, Cell, **15**, 393–403.
Summerbell D. (1974). A quantitative analysis of the effect of excision of the AER from the chick limb bud, J. Embryol. Exp. Morphol., **32**, 651–660.
Summerbell D. (1979). The zone of polarizing activity: Evidence for a role in abnormal chick limb morphogenesis, J. Embryol. Exp. Morphol., **50**, 217–233.
Summerbell D., Lewis J. H. (1975). Time, place and positional value in chick limb bud, J. Embryol. Exp. Morphol., **33**, 621–643.
Taghert P. H., Doe C. Q., Goodman C. S. (1984). Cell determination and regulation during development of neuroblasts and neurones in grasshopper embryo, Nature, **307**, 163–165.
Takano J., Sugiyama T. (1983). Genetic analysis of developmental mechanisms in hydra. VIII. Head-activation and head-inhibition potentials of a slow-budding strain (L4), J. Embryol. Exp. Morphol., **78**, 141–168.
Thaller C., Eichele G. (1987). Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud, Nature, **327**, 625–628.
Thoms S. D., Stocum D. L. (1984). Retinoic acid-induced pattern duplication in regenerating urodele limbs, Dev. Biol., **103**, 319–328.
Tickle C. (1981). The number of polarizing region cells required to specify additional digits in the developing chick wing, Nature, **289**, 295–298.
Tickle C., Alberts B., Wolpert L., Lee J. (1982). Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region, Nature, **296**, 564–566.
Tickle C., Lee J., Eichele G. (1985). A quantitative analysis of the effect of all-*trans*-retinoic acid on the pattern of chick wing development, Dev. Biol., **109**, 82–95.
Tickle C., Summerbell D., Wolpert L. (1975). Positional signalingand specification of digits in chick limb morphogenesis, Nature, **254**, 199–202.
Tinbergen N. (1951). The Study of Instinct, Clarendon Press, Oxford.
Tosney K. W., Landmesser L. T. (1985). Development of the major pathways for neurite outgrowth in the chick hindlimb, Dev. Biol., **109**, 193–214.
Trisler D. (1987). Molecular markers of cell position in avain retina are responsible for synapse formation, Am. Zool., **27**, 189–206.
Trisler D., Collins F. (1987). Corresponding spatial gradiaents of TOP molecules in the developing retina and optic tectum, Science, **237**, 1208–0210.
Trisler D., Bekenstein J., Daniels M. P. (1986). Antibody to a molecular marker of cell position inhibits synapse formation in the retina, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 4194–4198.
Trisler D., Schneider M. D., Nirenberg M. (1981). A topographic gradient of molecules in retina can be used to identify neuron position, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 2145–2149.
Wakeford R. J. (1979). Cell contact and positional communication in hydra, J. Embryol. Exp. Morphol., **54**, 171–183.
Webster C. (1966). Studies on pattern regulation in hydra, II. Factors controlling hypostome formation, J. Embryol. Exp. Morphol., **16**, 105–122.
Webster G., Wolpert L. (1966). Studies of pattern regeneration in hydra, J. Embryol. Exp. Morphol., **16**, 91–104.
Weiss P. (1939). Principles of Development, Holt, Rinehart and Winston, New York.
Weiss P. A. (1955). Nervous system. In: B. H. Willier, P. A. Weiss and V. Hamburger (eds.). Analysis of Development, Saunders, Philadelphia, pp. 346–402.
Whitelaw V., Hollyday M. (1983). Position-dependent motor innervation of the chick hindlimb following serial and parallel duplications of limb segments, J. Neurosci., **3**, 1216–1225.
Wiesel T. N. (1982). Postnatal development of the visual cortex and the influence of the environment, Nature, **299**, 583–591.
Wilby O. K., Webster G. (1970). Experimental studies on axial

polarity in hydra, J. Embryol Exp. Morphol., **24**, 595–613.
Wolbach S.B., Howe P.R. (1925). Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin, J. Exp. Med., **42**, 753–777.
Wolpert L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular formation, J. Theoret. Biol., **25**, 1–47.
Wolpert L. (1971). Positional information and pattern formation, Curr. Top. Dev. Biol., **6**, 183–224.
Wolpert L. (1977). The Development of Pattern and Form in Animals, Carolina Biological, Burlington, NC.
Wolpert L. (1978). Pattern formation in biological development, Sci. Am., **239(4)**, 154–164.
Zipser B., McKay R. (1981). Monoclonal antibodies distinguish identifiable neurones in the leech, Nature, **289**, 549–554.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА К 3-МУ ИЗДАНИЮ

Chevallier A., Kieny M., Mauger M., Sengel P. (1977). Limb-somite relationships: Origin of limb musculature, J. Embryol. Exp. Morphol., **41**, 245–258.
Christ W., Jacob H.J., Jacob M. (1977). Experimental analysis of the origin of wing musculature in avian embryos, Anat. Embryol., **150**, 171–186.
Dollè P., Izpisúa-Belmonte J.-C., Falkenstein H., Renucci A., Duboule D. (1989). Coordinate expression of the murine *Hox-5* complex homeobox-containing genes during limb pattern formation, Nature, **342**, 767–772.
Edwards R.H., Rutter W.J., Hanahan D. (1989). Directed expression of NGF to pancreatic β cells in transgenic mice leads to selective hyperinnervation of the islets. Cell, **58**, 161–170.
Frenz D.A., Jaikaria N.S., Newman S.A. (1989). The mechanism of precartilage mesenchymal condensation: A major role for interaction of the cell surface with the amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. Dev. Biol., **136**, 97–103.
George-Weinstein M., Decker C., Horwitz A. (1988). Combinations of monoclonal antibodies distinguish mesenchyme, myogenic, and chondrogenic precursors of the developing chick embryo, Dev. Biol., **125**, 34–50.
Giguère V., Ong E.S., Evans R.M., Tabin C.J. (1989). Spatial and temporal expression of the retinoic acid receptor in the regenerating amphibian limb, Nature, **337**, 566–570.
Harper S., Davies A.M. (1990). NGF mRNA expression in developing cutaneous epithelium related to innervation density, Development, **110**, 515–519.
Hohn A., Leibrock J., Bailey K., Barde Y.-A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family, Nature, **344**, 339–341.
Korsching S., Thoenen H. (1983). Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 3513–3516.
Levi-Montalcini R., Booker B. (1960). Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to the nerve growth factor protein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **46**, 384–390.
Maden M., Ong D.E., Summerbell D., Chytil F., Hirst E.A. (1989). Cellular retinoic acid-binding protein and the role of retinoic acid in the development of the chick embryo, Dev. Biol., **135**, 124–132.
Maisonpierre P.C., Belluscio L., Squinto S., Ip N.Y., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.D. (1990). Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF, Science, **247**, 1446–1451.
Newman S.A. (1988). Lineage and pattern in the developing vertebrate limb, Trends Genet., **4**, 329–332.
Newman S.A., Frisch H.L. (1979). Dynamics of sceletal pattern formation in developing chick limb, Science, **205**, 662–668.
Newman S.A., Frisch H.L., Percus J.K. (1988). The stationary state analysis of reaction-diffusion mechanisms for biological pattern formation, J. Theoret. Biol., **134**, 183–197.
Oster G.F., Shubin N., Murray J.D., Alberch P. (1988). Evolution and morphogenetic rules: The shape of the vertebrate limb in ontogeny and phylogeny, Evolution, **42**, 862–884.
Pearson J., Johnson E.M. Jr., Brandeis L. (1983). Effects of antibodies to nerve growth factor on intraurine development of derivatives of cranial neural crest and placode in the guinea pig, Dev. Biol., **96**, 32–36.
Prigogine I., Nicolis G. (1967). On symmetry-breaking instabilities in dissipative systems, J. Chem. Phys., **46**, 3542–3550.
Ragsdale C.W. Jr., Petkovich M., Gates P.B., Chambon P., Brockes J.P. (1989). Identification of a novel retinoic acid receptor in regenerative tissues of the newt, Nature, **341**, 654–657.
Ruberte E., Dollè P., Krust A., Zelent A., Morriss-Kay G., Chambon P. (1990). Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis, Development, **108**, 213–222.
Solursh M. (1984). Ectoderm as a determinant of early tissue pattern in the limb bud, Cell Diff., **15**, 17–24.
Turing A.M. (1952). The chemical basis of morphogenesis, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, **237**, 37–72.
Welsh B.J., Gomatam J., Burgess A.E. (1983). Three-dimensional chemical waves in the Belousov-Zhabotinski reaction, Nature, **304**, 611–614.
Winfree A.T. (1974). Rotating chemical reactions, Sci. Am., **230(6)**, 82–95.
Wolpert L., Hornbruch A. (1987). Position signalling and the development of the humerus in the chick limb bud, Development, **100**, 333–338.

Глава 18

Генетика формирования пространственной организации у дрозофилы

Библиотека – беспредельна и незыблема. *Если бы вечному страннику удалось преодолеть преграду времени в несколько столетий, он обнаружил бы те же самые книги, в том же самом беспорядке, повторение которого и создает порядок: Порядок как таковой. Эта мысль скрашивает мое одиночество.*

ЖОРЖ ЛУИ БОРЖЕ (1962)

Беда с этими млекопитающими – среди них нет ни одного занятного мутанта.

У. БЕНДЕР, М. ПАЙФЕР (1987)

Введение

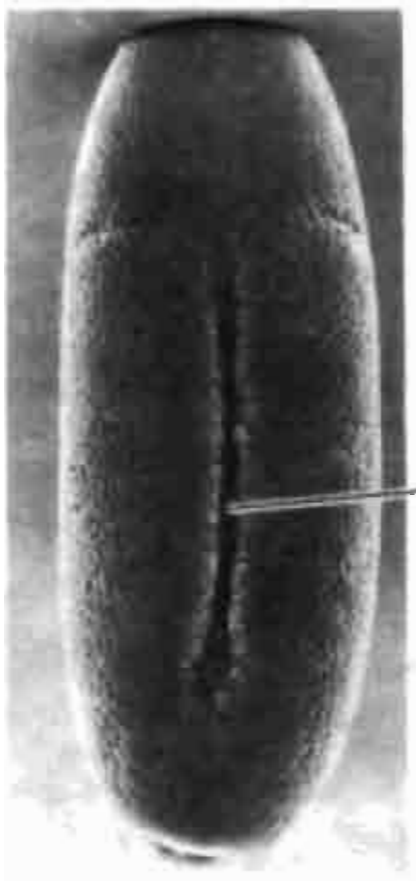
К началу двадцатого столетия генетика, эмбриология и эволюционная биология сформировались как три разные области знания (Mayr, 1982; Raff, Kaufman, 1983). До этого времени их считали единой дисциплиной, используя для ее названия термин *развитие*: например, теорию Дарвина рассматривали как «гипотезу развития». Но к 1926 г. эти науки имели свои журналы, руководства и свою терминологию. Ни генетика, ни эмбриология, ни эволюционное учение друг в друге не нуждались: генетика изучала передачу наследственных признаков из поколения в поколение, эмбриология – проявление этих признаков, а эволюционное учение – возникновение, отбор и закрепление их в ряду поколений.

В конце тридцатых годов были сделаны первые попытки соединить генетику, эмбриологию и эволюционное учение воедино (Goldschmidt, 1938; Just, 1939; Waddington, 1940), однако успехом эти попытки не увенчались. И только в последние годы техника рекомбинантных ДНК и моноклональных антител нивелировала границы этих трех наук. Генетика онто- и филогенетического формирования пространственной организации насекомых стала одной из наиболее значительных областей взаимопроникновения генетики, эмбриологии и эволюционной теории: именно здесь произошла их интеграция, предсказанная Гольдшмидтом и Уоддингтоном.

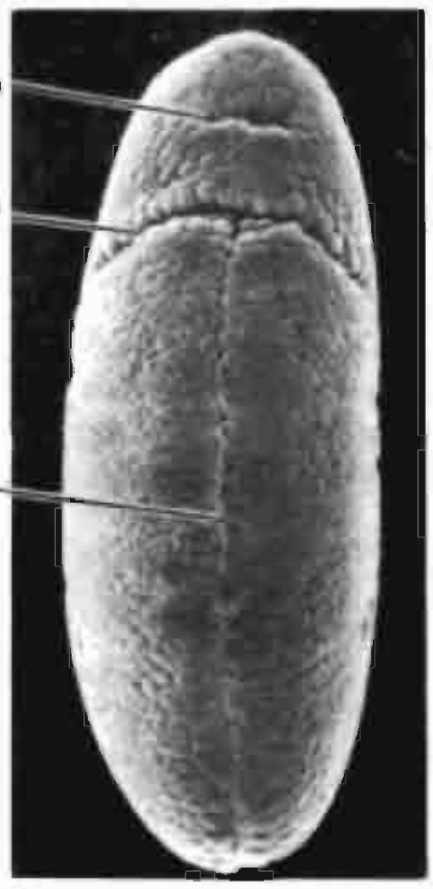
Успех изучения пространственной организации у зародыша оказался возможным благодаря использованию наследственных изменений – мутаций. И здесь ученым неоценимую услугу оказала плодовая муха – дрозофила, поскольку из всех эукариот генетика именно этого организма была изучена наиболее полно. Анализ путей, посредством которых мутации оказывают влияние на пространственную организацию, а она в свою очередь определяет дифференцировку генетически маркированных тканей, стал ключом к пониманию механизмов морфогенеза.

Краткий обзор развития дрозофилы

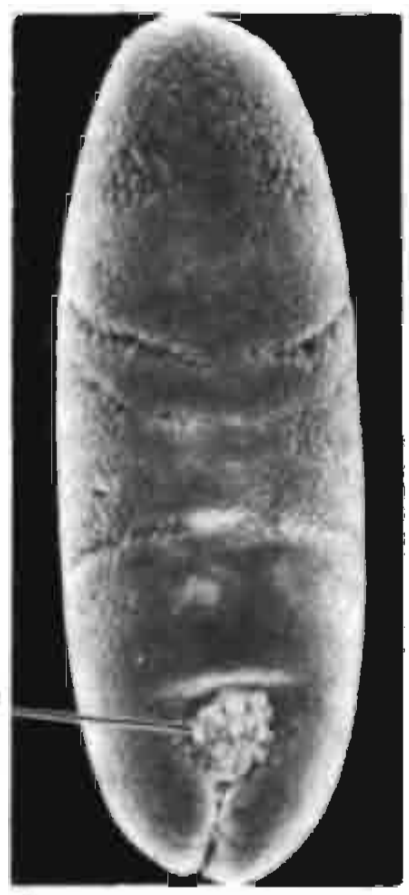
Как уже обсуждалось в гл. 3, в ранних зародышах дрозофилы происходят быстрые деления ядер, в результате чего формируется синцитиальная бластодерма. Во время девятого цикла около 5 ядер мигрируют в цитоплазму заднего полюса яйца. Здесь они окружаются клеточными мембранами, становясь клетками, дающими начало гаметам взрослого насекомого. К десятому циклу бóльшая часть оставшихся ядер достигает периферии яйца и претерпевает здесь четыре парасинхронных деления. После 13-го деления клеточные мембраны окружают каждое ядро, формируя таким образом клеточную бластодерму, состоящую из 6000 клеток (Turner, Mahowald, 1977; Foe, Alberts, 1983). С 14-го деления в ядрах бластодермальных клеток резко



А



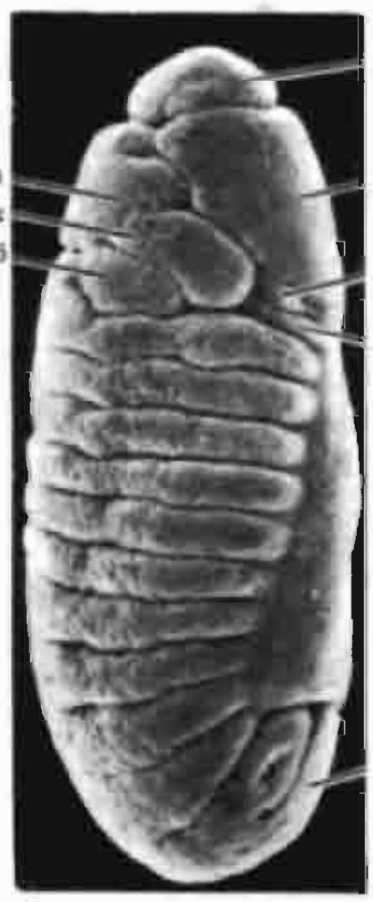
Б



В



Г



Д



Е

Рис. 18.1. Гаструляция у дрозофилы. *А*. Формирование вентральной борозды в результате миграции клеток к средней линии. *Б*. Инвагинация вентральной борозды. *В*. Зародыш (несколько старше предыдущего) с дорсальной стороны. Видны мигрирующие внутрь полярные клетки и энтодерма. *Г*. Вид сбоку: удлинение зародышевой полоски. Формирующиеся сегменты обозначены следующим образом: Ма – мандибулярный (нижнечелюстной); Мк – максиллярный (верхнечелюстной); Лб – лабиальный (нижнегубной); Т1 – Т3 – торакальные (грудные); А1 – А8 – абдоминальные (брюшные). *Д*. Сокращение зародышевой полоски. Отмечены клипеолабрум (наличник верхней губы), процефалическая область (передняя часть головы), зрительный и дорсальный гребень. *Е*. Вылупившаяся личинка первого возраста. (Фотографии с любезного разрешения F. R. Turner.)

возрастает уровень транскрипционной активности, весьма низкий до этой стадии. Клетки становятся подвижными, и начинается следующая стадия развития – гаструляция (Edgar, Schubiger, 1986). Описанные изменения происходят в течение первых двух-трех часов развития.

Результатом гаструляции является образование трех зародышевых листков: мезодермы, энтодермы и эктодермы (рис. 18.1). Около тысячи клеток вдоль вентральной срединной линии, составляющие проспективную мезодерму, формируют **вентральную борозду,** края которой сходятся, и она замыкается в трубку. Эта трубка уплощается и образует под вентральной эктодермой мезодермальный зародышевый листок. Инвагинирующие массы клеток в начале и конце вентральной борозды дают начало энтодерме насекомого. Гаструляционные перемещения клеток энтодермы увлекают за собой полярные клетки и они попадают внутрь зародыша. В это время в передней части зародыша образуется **головная (цефалическая) складка,** а на дорсальной стороне **передние** и **задние поперечные складки.**

Оставшиеся на поверхности зародыша клетки, мигрируя в тангентальном направлении, подтягиваются к вентральной срединной линии. Образовавшееся скопление клеток носит название **зародышевой полоски.** Эта полоска начинает перемещаться к заднему полюсу, огибает его и продолжает движение на дорсальной стороне в направлении переднего полюса. В результате презумптивные структуры задних отделов личинки на дорсальной стороне зародыша располагаются в непосредственной близости от проспективных головных структур. На этой стадии развития у зародышей дрозофилы начинают формироваться сегменты, и происходит топографическое разделение эктодермального и мезодермального зародышевых листков. Вскоре зародышевая полоска начинает сокращаться и это приводит к восстановлению ее исходной топологии. Именно на этой стадии онтогенеза дрозофилы из поверхностной эктодермы сегрегируют клетки, предшественники имагинальных дисков, а из продольного клеточного тяжа вдоль вентральной срединной линии – нейробласты, родоначальники клеток нервной системы (см. гл. 9). В отличие от нервной системы позвоночных нервная трубка насекомых формируется в вентральной области зародыша, она возникает из нейробластов, дифференцирующихся в вентральной нейрогенной эктодерме каждого сегмента и в процефалической нейрогенной эктодерме головы.

Возникновение переднезадней полярности

Яйцо, зародыш, личинка и имаго дрозофилы характеризуются переднезадней полярностью. Ооцит развивается так, что один его конец (будущий передний) непосредственно соединяется с цитоплазмой фолликулярных питающих клеток, которые снабжают яйцо белками, рибосомами и мРНК. На противоположном конце яйца накапливается полярная плазма, дающая начало первичным половым клеткам взрослого насекомого (гл. 7). У зародыша, личинки и взрослого насекомого можно легко различить головной отдел и хвостовой конец, между которыми располагаются повторяющиеся единицы – сегменты. Три сегмента образуют грудь, а оставшиеся восемь – брюшко. Каждый сегмент взрослой мухи характеризуется своими особыми чертами. Первый грудной сегмент, например, несет только ноги; второй грудной сегмент имеет и ноги, и крылья. Третий грудной сегмент несет ноги и жужжальца (балансёры). Грудные и брюшные сегменты различаются также по строению кутикулы.

Каким образом полярность на уровне яйца дрозофилы переходит в полярность на уровне взрослого организма с его повторяющимися, но тем не менее индивидуализированными сегментами? За последние полтора десятилетия были собраны данные, на основе которых была предложена модель возникновения такой полярности (рис. 18.2). Полагают, что, во-первых, материнская мРНК, депонируемая в разных областях яйца, кодирует регулирующие транскрипцию и трансляцию белки, которые диффундируют на стадии синцитиальной бластодермы и активируют (либо репрессируют) определенные гены зиготы. Во-вторых, гены зиготы, регулируемые факторами материнского происхождения, экспрессируются в широких (около трех сегментов) доменах, которые перекрываются друг с другом. Эти гены названы **gap-генами** (потому что у мутантов по ним отсутствует несколько сегментов). Именно эти гены первыми активируются в развивающемся зародыше. В-третьих, разные концентрации белковых продуктов генов gap-группы активируют гены группы pair-rule, которые транскрибируются в клетках презумптивных зачатков каждого второго сегмента. Транскрипционный паттерн каждого из генов группы pair-rule характеризуется тигровым рисунком и состоит из 7 вертикальных полос клеток по всей длине зародыша. Продукты транскрипции генов группы pair-rule активируют транскрипцию генов группы segment-polarity. м-РНК и соответствующие ей белки генов группы segment-polarity формируют 14 полос, которые разделяют зародыш на сегменты. В это же время продукты генов групп gap, pair-rule и segment-polarity взаимо-

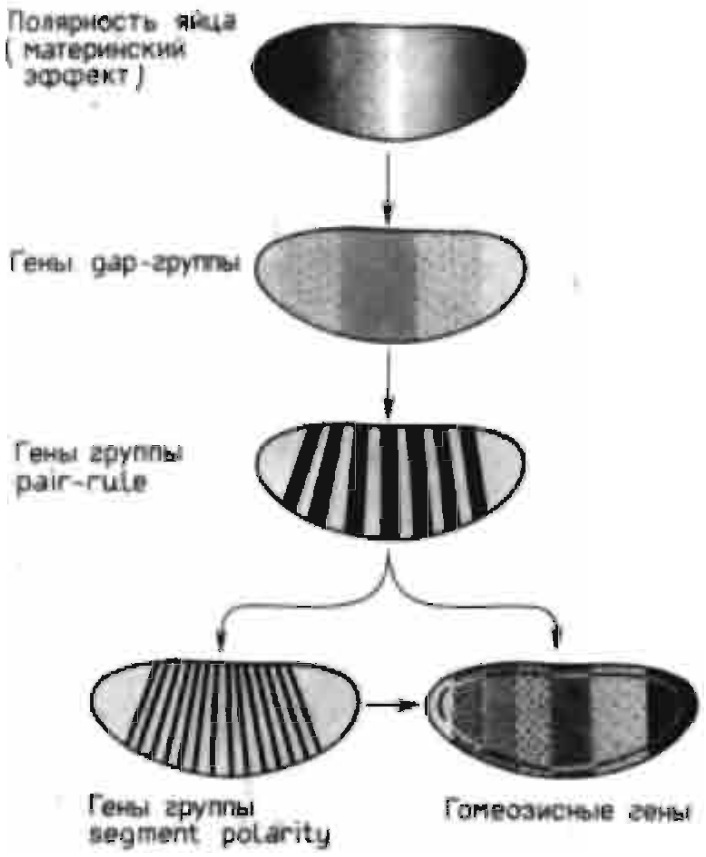


Рис. 18.2. Общая схема формирования сегментарной структуры у дрозофилы. Такая структура формируется в результате активности генов с материнским эффектом, продукты которых образуют градиенты и области с морфогенетически активными белками. Эти морфогенетические детерминанты активируют гены gap-группы, разделяющие зародыш на широкие домены. Гены gap-группы включают гены группы pair-rule, обусловливающие подразделение зародыша на презумптивные зачатки шириной по два сегмента. Затем гены группы segment-polarity подразделяют зародыш на сегментарные единицы по всей продольной оси. Комбинации активности этих генов регулируют работу гомеозисных генов, определяющих морфологическую специфику каждого сегмента.

действуют друг с другом и активируют гомеозисные (homeiotic) гены.

Гены с материнским эффектом

Эмбриологические данные, касающиеся регуляции становления полярности цитоплазмой яйца

Результаты классических эмбриологических экспериментов свидетельствуют о существовании в яйцах насекомых по крайней мере двух **организующих центров: переднего и заднего.** Сандер (Sander, 1975) постулировал, что именно эти области яйца формируют два градиента: в передней и задней частях зародыша. Каждый из градиентов определяет формирование специфических структур, а их взаимодействие обусловливает морфогенез центральных сегментов зародыша. Создавая свою модель, Сандер основывался на экспериментах по наложению лигатуры на зародыши в различные периоды эмбриогенеза и по трансплантации полярной плазмы из одной части яйца в другую (рис. 18.3). Во-первых, если он пересаживал цитоплазму из области заднего полюса в центральную часть яйца, то в передней части развивался миниатюрный зародыш, имеющий полный набор сегментов, а в задней части яйца формировались лишь отдельные сегменты. Во-вторых, наложение лигатуры, разделяющей переднюю и заднюю части яйца, на ранних стадиях онтогенеза приводило к развитию в передней части передних сегментов, а в задней части – задних сегментов, причем ни один из изолятов не содержал центральных сегментов, характерных для их нормального набора. Чем позже накладывалась лигатура, тем больше развивалось центральных сегментов. На основе полученных данных Сандер предположил, что во время дробления в зародыше существуют два градиента, которые распространяются от обоих полюсов и, взаимодействуя друг с другом, создают позиционную информацию, определяющую идентичность каждого сегмента.

То, что мРНК ответственна за генерирование этого градиента, было показано в серии эксперимен-

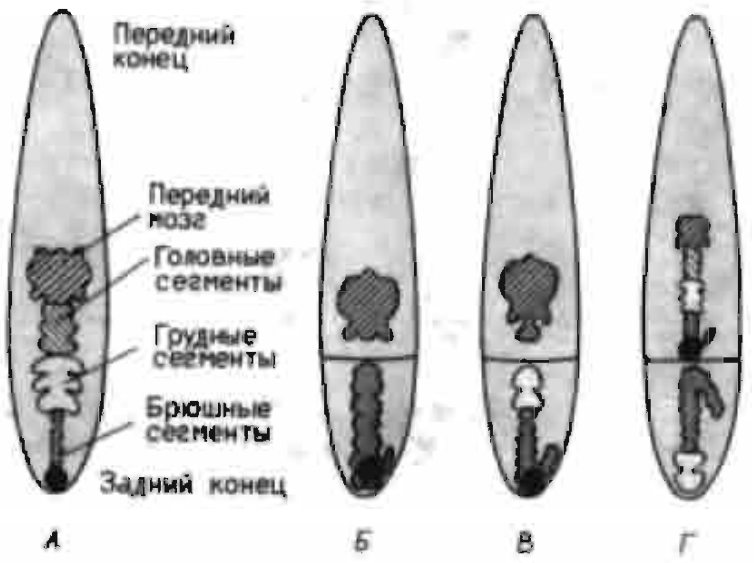


Рис. 18.3. Эксперименты Сандера по наложению лигатуры на яйца кузнечика *Euscelis*. *А*. Нормальный зародыш с вентральной стороны. Черный шар на заднем полюсе яйца – бактериальный симбионт насекомого, маркирующий полярную плазму. *Б*. После наложения лигатуры на ранних стадиях развития формируются неполные зародыши, у которых отсутствуют головные и грудные сегменты. *В*. При наложении лигатуры на более поздних стадиях онтогенеза (на стадии бластодермы) часть «пропущенных» сегментов развивается, а другая часть (центральные сегменты) не развивается. *Г*. При пересадке цитоплазмы заднего полюса яйца в зародыш с наложенной на стадии бластодермы лигатурой в переднем изоляте формируется миниатюрный зародыш с полным набором сегментов, а в заднем изоляте – «неполный» зародыш с инвертированной полярностью. Полученные результаты можно объяснить с помощью градиентной модели, согласно которой в передней и задней областях зародыша возникают градиенты, разрешающие формирование одних структур и запрещающие формирование других. (По Sander, 1960; French, 1988.)

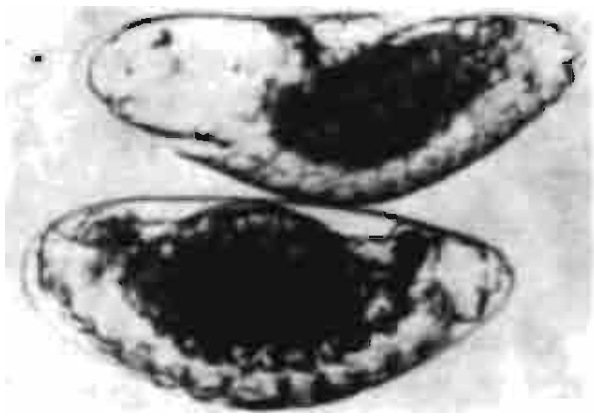


Рис. 18.4. Нормальный и облученный зародыши *Smittia*. Нормальный (*вверху*) зародыш имеет голову (*слева*) и брюшные сегменты (*справа*). У облученного УФ-светом зародыша отсутствует голова, однако формируется второе брюшко с передней стороны. (По Kalthoff, 1969; фотографии с любезного разрешения K. Kalthoff.)

тов (Kalthoff, Sander, 1968). Облучение переднего полюса яйца комара *Smittia* УФ-светом с длиной волны 265 и 285 нм, который, как известно, инактивирует РНК, приводило к формированию зародышей без головы и груди. Вместо этого у них развивалось второе брюшко, являющееся зеркальным отражением уже имеющегося (рис. 18.4). Дополнительные данные, свидетельствующие о важной роли РНК в спецификации (детализации) развития передних отделов зародыша мухи, были получены Кэндлер-Сингером и Колтхофом (Kandler-Singer, Kalthoff, 1976). Эти исследователи погружали яйца *Smittia* в растворы, содержащие различные ферменты, и затем брали пункцию из интересующих их областей яйца. Зародыши с двойным брюшком развивались из яиц, в передний полюс которых могла проникать рибонуклеаза (фермент, расщепляющий РНК). Другие ферменты не вызывали подобного эффекта, как и не вызывало его проникновение рибонуклеазы в другие области яйца.

Передний организующий центр: градиент белка bicoid

В 1988 г. гипотеза градиентного распределения морфогена была проверена генетическим методом анализа эмбриогенеза дрозофилы. Если действительно существуют градиенты морфогенов, то какова природа этих морфогенов, и как изменяется их концентрация в цитоплазме? Какие гены ответственны за формирование этих градиентов? Действуют ли эти вещества как активаторы или как ингибиторы определенных генов в тех областях, где они концентрируются? Кристина Нюсслейн-Вольхард с коллегами обнаружила, что одни гены кодируют градиент морфогенов для структур передней части зародыша, другие гены отвечают за синтез морфо-

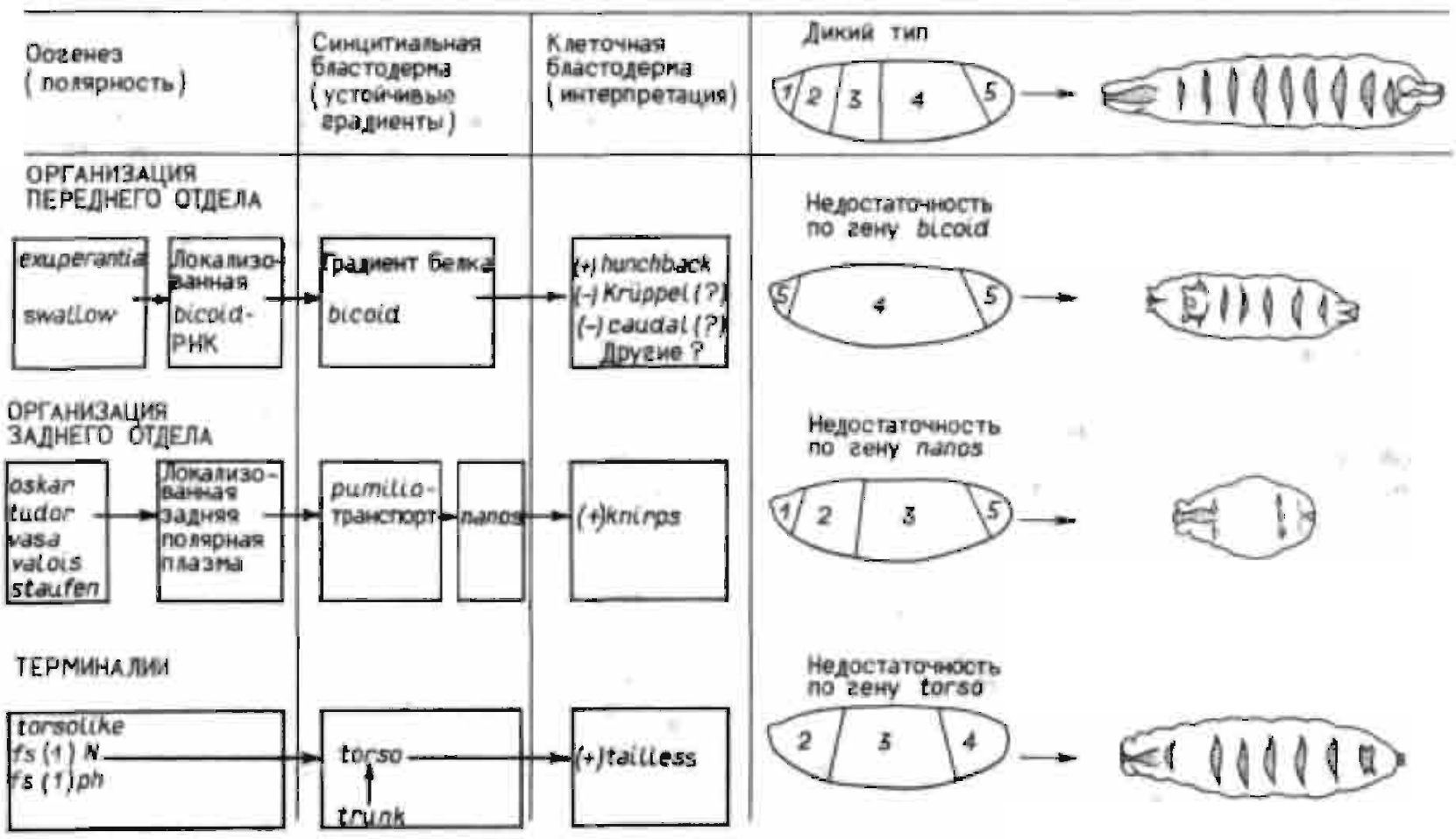


Рис. 18.5. Три независимых пути генетической регуляции становления сегментарной структуры у дрозофилы. В каждом случае первоначальная полярность устанавливается во время оогенеза, а после оплодотворения запасенные морфогены определяют формирование сегментарной структуры посредством активации или репрессии специфических генов зиготы в различных областях. *1* – акрон, *2* – голова, *3* – грудь, *4* – брюшко, *5* – тельсон. (По Anderson, 1989.)

Таблица 18.1. Гены с материнским эффектом, контролирующие переднезаднюю полярность зародыша

Ген	Фенотип	Предполагаемая функция и структура
ПЕРЕДНЯЯ ГРУППА		
bicoid (bcd)	Отсутствует голова и грудь, на их месте – инвертированный тельсон	Градиент переднего детерминанта; содержит гомеодомен
exuperantia (exu)	Отсутствуют передние головные структуры	Заякоривает мРНК гена *bicoid*
swallow (swa)	Отсутствуют передние головные структуры	Заякоривает мРНК гена *bicoid*
ЗАДНЯЯ ГРУППА		
tudor (tud)	Отсутствуют брюшко и полярные клетки	
oskar (osk)	Отсутствуют брюшко и полярные клетки	
vasa (vas)	Отсутствуют брюшко и полярные клетки; нарушен оогенез	
valois (val)	Отсутствуют брюшко и полярные клетки; нарушено формирование клеток	
staufen (stau)	Отсутствуют брюшко и полярные клетки; дефекты головы	
nanos (nos)	Отсутствует брюшко	Задний морфоген
pumilio (pum)	Отсутствует брюшко	Транспорт заднего морфогена вперед
Bicaudal (Bic)	Двойное брюшко	Возможный сайт прикрепления для белка nanos
ТЕРМИНАЛЬНАЯ ГРУППА		
torso (tor)	Отсутствуют терминальные структуры	Возможный морфоген для терминальных структур
trunk (trk)	Отсутствуют терминальные структуры	
torsolike (tsl)	Отсутствуют терминальные структуры	
ts (1) Nasrat [fs (1) N]	Отсутствуют терминальные структуры, уменьшение размеров яиц	
fs (1) pole hole [fs (1) ph]	Отсутствуют терминальные структуры, уменьшение размеров яиц	

По Andersson, 1989.

генов, обусловливающих образование структур брюшной области зародыша, и третья группа генов кодирует биосинтез морфогенов, контролирующих возникновение структур терминальных областей зародыша (рис. 18.5; табл. 18.1).

Если исходить из градиентной гипотезы, то наиболее интересным у дрозофилы оказался мутантный фенотип bicoid. У мутантов bicoid вместо передних структур (акрона, головы и груди), брюшных структур и тельсона формируется дополнительный тельсон в передней части зародыша, брюшко и тельсон (рис. 18.6). По-видимому, у мутантных зародышей отсутствует морфоген, необходимый для формирования передних структур. Кроме того, можно предположить, что вещества, которые отсутствуют у этих мутантов, необходимы для включения генов, контролирующих формирование передних структур, и инактивации генов, контролирующих образование тельсона.

Полученные несколько лет тому назад данные укрепили точку зрения о том, что продукт нормального аллеля гена *bicoid (bcd)* является морфогеном, контролирующим формирование передних структур зародыша. В пользу этого свидетельствует, во-первых, то, что ген *bicoid* проявляет материнский эффект. Ген *bicoid* материнского генома транскрибиру-

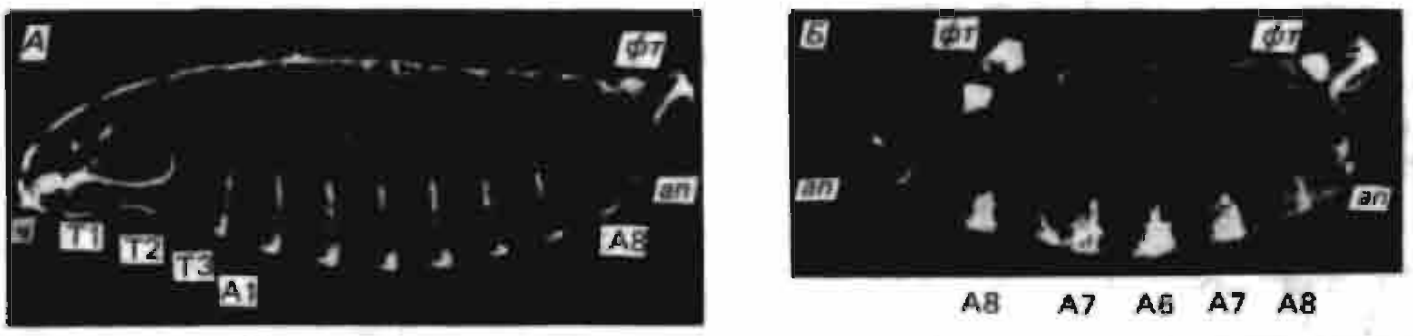


Рис. 18.6. Фенотип зародышей, развившихся из яиц, отложенных самками, мутантными по сильным аллелям гена *bicoid*. *А*. Кутикула у зародыша дикого типа. *Б*. Мутант bicoid. Голова и грудь замещены набором структур тельсона. Структуры тельсона: *фт* – фильтрующее тело, *ап* – анальные пластинки. Т1 – Т3 – грудные (торакальные) сегменты, А1 – А8 – брюшные (абдоминальные) сегменты. Головные структуры: ч – челюсти. (По Driever et al., 1990; фотографии с любезного разрешения W. Driever.)

ется в клетках овариолы яичника (Frigerio et al., 1986; Berleth et al., 1988). Введение очищенной bicoid-мРНК или цитоплазмы переднего отдела, полученной из яиц дикого типа, в передний отдел мутантных по гену *bicoid* зародышей, восстанавливает нормальный фенотип мутанта. Более того, в какую бы область зародыша ни вводили цитоплазму переднего полюса, в этой области образовывались головные структуры.

Матричная РНК гена *bicoid* локализована исключительно в передней части ооцита (рис. 18.7,*А*). Это не согласуется с предполагаемой ролью продукта гена *bicoid* как морфогена, онтогенетическое влияние которого распространяется далее, чем до середины яйца. Однако было установлено (Driever, Nüsslein-Volhard, 1988a), что при трансляции мРНК во время ранних делений дробления белковый продукт гена *bicoid* формирует градиент с наибольшей концентрацией в передней части яйца и фоновой концентрацией в его задней трети. Кроме того, этот белок вскоре связывается с ядрами синцития передней части зародыша (рис. 18.7,*Б*).

Дополнительные данные о том, что белковый продукт гена *bicoid* является морфогеном передних структур, были получены в экспериментах по изменению «крутизны» градиента. Два гена, *exuperantia* и *swallow* отвечают за стабилизацию морфогена в переднем полюсе яйца. При отсутствии продуктов этих генов градиент белка bicoid распространяется ближе к заднему полюсу, т. е. становится более пологим (Driever, Nüsslein-Volhard, 1988). Фенотип этих мутантов напоминает фенотип мутантов bicoid. У мутантных зародышей отсутствуют самые передние структуры, но формируются удлиненные челюсти и грудные структуры. Таким образом, изменение градиента белка гена *bicoid* приводит к нарушению онтогенетической судьбы эмбриональных зачатков.

Далее возникает следующий вопрос: каким образом градиент белка bicoid может контролировать становление переднезадней оси. Одним из ключей к решению этого вопроса явился тот факт, что белок bicoid обнаружен в ядрах и что он содержит гомеодомен. Следовательно, белок гена *bicoid* может связываться с ДНК и регулировать таким образом экспрессию генов. Самыми ранними генами, активирующимися в зиготе, являются гены gap-группы. У мутантов по одному из них, гену *hunchback (hb)*, отсутствуют ротовые части и структуры груди. Кроме того, ген *hunchback* активируется в передней половине зародыша там же, где обнаружен продукт гена *bicoid*. В конце восьмидесятых годов в двух независимых друг от друга лабораториях установлено, что белок гена *bicoid* связывается с геном *hunchback* и таким образом активирует его экспрессию (Driever, Nüsslein-Volhardt, 1989; Struhl et al., 1989). Полагают, что ген *hunchback* репрессирует гены, активные в брюшных сегментах, благодаря чему в областях его активности, совпадающих с наличием белка гена *bicoid*, формируются головные и грудные структуры. Использование метода футпринтинга ДНК позволило обнаружить присоединение белка гена *bicoid* к пяти сайтам, расположенным выше промотора гена *hunchback*. Все сайты присоединения имели общую последовательность

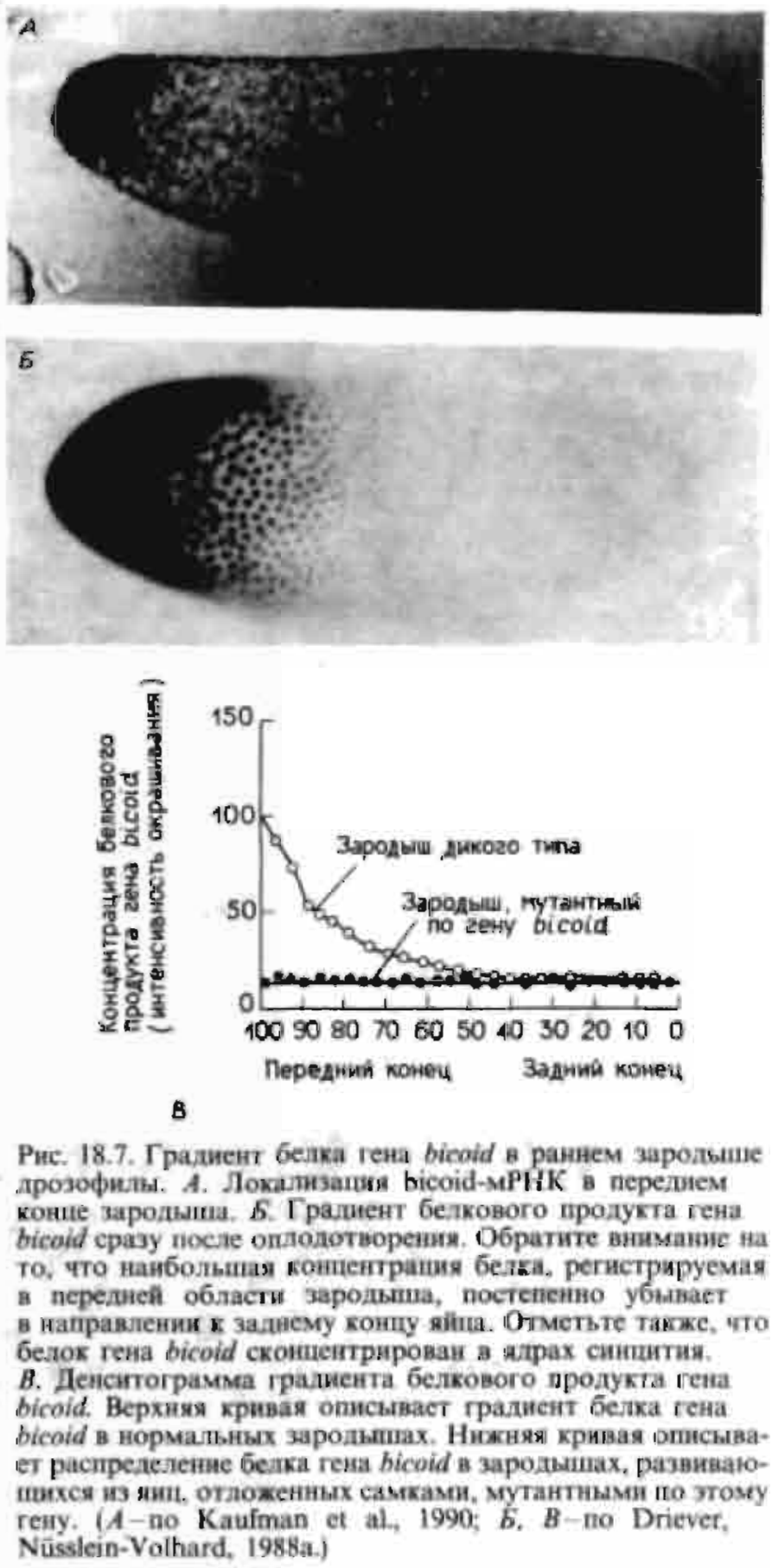


Рис. 18.7. Градиент белка гена *bicoid* в раннем зародыше дрозофилы. *А*. Локализация bicoid-мРНК в переднем конце зародыша. *Б*. Градиент белкового продукта гена *bicoid* сразу после оплодотворения. Обратите внимание на то, что наибольшая концентрация белка, регистрируемая в передней области зародыша, постепенно убывает в направлении к заднему концу яйца. Отметьте также, что белок гена *bicoid* сконцентрирован в ядрах синцития. *В*. Денситограмма градиента белкового продукта гена *bicoid*. Верхняя кривая описывает градиент белка гена *bicoid* в нормальных зародышах. Нижняя кривая описывает распределение белка гена *bicoid* в зародышах, развивающихся из яиц, отложенных самками, мутантными по этому гену. (*А* – по Kaufman et al., 1990; *Б*, *В* – по Driever, Nüsslein-Volhard, 1988a.)

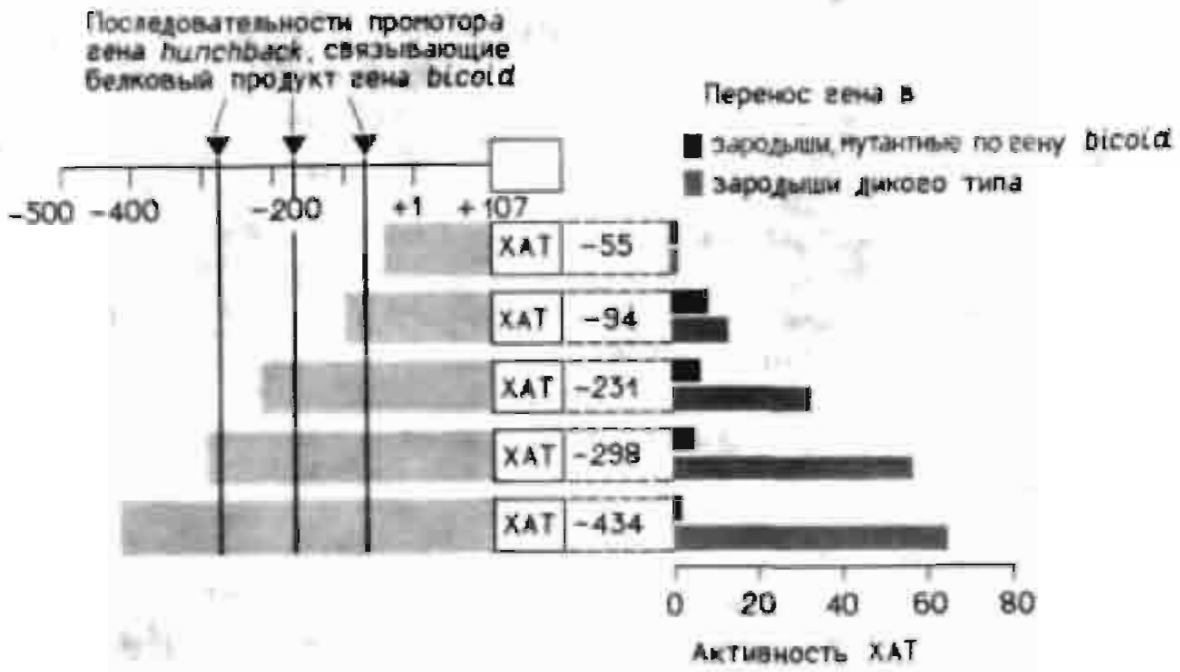


Рис. 18.8. Влияние белка гена *bicoid* на активацию гена *hunchback*. Генноинженерные конструкции, содержащие различные участки промотора гена *hunchback*, соединенные с маркерным геном хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (ген *CAT*), были введены в зародышей дикого типа и зародышей, развивающихся из яиц, отложенных самками, мутантными по гену *bicoid*. Активность гена *CAT* в нормальных зародышах оказалась прямо пропорциональной количеству bicoid-связывающих последовательностей в промоторной области. У зародышей, у которых белок гена *bicoid* отсутствовал, промоторы разных конструкций не активировали транскрипцию. (По Driever, Nüsslein-Volhard, 1989.) (На рис. ген *CAT* обозначен как XAT.)

5′–ТЦТААТЦЦЦ–3′. Однако связывание еще не означает активации. Активация этого гена белком гена *bicoid* была показана посредством введения в ранние зародыши дрозофилы генетической конструкции, содержащей промотор гена *hunchback* и маркерный ген хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (ген *CAT*). Во всех экспериментах для активации гена *CAT* был необходим белок гена *bicoid*. При введении конструкции в мутантные по гену *bicoid* зародыши ген *CAT* не активировался (рис. 18.8). Было также показано, что в присутствии одной из пяти bicoid-связывающих последовательностей ген *CAT* активируется частично, а полная активация гена *CAT* (и, вероятно, также гена *hunchback*) имеет место при наличии трех из пяти последовательностей. Таким образом, функция градиента гена *bicoid*, вероятно, состоит в активации транскрипции гена *hunchback* в передней части зародыша.

Дривер с коллегами предположили, что продуктом гена *bicoid* активируется не только ген *hunchback*, но и другие гены, контролирующие становление пространственной организации передней части зародыша. Об этом свидетельствуют, во-первых, делеции гена *hunchback*, из которых только некоторые вызывают нарушения морфогенеза у мутантов bicoid. Во-вторых, как уже было отмечено в экспериментах с использованием генов *exuperantia* и *swallow*, для формирования груди (т. е. экспрессии гена *hunchback*) достаточно средних концентраций белка bicoid, тогда как для образования головных структур требуются более высокие концентрации морфогена. Дривер и др. (Driever et al., 1989) высказали предположение, что промоторы генов gap-группы, экспрессирующихся в головных структурах, должны иметь низкое сродство к белку гена *bicoid*, и для их активации необходима чрезвычайно высокая концентрация белка-активатора, а такая концентрация возможна только в области переднего полюса зародыша. Позиционная судьба любой клетки определяется как уровнем концентрации морфогена (продукта гена *bicoid*), так и активностью тех генов, которые могут связывать морфоген, если он имеется.

Задний организующий центр: активация и транспорт продукта гена *nanos*

Задний организующий центр формируется благодаря экспрессии семи генов с материнским эффектом, отсутствие которых у матери приводит к отсутствию брюшка у зародышей (Schüpbach, Wieschaus, 1986; Lehmann, Nüsslein-Volhard, 1986). Задний организующий центр имеет две особенности, отличающие его от переднего центра. Во-первых, его поражение нарушает формирование брюшной области зародыша, но при этом не происходит замещения этой области другими структурами. Иными словами, область грудных структур у мутантов не распространяется в область брюшных сегментов, т. е. клетки задних отделов у мутантов оказываются неспособными формировать структуры брюшка. Во-вторых, результаты экспериментов по пересадке цитоплазмы показали, что задний организующий центр локализован не в области самого брюшка (т. е. не в той области, которая соответствует дефекту). Вероятнее, что он локализован в области заднего полюса яйца. Формирование абдоминальных сегментов у мутантных зародышей может быть восстановлено инъекцией цитоплазмы яиц дикого типа, правда, только в том случае, если эту цитоплазму инъецируют в область брюшка дефектных яиц. Однако цитоплазма дикого типа должна быть взята из области заднего полюса, но не из брюшной части зародыша. Таким образом, некоторые продукты, синтезируемые в области заднего полюса, транспортируются вперед, в область брюшных сегментов зародыша.

Распространено мнение, что для активации нормального аллеля гена *nanos* необходимо пять генов с материнским эффектом *nanos* (рис. 18.5). Продукт гена *nanos* будет регулировать экспрессию генов в брюшной области. Если при формировании передней части зародыша происходит активация гена (продукт гена *bicoid* активирует ген *hunchback*), то в формировании брюшка дрозофилы участвует система, в которой должны быть ингибированы ингибиторы. Было показано (Tautz, 1988), что при формировании нормального брюшка белковый продукт гена *nanos* подавляет *трансляцию* гена *hunchback*. Отсутствие продукта гена *nanos* приводит к появлению продукта гена *hunchback*, который, по-видимому, ингибирует специфические для брюшка гены gap-группы, такие, как *knirps* и *Krüppel* (Hülskamp et al., 1989; Struhl, 1989; Irish et al., 1989). Следовательно, представляется вероятным, что ген *hunchback* играет решающую роль в регуляции обоих организующих центров, о существовании которых у насекомых было известно давно. Присутствие белка гена *bicoid* активирует транскрипцию гена *hunchback* в передней (но не в задней) части зародыша. Этот белок выключает гены gap-группы, специфические для брюшка, например ген *knirps*, и активирует наборы генов, специфических для головы и груди. Продукт гена *nanos* инактивирует синтез любого продукта гена *hunchback* в задней части зародыша и поэтому разрешает в данном регионе яйца экспрессию генов, специфических для морфогенеза брюшка (рис. 18.9). Результаты изучения экспрессии генов *nanos* и *bicoid* позволяют объяснить, почему разрушение мРНК гена *bicoid* (УФ-светом или РНКазой) приводит к формированию второго брюшка и почему наложение лигатуры препятствует морфогенезу центральных сегментов зародыша дрозофилы.

Однако продукт гена *nanos* каким-то образом должен быть доставлен из заднего полюса в область брюшных сегментов. Это, по-видимому, является функцией продукта гена *pumilio* (Lehmann, Nüsslein-Volhard, 1987). Если *полярную плазму* одного мутанта pumilio пересадить в *брюшную область* другого мутанта pumilio, то у зародыша-хозяина восстанавливаются брюшные сегменты. Кроме того, если удалить несколько сегментов между задним полюсом и областью брюшка, то сегментация брюшка у мутантов pumilio восстанавливается (за счет уменьшения расстояния между задним организующим центром и брюшком).

Коль скоро продукт гена *nanos* перемещается из заднего организующего центра, возникает вопрос о его локализации в цитозоле яйца. Существуют данные о том, что ген *BicaudalD* кодирует места связывания морфогена с цитоскелетом. Мутанты BicaudalD аккумулируют белок гена *nanos* на обоих полюсах, что приводит к его активности в переднем и заднем концах зародыша и обусловливает формирование зеркально симметричных абдоменов (рис. 18.10).

Группа генов, контролирующих формирование терминальных структур

В том случае, если оба организующих центра окажутся нефункциональными, в зародыше тем не

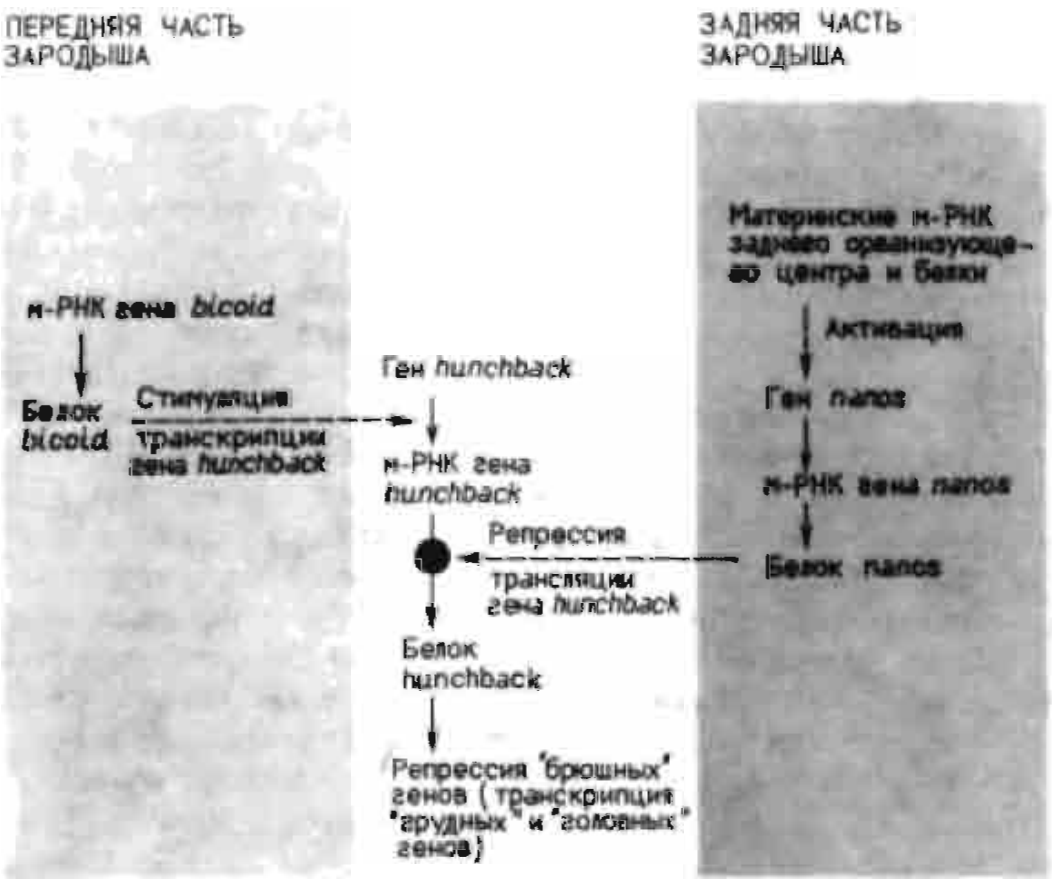


Рис. 18.9. Схема активации белковых продуктов генов *bicoid* и *nanos* при установлении переднезадней полярности зародыша. В передней части зародыша белок гена *bicoid* активирует транскрипцию гена *hunchback*, а белок гена *nanos* не запрещает трансляцию этой информации. В задней части зародыша белок гена *nanos* подавляет трансляцию гена *hunchback* и тем самым допускает экспрессию генов, специфических для брюшной области.

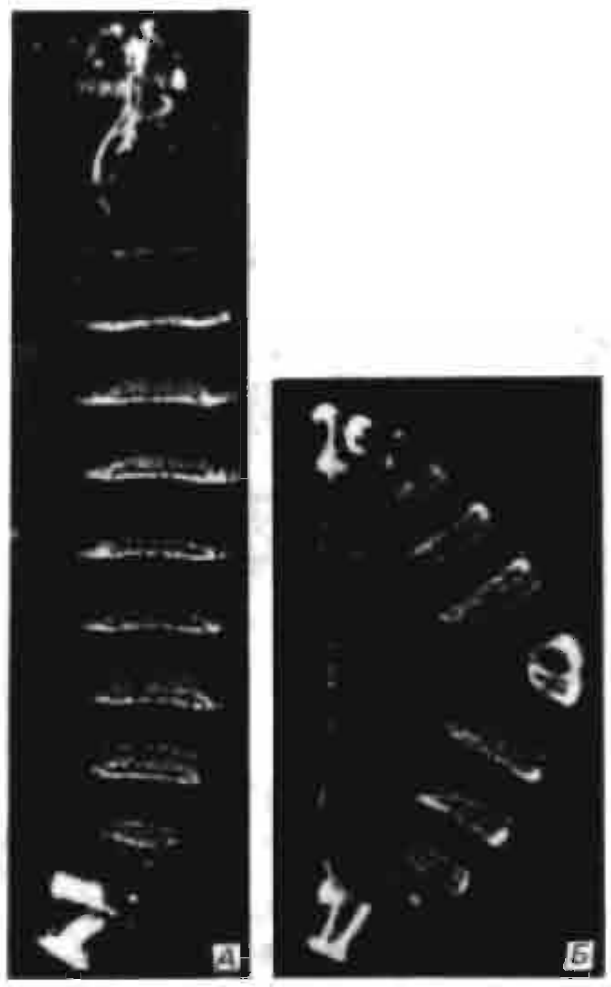


Рис. 18.10. Возможная функция гена *BicaudalD* состоит в локализации продукта гена *nanos*. *А*. Темнопольное изображение брюшной части нормального зародыша. *Б*. У мутантного по гену *BicaudalD* зародыша голова, грудь и передние брюшные сегменты замещены зеркально расположенными задними брюшными сегментами и тельсоном. (По Wharton, Struhl, 1989.)

менее будут формироваться передние и задние структуры (Nüsslein-Volhard et al., 1987). Самки, являющиеся двойными мутантами по генам, которые отвечают за биосинтез морфогенов передних и задних структур, дают в потомстве зародышей с двумя тельсонами, по одному на каждом полюсе. Таким образом, существует третья батарея генов с материнским эффектом, контролирующих становление продольной полярности зародыша. Мутации по данной группе генов (генов терминальных структур) нарушают формирование несегментированных придатков зародыша: акрона в передней части зародыша и тельсона в задней. Следовательно, эти гены определяют границы между сегментированными и несегментированными частями тела. При отсутствии продуктов этих генов сегментация распространяется на несегментированные придатки (Degelmann et al., 1986; Klingler et al., 1988).

Наиболее важным геном этой группы, по-видимому, является ген *torso* (рис. 18.5). При отсутствии продукта гена *torso* ни акрон, ни тельсон не формируются, и зародыш оказывается полностью сегментированным. Напротив, у доминантных мутантов по этому гену вся передняя половина зародыша превращается в акрон, а задняя – в тельсон. Мутантные по гену *torso* зародыши восстанавливают нормальную структуру при инъекции цитоплазмы нормальных яиц в передний и задний полюсы яйца. Инъекция в середину яйца оказывается неэффективной. Восстанавливающей активностью обладает цитоплазма практически любой области нормальных яиц; это позволяет предположить, что продукт гена *torso* синтезируется во всем зародыше, но активен он только на полюсах. Удалось показать, что белковый продукт гена *torso* активируется фолликулярными клетками в обоих полюсах зародыша (Stevens et al., 1990). Фенотип мутантов по гену *torsoless* практически идентичен фенотипу мутантов по гену *torso*, однако этот ген экспрессируется в фолликулярных клетках, окружающих созревающий ооцит. С помощью соматических мутаций, приводящих к появлению на обоих полюсах яйцевой камеры мутантных по гену *torsoless* фолликулярных клеток, окруженных клетками дикого типа, удалось показать, что фенотип развившегося из данного яйца зародыша сходен с фенотипом torso (Stevens et al., 1990).

Таким образом, становление продольной полярности зародыша определяется активностью трех групп генов: генов переднего организующего центра, генов заднего организующего центра и генов терминальных структур. Передний организующий центр локализован в переднем конце яйца и реализуется благодаря градиенту белка гена *bicoid*, который активирует гены передних структур из gap-группы и подавляет гены задних структур. Задний организующий центр локализован в области полярной плазмы и действует посредством продукта гена *nanos*, который транспортируется в область брюшных структур. Здесь этот продукт ингибирует ингибитор генов, контролирующих образование брюшных структур. Морфологические границы терминальных структур (акрона и тельсона) определяются геном *torso*, продукт которого активен на обоих полюсах зародыша. Этот белок, по-видимому, взаимодействует с геном *tailless* и геном gap-группы *huckebein*, создавая таким образом условия для экспрессии акрон- и тельсонспецифических генов.

Компартментализация в процессе развития насекомых

Зародыш дрозофилы состоит из нескольких компартментов, существование которых удалось обнаружить с помощью генетической маркировки клеток. Такая маркировка позволяет отличить мутантную клетку от соседних клеток дикого типа и, таким образом, проследить, в каких частях взрослого насекомого локализуются ее потомки. У зародышей дрозофилы мутации можно индуцировать облуче-

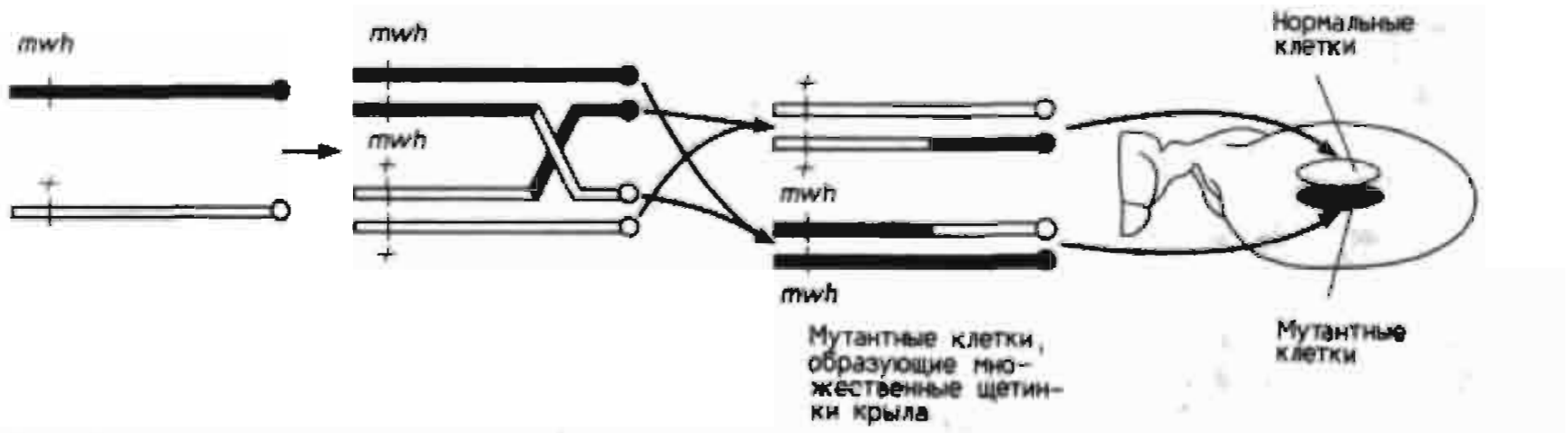


Рис. 18.11. Получение генетически маркированного клона клеток посредством кроссинговера. Гетерозиготы по рецессивной мутации *multiple wing hairs(mwh)* у дрозофилы имеют нормальные щетинки. Индуцированный облучением кроссинговер приводит к образованию двух генетически маркированных клеток: дикого (+/+) и мутантного (*mwh/mwh*) фенотипов. Поскольку спаривание гомологичных хромосом в соматических клетках в отличие от половых происходит довольно редко, митотическая рекомбинация также явление редкое. Ввиду того, что клетки дикого типа (+/+) фенотипически неотличимы от гетерозиготных клеток (mwh/+), клон клеток мутантного фенотипа легко отличить от них по характерному строению щетинок.

нием. В результате в митотических хромосомах возникают рекомбинации, и клетки, в которых произошли такие рекомбинации, можно легко выявить. Один из примеров приведен на рис. 18.11, здесь муха дикого типа, гетерозиготная по гену множественных щетинок крыла, имеет генотип *mwh*/+. Если рекомбинационное событие произойдет в клетке крылового имагинального диска особи, гетерозиготной по гену *mwh*, то рекомбинантные потомки клетки будут иметь гомозиготную генетическую структуру *mwh/mwh* (множественные крыловые щетинки) и +/+ (дикий тип). В результате пролиферации мутантная клетка формирует на крыле пятно мутантного фенотипа multiple wing hairs. Его величина зависит от количества клеточных генераций мутантной клетки с момента ее возникновения до окончания пролиферативной активности. Следовательно, большое пятно может возникнуть только в том случае, если рекомбинация произойдет в раннем эмбриогенезе, а маленькое – если она произойдет на более поздних стадиях развития. Возможно, что наиболее интересными данными, полученными с помощью описанной методики, оказались данные, касающиеся ограничения потенций клеток в процессе эмбриогенеза. Потомки рекомбинантной клетки, возникшей в раннем развитии, могут быть обнаружены в разных частях органа. Однако по мере развития потенции клеток сужаются, и пространственная локализация потомков рекомбинантной клетки, возникшей на более поздних этапах развития, ограничивается меньшей группой терминальных структур.

В этих экспериментах было обнаружено удивительное явление: потомки одной рекомбинантной клетки никогда не пересекают определенных границ имагинального диска. Значит, детерминация происходит в неперекрывающихся пространственных структурах – компартментах. В развитии имагинального диска детерминационное событие происходит в группе прилежащих друг к другу клеток, происходящих от нескольких родоначальных клеток, и поэтому называемых **поликлоном.** Вскоре после формирования бластодермы 10–50 клеток, которые в будущем образуют мезоторакальный имагинальный диск, подразделяются на два поликлона (рис. 18.12). Из одного поликлона формируется передняя часть крыла и бóльшая часть дорсальной части груди, а из другого – задняя часть крыла и остальные структуры дорсальной части груди. Мутантный клон может быть локализован только в одном из компартментов и не может распространяться в другой. Следующий этап детерминации приводит к сегрегации крылового имагинального диска от ножного. Границы между передним и задним компартментами крылового диска в последующем развитии сохраняются. На третьем этапе детерминируются клетки дорсальной и вентральной поверхности крыла, а также обособляются клетки в центральной части диска, родоначальники соответственно поверхности крыла и его шарнирной части. Таким образом, имагинальный диск подразделяется на ряд компартментов, границы которых определяют дальнейшую онтогенетическую судьбу находящихся внутри них клеток (Crick, Lawrence, 1975; Garcia-Bellido, 1975; Kauffman et al., 1978).

На рис. 18.13 представлен крыловой имагинальный диск и границы компартментов, формирующих определенные имагинальные структуры. Мутантные пятна, как уже было отмечено, не могут пересекать передней и задней его части – они могут быть локализованы только в передней или только в задней части крыла. Клон может быть рядом с границей, но не может переходить ее. На рис. 18.13 (*справа*) представлен профиль большого клона, задняя часть

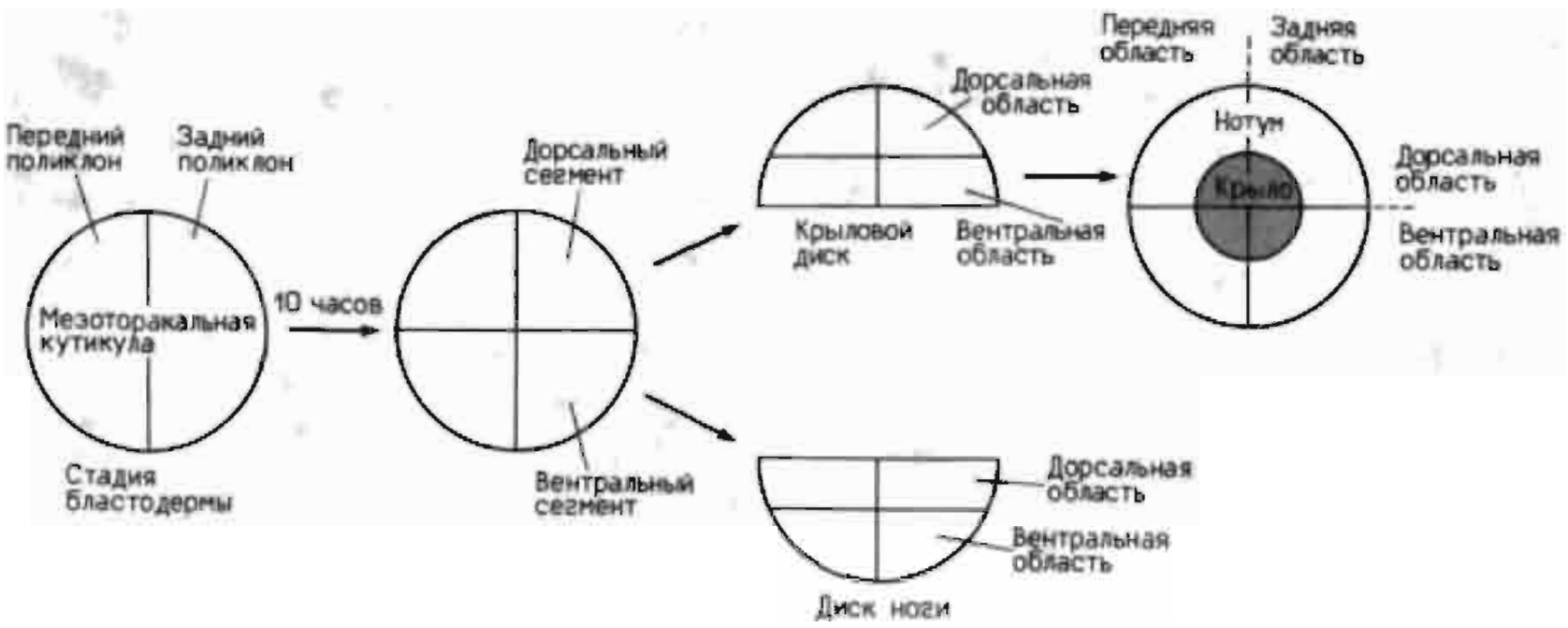


Рис. 18.12. Последовательное выделение компартментов в крыловом имагинальном диске 2-го грудного сегмента. Мезоторакальную кутикулу формируют передний и задний поликлоны, инициальные клетки которых дивергируют на стадии бластодермы. Сегрегация дорсального (крылового) и вентрального (ножного) компартментов происходит в течение первых десяти часов развития. Крыловой и ножной диски теперь топографически отделены друг от друга, но в каждом из них сохранена первоначальная граница переднего и заднего компартмента. Последующая компартментализация делит имагинальный диск на дорсальный и вентральный компартменты, каждый из которых формирует поликлоны центральной (крыловой) и периферической (нотумной) части имагинального торакса. (По Morata, Lawrence, 1977.)

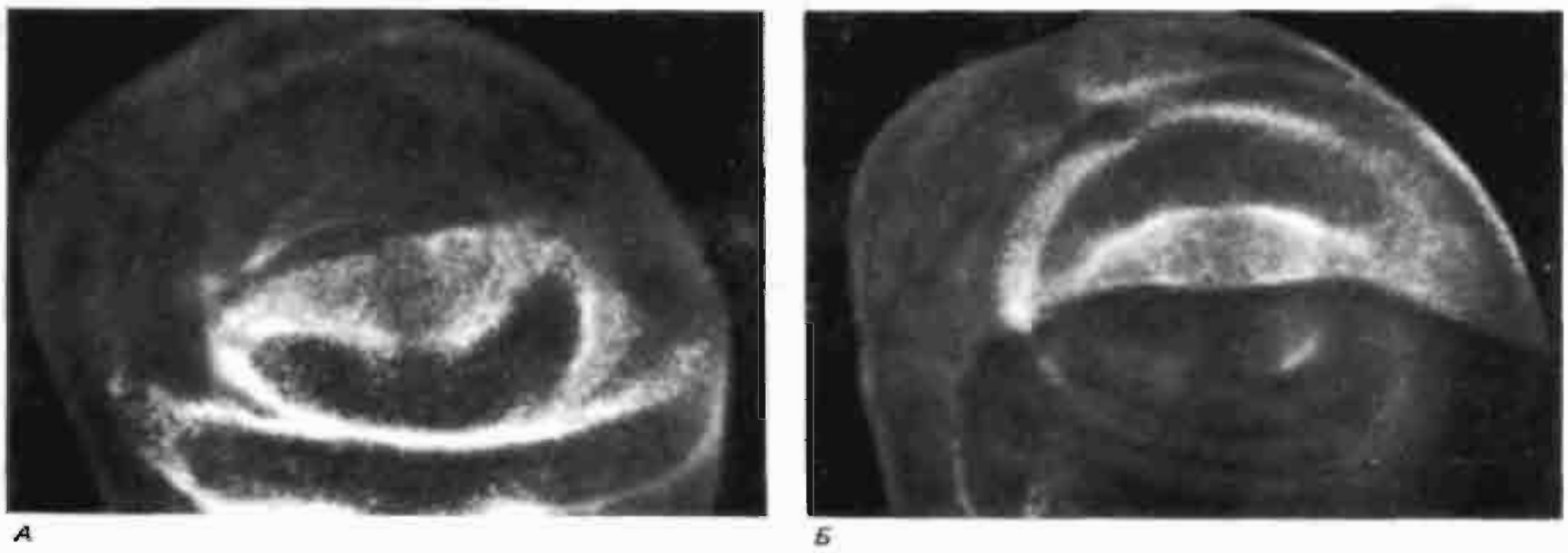
которого совпадает с границей компартмента. Следовательно, клетки получают сигнал (пока неизвестной природы), инструктирующий их о пространственном расположении.

До сих пор ничего не известно о том, как возникают границы компартментов, однако, судя по некоторым данным, формирование одной из самых протяженных границ в крыловом диске коррелирует с появлением на поверхности клеток определенных гликопротеинов. Дорсовентральная компартментализация крыловых дисков происходит у личинки третьего возраста. В это время на поверхности дорсальных и вентральных клеток происходит дифференциальная экспрессия определенных веществ (рис. 18.14) (Brower et al., 1985).

Формирование границ компартментов сопряжено с коммуникационными особенностями пограничных клеток. Это установлено с помощью инъекций низкомолекулярного флуоресцирующего красителя (желтого люцифера) в группы клеток имагинального диска. Краситель способен мигрировать от клетки к клетке через щелевые контакты. Уэйр и Ло



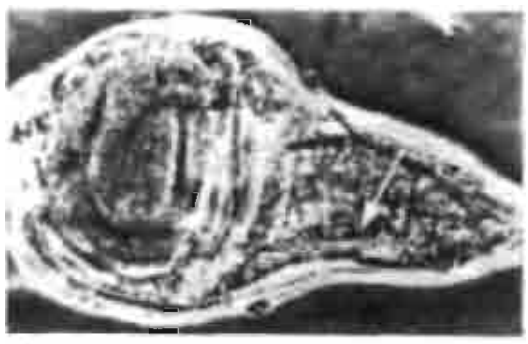
Рис. 18.13. Границы компартментов крылового диска. *Слева.* Границы компартментов на карте презумптивных зачатков крылового имагинального диска. Линия 1 разделяет передний и задний компартменты; линия 2 – дорсальную и вентральную части крыловой пластинки; линия 3 отделяет латеральную часть торакса от дорсальной (шарнирной) части крыла (линия 3a) и нотумную часть крыловой пластинки от собственно крыла (линия 3b); линия 4 делит нотум на скутеллярную и скутумную области (линия 4a); полагают, что в латеральной части груди располагается другая линия – линия 4; линия 5 отделяет свободную поверхность крыла от его шарнирной части; *Справа.* Проекция границ компартментов на имагинальное крыло. Область, покрытая точками, соответствует большому клону генетически маркированных клеток, задний край которого проходит по переднезадней границе, не пересекая ее. (По Lawrence, Morata, 1976.)



А *Б*

Рис. 18.14. Фрагмент крылового имагинального диска личинки позднего (3-го) возраста, окрашенного флуоресцирующими моноклональными антителами. *А*. PS1-антиген обнаружен на поверхности клеток дорсальной (нижней) части диска, а антиген PS2 (*Б*) – на вентральной (верхней) поверхности. В обоих случаях полоска более низкой интенсивности свечения разделяет передний (левый) и задний (правый) компартменты имагинального диска. (По Brower et al., 1985; фотографии с любезного разрешения D. Brower.)

(Weir, Lo, 1982) установили, что первоначальная локализация распространяющегося красителя совпадает с передним и задним компартментами (рис. 18.15). Позже краситель концентрируется в небольших группах клеток, располагающихся вдоль формирующихся границ других компартментов. Таким образом, ограничение коммуникации между клетками щелевыми контактами, по-видимому, играет какую-то роль в формировании или поддержании границ между компартментами.



А



Б

Рис. 18.15. *А*. Фазовоконтрастная микрофотография имагинального крылового диска дрозофилы, в нотумную часть которого инъецирован люцифер желтый (место инъекции отмечено стрелкой). *Б*. Флуоресценция клеток диска через 52 мин после инъекции. Краситель перемещается по клеткам проспективного нотума в переднюю часть крыла. Перемещение в заднюю половину диска ограничено. (Из Weir, Lo, 1982; фотографии с любезного разрешения C. Lo.)

Мутации, нарушающие число сегментов

Три типа генов сегментации

Личинки и взрослые особи плодовой мухи имеют сегментарный тип строения и состоят из передних головных (цефалических), трех грудных (торакальных) и восьми брюшных (абдоминальных) сегментов (рис. 18.16). Каждый из трех имагинальных грудных сегментов несет по паре ног, однако второй грудной сегмент (Т2) несет еще пару крыльев, а третий (Т3) – жужжальца (балансёры). Эти характерные особенности позволяют без труда идентифицировать любой из грудных сегментов. Каждый из них подразделен на передний и задний компартменты, формируемые поликлонами детерминированных клеток.

Активность генов с материнским эффектом, особенности проявления которых обсуждались в гл. 7,– первый этап становления пространственной организации у дрозофилы. Неоднородное распределение в цитоплазме яйцеклетки продуктов этих генов определяет продольную (переднезаднюю) и дорсовентральную полярности зародыша. Мутации этих генов приводят к нарушениям (нехваткам или удвоениям) головных, хвостовых, дорсальных или вентральных структур. На втором этапе становления пространственной организации активны гены, контролирующие число сегментов у личинки. Мута-

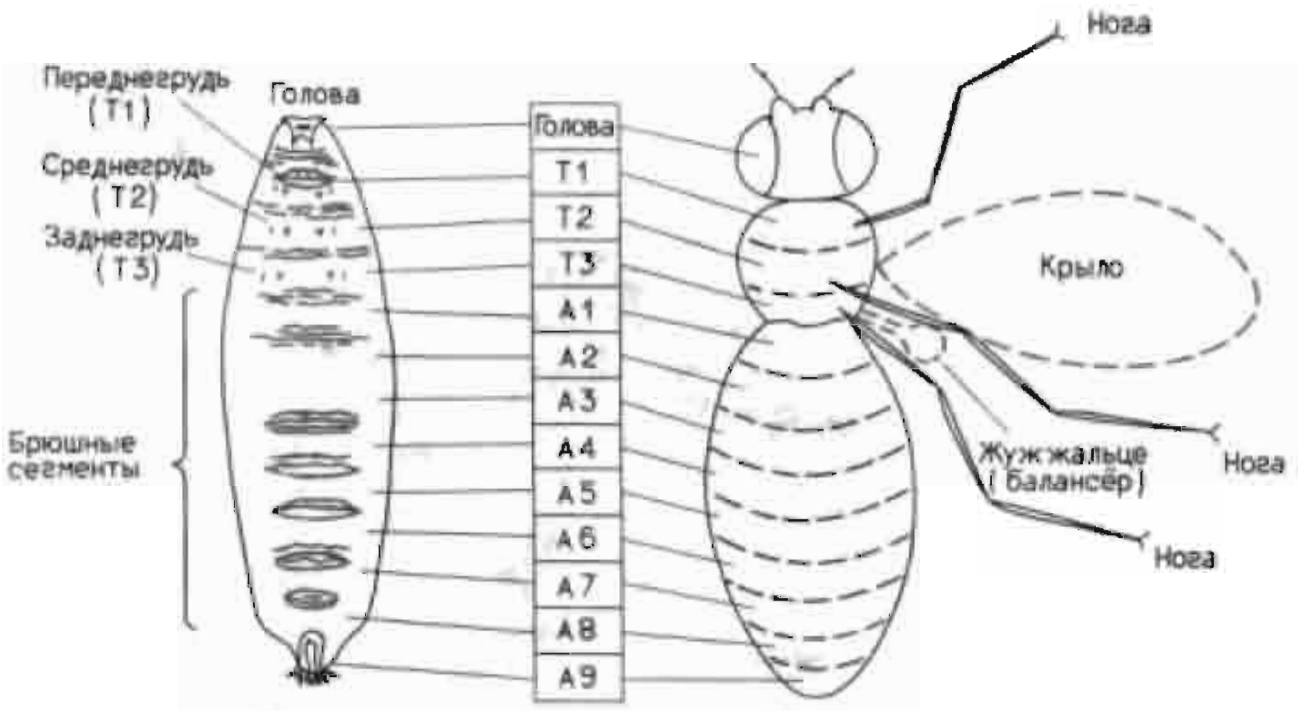


Рис. 18.16. Сегментация личинки и имаго дрозофилы. Грудные (торакальные) сегменты отличаются друг от друга по тем структурам, которые на них развиваются: переднегрудной сегмент (T1) несет пару ног, среднегрудной сегмент (T2) – крылья и ноги, заднегрудной сегмент (T3) – жужжальца (балансёры) и ноги.

ции этих генов приводят к нарушению числа, а также полярности сегментов. Некоторые из **генов сегментации** представлены в табл. 18.2. У мутантов по гену *Krüppel* (рис. 18.17) отсутствует целая группа сегментов. Отсюда и название генов, контролирующих образование этих сегментов – **gap-гены** (*от англ.* gap – брешь, пролом, щель).

Еще один набор генов сегментации представлен **генами pair-rule.** На рис. 18.17 – это ген *fushi tarazu.* Мутации генов *pair-rule* вызывают нарушение формирования половины сегментов: либо четных, либо нечетных. На рис. 18.18 показаны структуры кутикулы нормальной личинки и летального мутанта по гену группы pair-rule – *fushi tarazu*, у которого отсутствует каждый четный сегмент.

Наконец, существуют мутации (например, мутация *engrailed*), при которых сохраняется нормальное число сегментов, но в каждом сегменте определенный участок заднего компартмента утрачен и замещен структурой, зеркально отражающей морфологию переднего компартмента. Эти гены составляют группу **генов segment-polarity.** Фенотипы всех представленных в этом разделе мутаций наводят на мысль о существовании контроля сегментации на трех уровнях: яйца, пары сегментов и отдельного сегмента (Nüsslein-Volhard, Wieschaus, 1980).

Таблица 18.2. Гены, контролирующие сегментацию у дрозофилы

Группа	Локус
Segment-polarity	*cubitus interruptus*^{D} (*ci*^{D})
	wingless (*wg*)
	engrailed (*en*)
	hedgehog (*hh*)
	fused (*fu*)
	paxh (*pat*)
	armadillo (*arm*)
Pair-rule	*paired* (*prd*)
	even-skipped (*eve*)
	odd-skipped (*odd*)
	barrel (*brr*)
	hairy (*h*)
	runt (*run*)
	odd-paired (*opa*)
	fushi tarazu (*ftz*)
Gap	*Krüppel* (*Kr*)
	knirps (*kni*)
	hunchback (*hb*)
	giant (*gt*)

По Nüsslein-Volhard, Wieschaus, 1980 и др.

Парасегменты и пространственная регуляция экспрессии генов

Отчетливо видно, что личинки насекомых сегментированы (рис. 18.1; 18.16; 18.18). Сегменты отделяются друг от друга глубокими бороздками в эпидермисе в месте сочленения заднего компартмента одного и переднего компартмента следующего сегмента. Границы сегментов маркированы полосками хитиновых зубчиков. Однако столь простая сегментация, по-видимому, не является первичной. Некоторые авторы (Martinez-Arias, Lawrence, 1985) полагают, что первичными единицами скорее всего являются **парасегменты.** Парасегмент сдвинут на пол-фазы, т.е. на один компартмент по отношению к сегменту и, таким образом, состоит из заднего компартмента одного и переднего компартмента последующего сегмента, как показано на рис. 18.19. Есть основания полагать, что парасегменты играют важную роль в развитии насекомых. Об этом свиде-

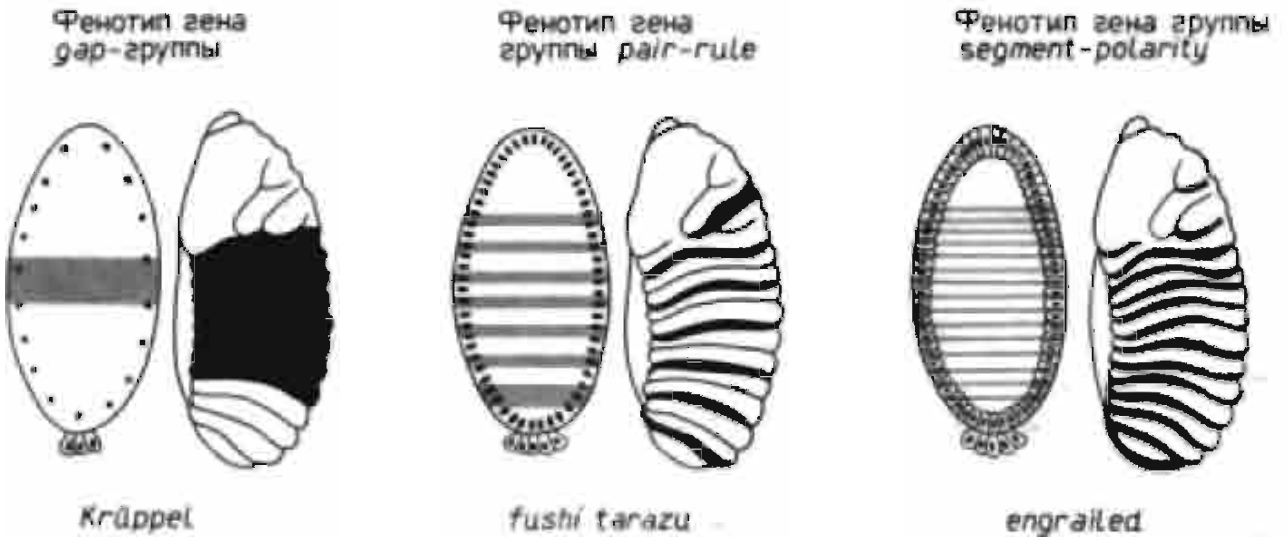


Рис. 18.17. Три группы генов сегментации, мутации которых нарушают характер этого процесса. Слева от каждого из трех мутантов представлены схематические зарисовки зародышей на стадии дробления; на этих рисунках серым цветом обозначены участки, транскрибируемые у зародышей дикого типа; на рисунках справа представлено нарушение характера сегментации (черный цвет) мутантов, проявляющееся на поздних стадиях зародышевого развития. (По Scott, O'Farrell, 1986.)

тельствуют следующие факты. Во-первых, у личинки имеются два дополнительных полусегмента, по одному на каждом конце зародыша. Один из них является задним компартментом, предшествующим первому головному сегменту, а другой – передним компартментом, следующим за 8-м абдоминальным сегментом. Во-вторых, как будет описано ниже, анатомические структуры личинки соответствуют парасегментарному, а не сегментарному типу организации. Оба типа метамерии зародыша дрозофилы играют важную роль в становлении пространственной организации, причем парасегментарное строение, по-видимому, предшествует сегментарному.

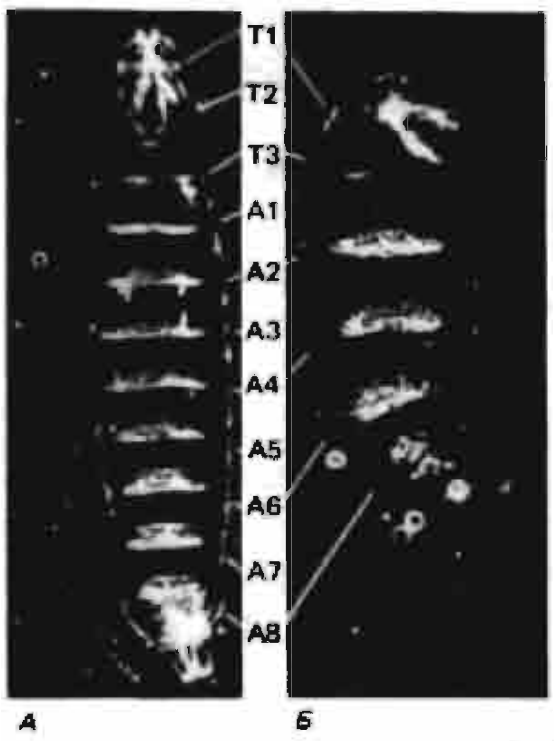


Рис. 18.18. Кутикула вылупившейся личинки дрозофилы дикого типа и мутанта по одному из генов группы pair-rule. *А*. Кутикула личинки дикого типа состоит из 3 грудных и 8 брюшных сегментов. Три головных сегмента во время эмбриогенеза сливаются и инволюируют. *Б*. Кутикула мутанта *fushi tarazu*. Следует обратить внимание на отсутствие у мутанта нечетных сегментов (Hafen et al., 1984a; фотография с любезного разрешения W.J. Gehring.)

Последовательность экспрессии генов сегментации

Для объяснения пространственной организации вдоль переднезадней оси было предложено несколько моделей. Бóльшая часть из них, следуя Майнхардту (Meinhardt, 1986), постулирует активность трех групп генов сегментации. Экспрессию этих генов исследуют методом гибридизации in situ их клонированной ДНК на гистологических препаратах зародышей дрозофилы. Эмбриональные закладки, в которых транскрибируются гены сегментации, могут быть легко идентифицированы по связыванию радиоактивного зонда с комплементарной РНК.

Продукты генов с материнским эффектом формируют градиенты и локально распределенные морфогены вдоль продольной оси яйца. Предполагают, что гены gap-группы на синцитиальных стадиях развития интерпретируют позиционную информацию, возникшую в яйцеклетке благодаря активности генов материнского организма, и подразделяют зародыш на несколько пространственных доменов. Ген *hunchback(hb)* экспрессируется в парасегментах 1, 2, 3, 13 и в переднем компартменте 14-го; ген *Krüppel (Kr)* – в 4, 5, 6 и заднем компартменте 14-го, ген *knirps* – с 7-го по 12-й (рис. 18.20). Характер экспрессии генов gap-группы изменяется во времени, однако домены их экспрессии остаются неперекрывающимися (Jäckle et al., 1986).

Следующими активируются гены группы pair-rule. В первоначальном характере их экспрессии трудно обнаружить закономерность, однако к четырнадцатому циклу дробления активность генов данной группы концентрируется в определенных ядрах. На рис. 18.21,*А* показан зебровый тип транскрипции гена *fushi tarazu(ftz)* (по-японски fushi tarazu означает редукцию числа сегментов). Ген *ftz* активен в семи полосках, каждая шириной в три ядра. Эти полоски соответствуют четным парасегментам, которые отсутствуют у *ftz*$^-$-мутантов

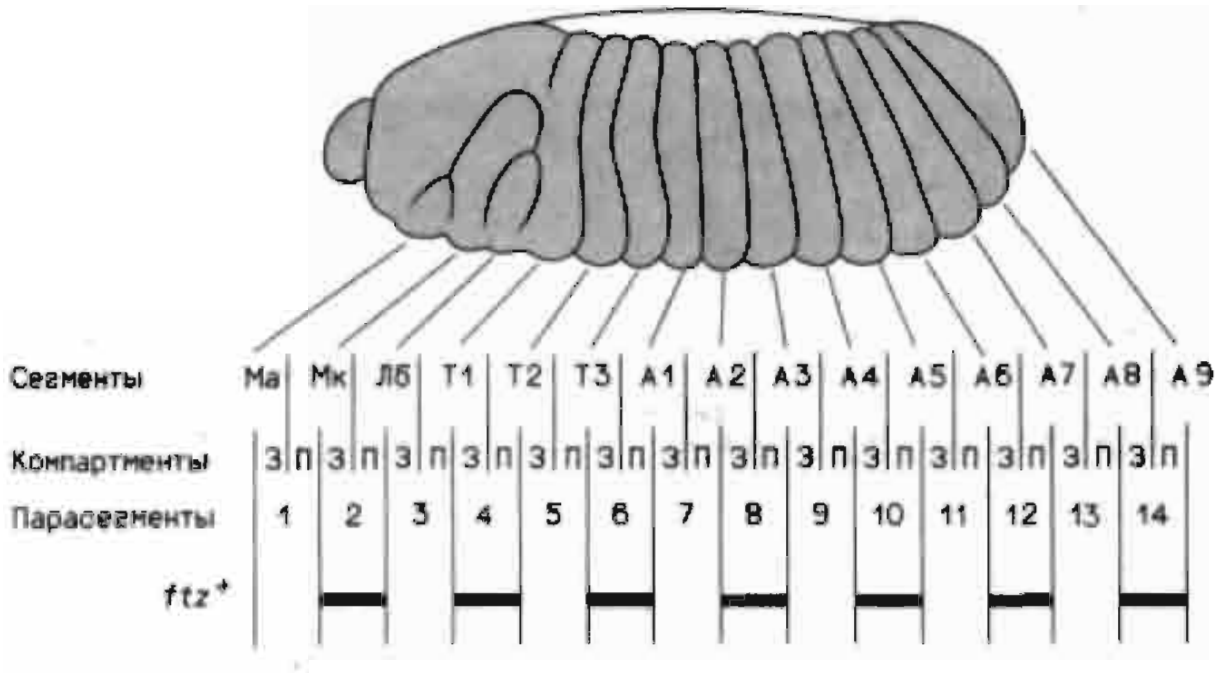


Рис. 18.19. Сегменты и парасегменты. П и З – передний и задний компартменты сегментов. Парасегменты сдвинуты на один компартмент вперед по отношению к соответствующему сегменту. Ма – мандибулярный, Мк – максиллярный и Лб – верхнегубной сегменты головы; Т – грудные (торакальные) сегменты; *А* – брюшные (абдоминальные) сегменты. Парасегменты пронумерованы цифрами от 1 до 14. Внизу рисунка представлены выявленные методом гибридизации in situ границы экспрессии гена группы pair-rule – *fushi tarazu (ftz)*.

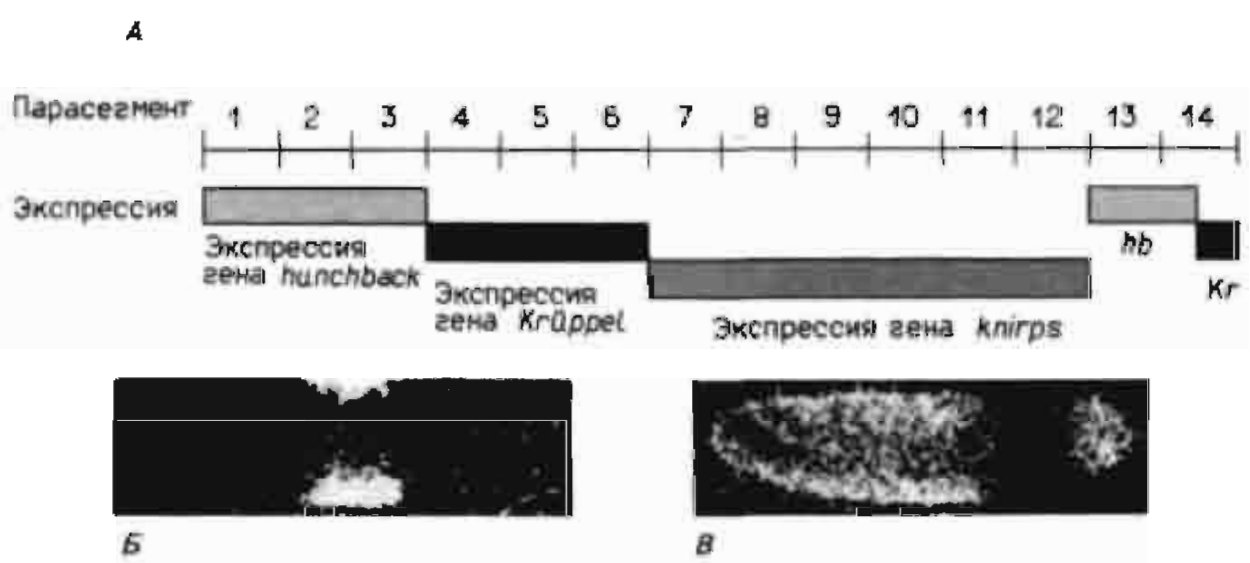


Рис. 18.20. Домены экспрессии генов gap-группы. *А*. Неперекрывающиеся домены экспрессии генов gap-группы: локализация активности генов *hunchback (hb)* и *Krüppel (Kr)* выявлена методом гибридизации с кДНК in situ, а гена *knirps* – на основании его фенотипического проявления у мутантов. *Б*. Радиоавтограф, полученный в результате гибридизации in situ ДНК гена *Kr* с его мРНК; активность этого гена выявлена в 4-, 5- и 6-м парасегментах зародыша дикого типа. (На темнопольной фотографии белые точки соответствуют зернам серебра, восстановленного под действием радиоактивного излучения.) *В*. Гибридизация in situ ДНК генов *Kr* и *hb* на одном препарате выявляет предполагаемую область экспрессии гена *knirps* (темнопольная фотография). (Jäckle et al., 1986.)

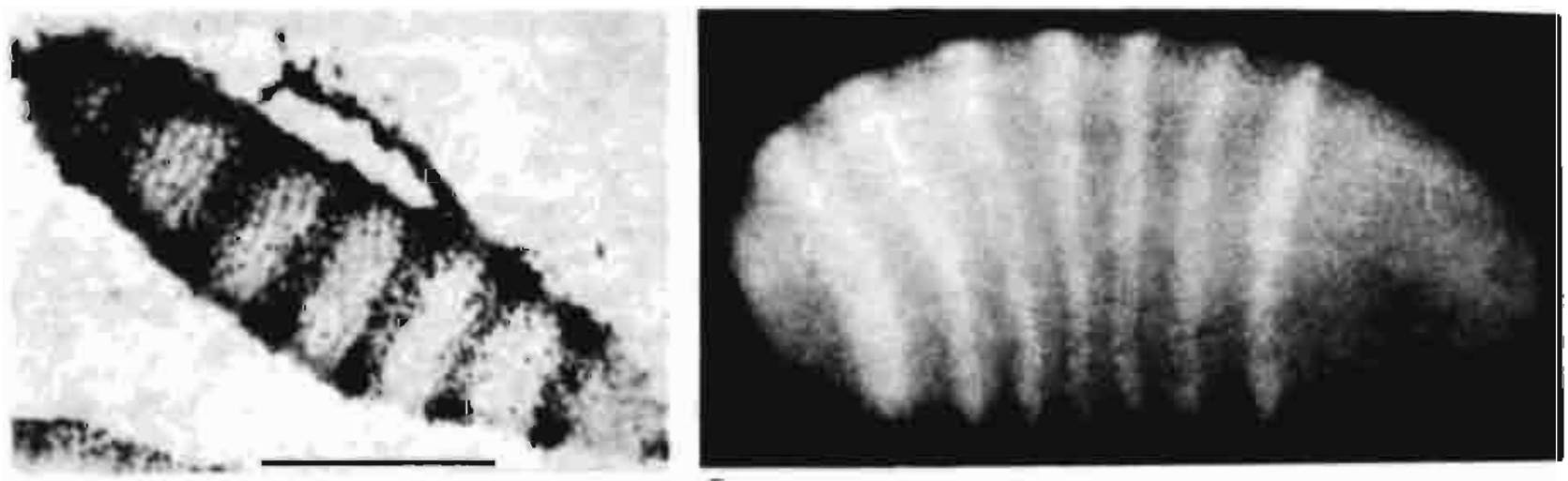


Рис. 18.21. Экспрессия гена *fushi tarazu (ftz)* в клетках бластодермы дрозофилы. Транскрипционная активность ядер была выявлена методом гибридизации in situ радиоактивной одноцепочечной ДНК клонированного гена *ftz* с клеточной РНК. Белковый продукт гена *ftz* удалось идентифицировать с помощью окрашивания иммунофлуоресцентными антителами к нему. *А*. Локализация семи полос транскрипционной активности гена *ftz* в клетках бластодермы. На светлопольной радиоавтограмме темные полосы соответствуют местам связывания радиоактивного зонда. *Б*. Иммунофлуоресценция продукта гена *ftz* в клетках бластодермы. (*А* – из Hafen et al., 1984a; с любезного разрешения W. J. Gehring; *Б* – с любезного разрешения S. B. Carroll, M. P. Scott.)

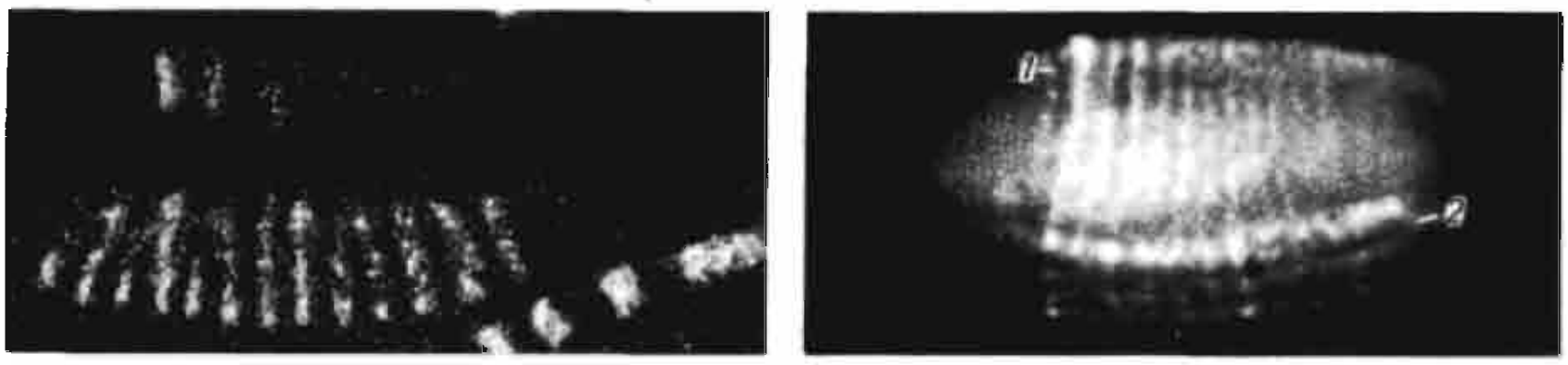


Рис. 18.22. Экспрессия гена *engrailed* в клетках бластодермы дрозофилы. *А*. Локализация 14 полос транскриптов гена *engrailed* в бластодерме. Обратите внимание на их разную интенсивность. Ширина каждой полосы – одна клетка. *Б*. Распределение 14 полос белка engrailed. Белок, как и мРНК, первоначально появляется в передней части зародыша, а затем в заднем компартменте каждого сегмента. *1* – головная складка; *2* – вентральная бороздка. (*А* – из Howard, Ingham, 1986; с любезного разрешения P. Ingham; *Б* – из O'Farrell et al., 1985; с любезного разрешения P. O'Farrell.)

(Hafen et al., 1984a; Gehring, 1985). Клетки, лишенные продукта гена *ftz*, погибают. Было показано, что ген *ftz* дикого типа (и другие гены группы pair-rule) кодируют какой-то белок. Белковые продукты этих генов можно выявить с помощью флуоресцирующих антител, распределение которых совпадает с распределением соответствующей данному гену мРНК (рис. 18.21,*Б*). Таким образом, *ftz* и другие гены группы pair-rule подразделяют зародыши на повторяющиеся домены шириной по два парасегмента, в одном из которых этот ген активен, а в другом – нет.

Третий класс генов сегментации – это гены группы segment-polarity, которые активны в каждом сегменте. Один из них, ген *engrailed*, экспрессируется в заднем компартменте каждого сегмента (или переднем компартменте каждого парасегмента) во время 14-го деления дробления. Транскрипционная активность гена *engrailed* (Kornberg et al., 1985; Howard, Ingham, 1986) обнаружена в 14 поперечных полосках шириной в одну клетку, 15-я полоска появляется во время гаструляции. Позиция полосок соответствует зачаткам задних компартментов сегментов (рис. 18.22), для нормального развития которых необходима активность гена *engrailed*. Возникающие в результате кроссинговера клоны клеток en/en утрачивают специфичность к определенному компартменту и могут нарушать границы компартментов (Lawrence, Morata, 1976). Транскрипты гена *engrailed* накапливаются в клетках задних компартментов имагинальных дисков дикого типа (рис. 18.23) (Kornberg et al., 1985).



Рис. 18.23. Локализация транскриптов гена *engrailed* в антенналь ном имагинальном диске личинки дикого типа. Гибридизация in situ при инкубации имагинального диска с радиоактивной кДНК гена *ingrdiled*. Его экспрессия обнаруживается только в клетках заднего компартмента. (Из Kornberg et al., 1985; фотография с любезного разрешения T. Kornberg.)

Таким образом, переднезадняя ось зародыша дрозофилы детерминирована гетерогенностью цитоплазмы яйца, которая последовательно определяет формирование сначала сегментарных доменов, затем пар сегментов и отдельных сегментов и, наконец, компартментов.

Установление последовательности экспрессии генов

Прямой метод установления взаиморегуляции генов состоит в анализе характера экспрессии одного гена в клетках зародыша, мутантного по другому гену. Например, у всех изученных мутантов по генам с материнским эффектом и генам gap-группы нарушена транскрипция гена *ftz* (Carroll, Scott, 1986; Carroll et al., 1986). При гибридизации in situ радиоактивной ДНК гена *ftz* было установлено нарушение характера его экспрессии у мутантов по данным группам генов (рис. 18.24). Мутация гена *Krüppel*, например, обусловливает утрату центральных парасегментов. Экспрессия гена *ftz* у этих мутантов не

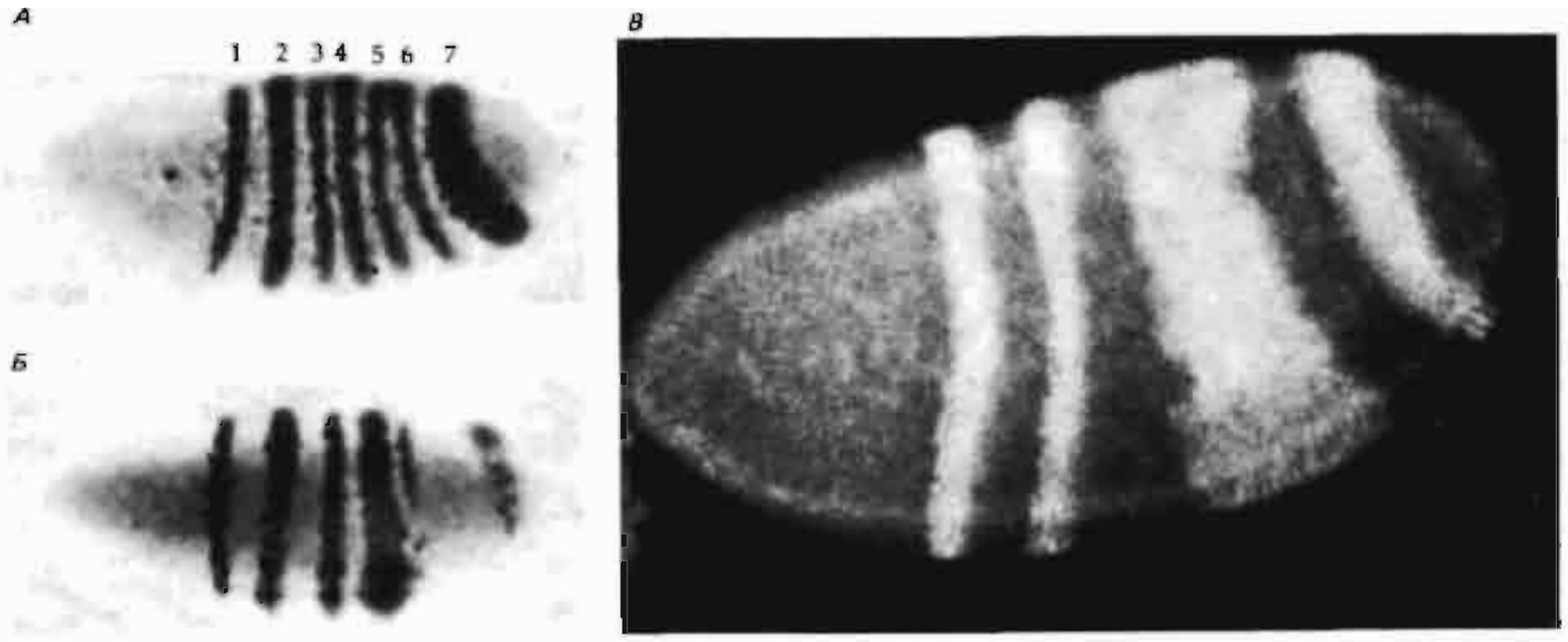


Рис. 18.24. Влияние активности генов с материнским эффектом на транскрипцию гена *ftz*. *А*. Нормальный продукт транскрипции гена *ftz* в зародыше дикого типа. *Б*. Изменение транскрипции этого гена у зародыша, развившегося из яйца, отложенного мутантной по гену *caudal* самкой: ген *ftz* не активен в задних сегментах. *В*. Нарушение распределения белкового продукта гена *ftz* в зародышах, развившихся из яиц, отложенных гомозиготными по мутации *oskar* самками: возникают только 4 полосы, причем в брюшной части ген активен в большем числе клеток (*А*, *Б* – радиоавтографы из MacDonald, Struhl, 1986; *В* – флуоресцентная микрофотография из Carroll et al., 1986; фотографии с любезного разрешения P. MacDonald, G. Struhl, S. B. Carroll, M. P. Scott.)

отличается от нормальной экспрессии в 1-, 2-, 3-, 11-, 12-, 13-, 14-м парасегментах, но сильно нарушена (либо отсутствует совсем) в центральных парасегментах (Ingham et al., 1986). Следовательно, экспрессия генов с материнским эффектом и генов gap-группы предшествует экспрессии гена *ftz* и таким образом регулирует его активность.

Экспрессия *ftz* не нарушена у мутантов по генам группы segment-polarity; исходя из этого, можно считать, что ген *ftz* экспрессируется до генов указанной группы. Однако мутации каждого из 8 генов группы pair-rule, включая и *ftz*, нарушают характер экспрессии гена *engrailed*. У мутантов по гену *ftz* транскрипты гена *engrailed* обнаружены только в нечетных парасегментах и не обнаружены в четных. У мутантов по гену *paired* ген *engrailed* транскрибируется только в четных парасегментах (Harding et al., 1986; MacDonald et al., 1986). Приведенные данные свидетельствуют о следующей последовательности генетической регуляции: гены с материнским эффектом контролируют гены gap-группы, те в свою очередь контролируют гены группы pair-rule, а они – гены группы segment-polarity.

Кроме вертикальной иерархии существует и горизонтальная – взаиморегуляция генов одной группы. Нарушение экспрессии трех генов группы pair-rule приводит к изменению характера экспрессии гена *ftz*, другие пять генов данной группы этим свойством не обладают (Carroll, Scott, 1986; Howard, Ingham, 1986). Таким образом, сложный процесс формирования пространственной организации зародыша является производным различных комбинаций продуктов генов с материнским эффектом и трех типов генов сегментации. Полагают, что эти гены активируют другую группу регуляторов – гомеозисные селекторные гены.

Установление специфичности сегмента: гомеозисные гены

Как только происходит установление границы сегмента, начинают формироваться его специфические черты. Этот процесс контролируют **гомеозисные селекторные гены.** Если отличительным свойством мутаций генов сегментации является утрата отдельных частей тела, то мутации гомеозисных генов проявляют причудливый фенотип: они трансформируют один сегмент в другой. Как описано в гл. 9, доминантная мутация *Antennapedia (Antp)* приводит к появлению мезоторакальных ног на месте структур антенны. Каким-то образом головные сегменты у мутантов *Antp* приобретают сходство со вторым грудным сегментом. Более того, у личинок с делецией гена *Antp* отсутствуют структуры второго грудного (мезоторакального) сегмента. Полагают, что гомеозисные гены дикого типа контролируют развитие определенных популяций клеток.

В третьей хромосоме дрозофилы выявлены две области, содержащие кластеры гомеозисных генов (рис. 18.25). В одной из них локализован **комплекс Antennapedia,** включающий следующие гомеозисные

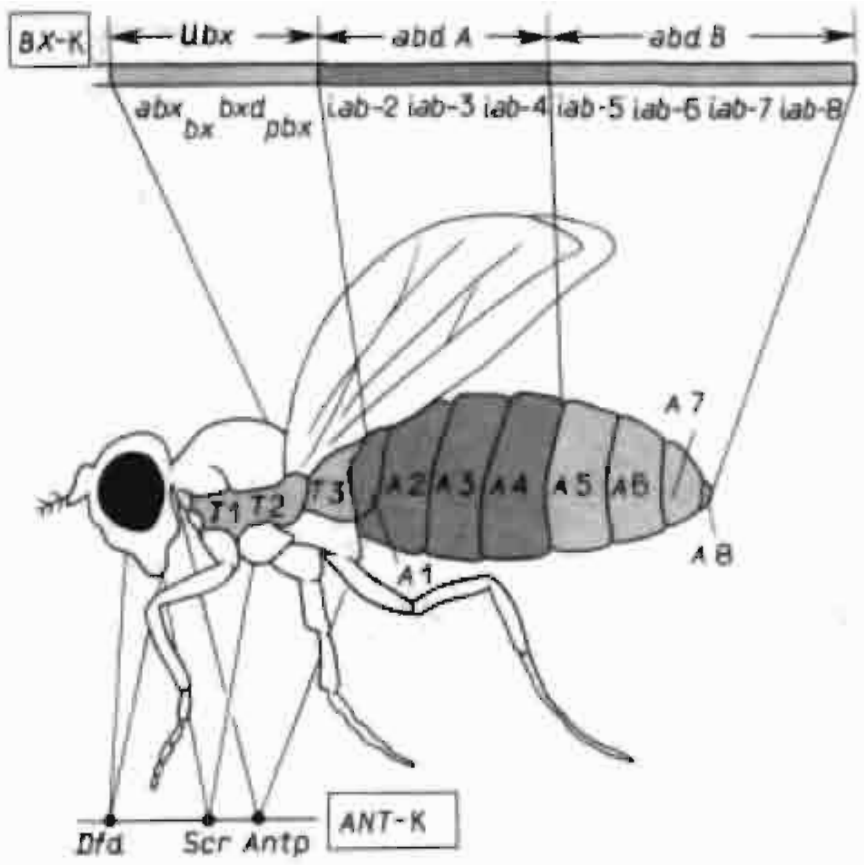


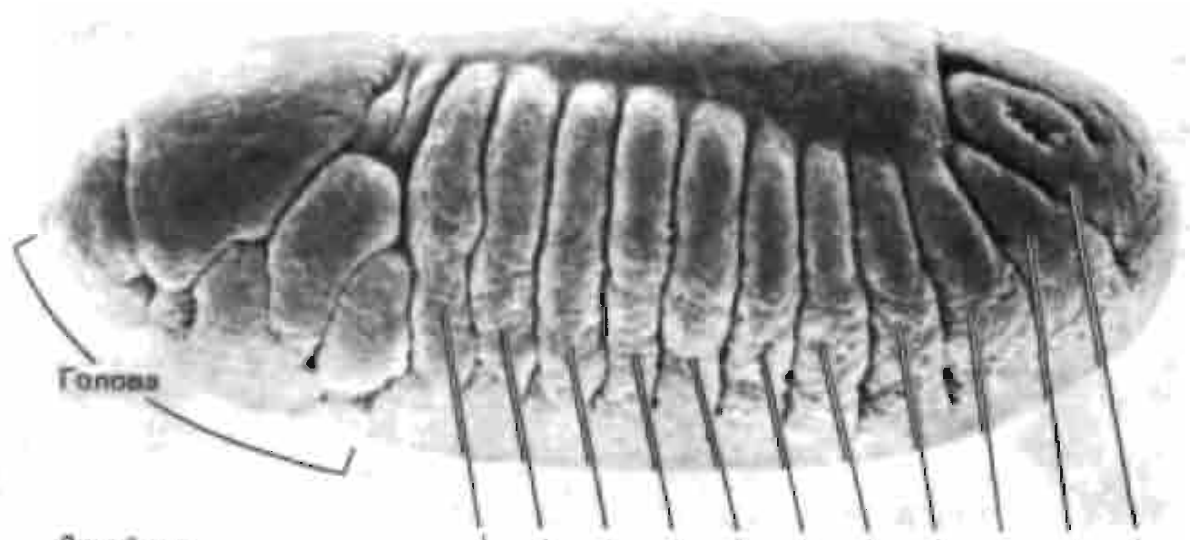
Рис. 18.25. Функциональные домены генов bithorax- и Antennapedia-комплексов у дрозофилы. Bithorax-комплекс (*BX*-К) (*верхний ряд*) состоит из трех летальных комплементарных групп (выявленных Sanchez-Herrero с коллегами), внутри которых Льюис идентифицировал несколько гомеозисных генов. В комплекс Antennapedia (ANT-K) (*нижний ряд*) входят гены *Deformed* (*Dfd*), *Sex comb reduced* (*Scr*) и *Antennapedia* (*Antp*). (По Harding et al., 1985.)

гены: *Antennapedia(Antp)*, *Sex comb reduced(Scr)* и *Deformed(Dfd)*. Гены этой области контролируют развитие структур головы, первого грудного сегмента и переднего компартмента второго грудного сегмента (Wakimoto et al., 1984). Во второй области локализован **bithorax-комплекс,** гены которого детерминируют развитие остальных грудных и всех брюшных сегментов (Lewis, 1978). Этот комплекс включает три гена, кодирующих белки: *Ultrabithorax (Ubx)*, *Abdominal A (abd A)* и *Abdominal B (abd B)*. Выделить гомеозисные гены первоначально удалось с помощью генетических методов, в частности комплементационного гибридологического анализа, основанного на появлении фенотипов дикого типа при скрещивании особей, мутантных по генам разных локусов, и мутантных фенотипов – при скрещивании особей, мутантных по аллельным генам (Sanches-Herrero et al., 1985). Оказалось, что летальный фенотип компаунда трех мутаций *Ubx*, *abd A* и *abd B* идентичен мутантам с делецией всего комплекса bithorax (Casanova et al., 1987). Это подтверждает данные о том, что рассматриваемый комплекс имеет только три транскрипционные единицы.

Все шесть описанных гомеозисных генов удалось клонировать и с помощью метода гибридизации in situ установить характер их экспрессии (Harding et al., 1985). Транскрипты каждого локуса обнаружены в разных частях зародыша (результаты этих экспериментов представлены на рис. 18.25). У гомеозисных мутантов нормальная транскрипция нарушена. Ген *Antennapedia* дикого типа, например, нормально экспрессируется в торакальных сегментах, проявляя наибольшую активность в мезоторакальном сегменте. Предполагают, что активность гена *Antp* подавляет развитие головных структур в грудных сегментах. У доминантного мутанта по гену *Antennapedia* транскрипты гена *Antp* обнаружены не только в груди, но и в голове, что приводит к развитию торакальных структур на месте антенны (рис. 18.39) (Frischer et al., 1986; Schneuwly et al., 1987).

Все три гена комплекса bithorax необходимы для нормального онтогенеза дрозофилы, однако их экспрессия во многих сегментах позволяет усомниться в том, что именно они являются генами-селекторами. Многочисленные исследования экспрессии генов гомеозисных комплексов позволили высказать по этому поводу ряд предположений. Одно из них сделано Льюисом (Lewis, 1978, 1985), который обратил внимание на то, что все девять сегментов (один грудной и восемь брюшных) у мутантов с полностью делетированным комплексом bithorax развиваются по типу второго торакального сегмента (рис. 18.26). Исходя из этого, Льюис предположил, что именно второй грудной сегмент (несущий и крылья, и ноги) представляет собой ту эволюционную единицу, от которой произошли все остальные сегменты, расположенные в каудальном от него направлении.

Льюис постулировал, что формирование каждого последующего сегмента, начиная со второго торакального, контролирует по крайней мере на один ген bithorax-комплекса больше, чем предыдущего. Например, развитие третьего торакального сегмента обеспечивает активность генов основного (мезоторакального) уровня плюс активность специфического гена(генов) третьего грудного сегмента (рис. 18.27). Мутации генов этой последней группы превращают третий грудной сегмент в сегмент, подобный второму грудному сегменту. Развитие первого абдоминального сегмента обеспечивает суммарная активность генов второго и третьего грудных сегментов вкупе с активностью специфического гена данного абдоминального сегмента. Мутация этого специфического гена приводит к развитию на его месте структур третьего грудного сегмента. Активация различных батарей генов в различных сегментах может быть объяснена градиентом гипотетического репрессора, ингибирующего экспрессию всех этих генов. Наибольшая концентрация репрессора должна быть в передних сегментах, где включено наименьшее число генов, а наименьшая кон-



Дикий тип

А	CL	Гл Ан	Ма	Мх	Лб	T1	T2	T3	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8

BX-C^{-} (делеция всего *BX-C*)

Б	CL	Гл Ан	Ма	Мх	Лб	T1	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2	T2

Pc^{-}

Ь	CL	Гл Ан	Ма	Мх	Лб	A8	A8	A8	A8	A8	A8	A8	A8	A8	A8	A8

Ubx^{-}

Г	CL	Гл Ан	Ма	Мх	Лб	T1	T2	T2	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8

Antp^{-}

Д	CL	Гл Ан	Ма	Мх	Лб	T1	T1	T1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8

ANT-C^{-} (делеция всего *ANT-C*)

Е	CL	Гл Ан	Ма	T1	T1	T1	T1	T1	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8

ANT-C^{-} и *BX-C*$^{-}$

Ж	CL	Гл Ан	Ма	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1	T1

Рис. 18.26. Сегментация личинки и ее нарушение у гомеозисных мутантов и мутантов по их генам-регуляторам. *А* – Нормальная личинка состоит из головных, трех грудных и восьми брюшных сегментов. *Б*. Делеционный мутант по всему комплексу bithorax (*BX-C*$^{-}$): головные и первые два грудных сегмента нормальные, а все остальные трансформированы в сегменты мезоторакального типа. *В*. У личинок, мутантных по гену *Polycomb* (*Pc*), все сегменты (кроме головных) развиваются по типу 8-го брюшного сегмента. *Г*. Личинка, мутантная по локусу *Ubx*: сегмент Т3 трансформирован в сегмент Т2, как у особи, представленной на рис. 18.28. *Д*. Личинка, мутантная по гену *Antp*: сегменты Т2 и Т3 трансформированы в Т1. *Е*. В случае делеции всего комплекса Antennapedia лабиальный и максиллярный сегменты проявляют сходство с сегментом Т1. *Ж*. Делеция обоих комплексов приводит к развитию всех сегментов, начиная с верхнечелюстного по типу сегмента Т1. ГлАн – глазоантенниальный сегмент; остальные обозначения, как на рис. 18.1. (Raff, Kaufman, 1983.)

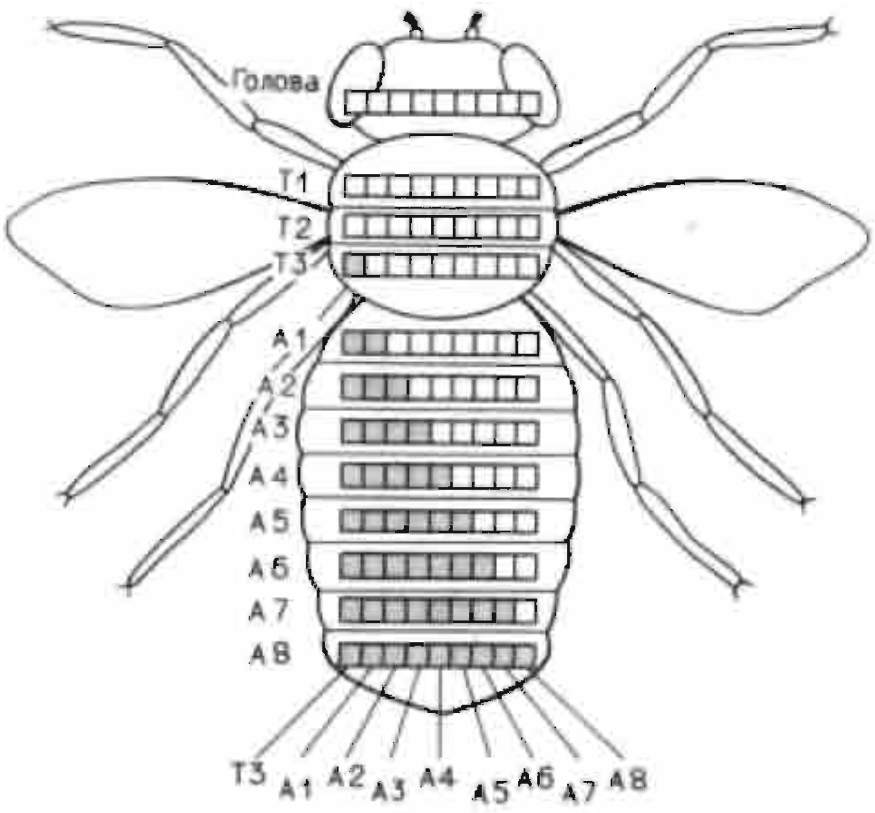


Рис. 18.27. Генетическая регуляция генов комплекса bithorax (модель Льюиса). Второй торакальный сегмент является базисным. В каждом последующем (более каудальном) сегменте активируется дополнительный ген (гены). В терминальном восьмом брюшном сегменте экспрессируются все гены. (По Spierer, Goldschmidt-Clermont, 1985.)

центрация – в каудальных сегментах. Кроме того, продукты генов, контролирующих развитие терминальных сегментов, должны обладать большим сродством к молекулам репрессора. Следовательно, в передних сегментах эти гены окажутся выключенными. Они будут активированными только в задних сегментах, в которых концентрация репрессора наименьшая.

Одним из претендентов на роль продуцента молекул репрессора является ген *Polycomb (Pc)*. У мутантов по гену *Pc* все грудные и брюшные сегменты развиваются по типу восьмого брюшного (рис. 18.26) (Wedeen et al., 1986). У таких Pc^--зародышей активность генов *abd A* и *Abd B*, обычно проявляющаяся только в задних сегментах, перемещается в центральные части зародыша и обнаруживается в клетках центральной нервной системы личинки.

Но как гипотеза Льюиса объясняет то, что bithorax-комплекс содержит только три гена, синтезирующих белки? Льюис и его коллеги (Bender et al., 1983; Karch et al., 1985) выявили новые генетически значимые области комплекса, которые также обусловливали гомеозисные трансформации: мутации генов *anterobithorax (abx)* и *bithorax (bx)* вызывали развитие переднего компартмента третьего грудного сегмента (передние жужжальца) в передний компартмент второго торакального сегмента, несущего крылья. Подобно этому, мутации генов *posterobithorax (pbx)* и *bithoraxoid (bxd)* трансформировали задний компартмент третьего грудного сегмента в задний компартмент второго грудного сегмента. Комбинация мутаций *abx*, *pbx* и *bxd* трансформирует весь третий сегмент во второй, что приводит к развитию мухи с четырьмя крыльями (рис. 18.28). Сначала полагали, что данные мутации соответствуют трем отдельным локусам, однако в настоящее время их считают мутациями энхансеров (усилителей), которые определяют тканеспецифический характер экспрессии гена *Ubx* (Lewis, 1985; Peifer et al., 1987). Соответствие *цис*-регуляторных генов трем транскрипционным единицам комплекса bithorax показано на рис. 18.29. Кодирующие белок области комплекса bithorax занимают менее десятой доли его ДНК. Регуляторные последовательности локуса находятся во фланкирующих (слева и справа) областях гена либо в их интронах.

Анализ мутаций гомеозисных генов и их делеций установил, что гены *abx*, *bx* и *bxd* представляют собой *цис*-регуляторные элементы. Делеция гена *Ubx* вызывает трансформацию пятого парасегмента (заднего компартмента второго и переднего компартмента третьего грудных сегментов) и шестого парасегмента (заднего компартмента третьего грудного сегмента и переднего компартмента первого брюшного сегмента) в четвертый парасегмент (задний компартмент первого грудного и передний компартмент второго грудного сегментов). Такая трансформация летальна; несущие ее зародыши погибают до вылупления.

У мутантов *abx* и *bx* трансформация ограничена только пятым парасегментом, который превращается в четвертый парасегмент, так как именно в пятом парасегменте репрессирован ген *Ubx* (Casanova et al., 1985; Peifer, Bender, 1986). Поэтому из



Рис. 18.28. Четырехкрылая дрозофила развивается в результате мутаций трех *цис*-регуляторов гена *Ultrabithorax*. Эти мутации трансформируют 3-й грудной сегмент во второй (т. е. жужжальца в крылья). (Фотография с любезного разрешения E. B. Lewis.)

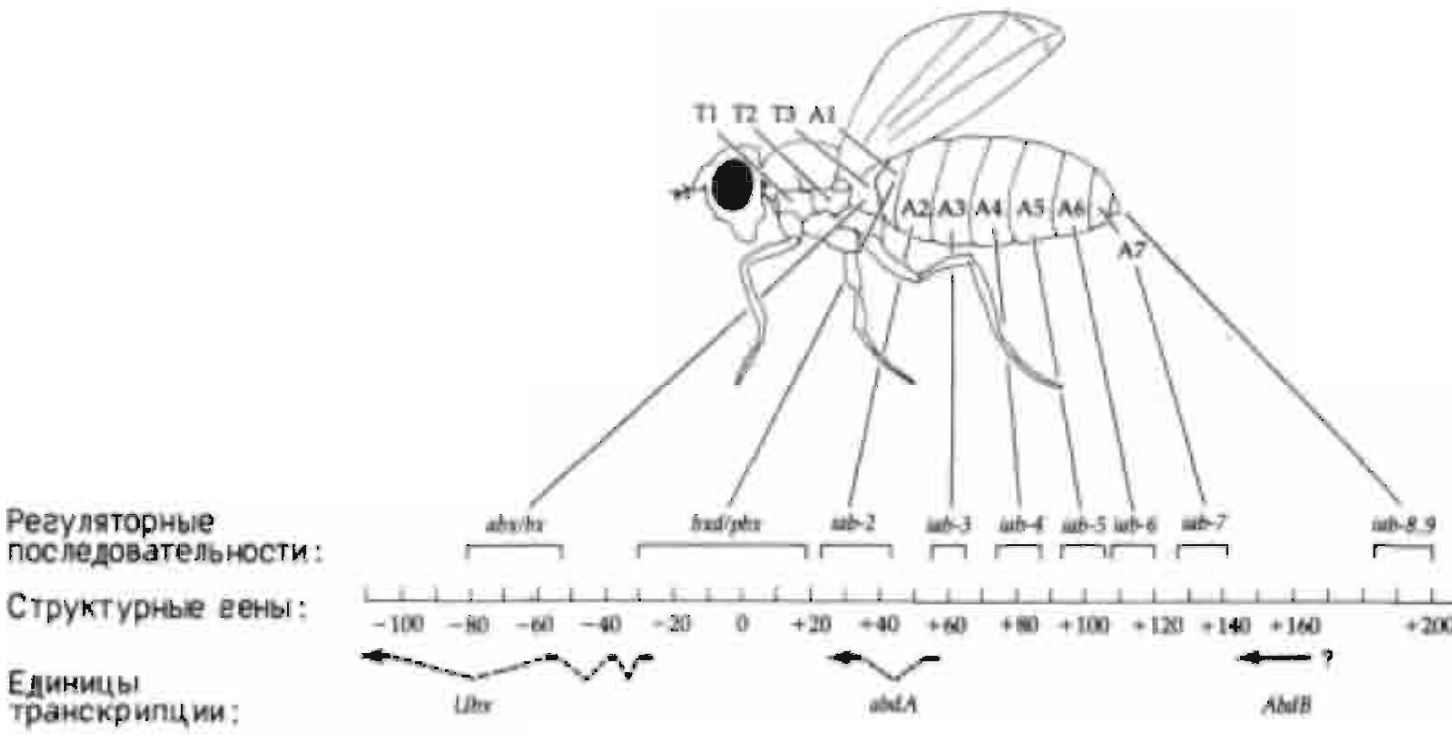


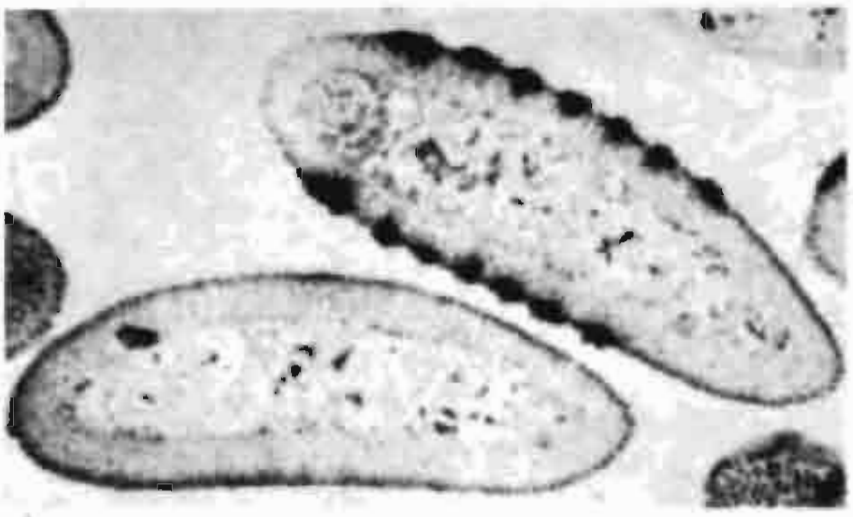
Рис. 18.29. Мутации комплекса bithorax. Непрерывная линия представляет участок комплекса длиной в 300 тыс. пар нуклеотидов. Ниже представлены три единицы транскрипции, которым соответствуют три гомеозисных белка. Каждый из этих генов транскрибируется справа налево. Экзоны изображены сплошными жирными линиями, интроны – штриховыми. (Структура гена *abdB* полностью не ясна.) В верхнем ряду представлены регуляторные последовательности, выявленные генетическим анализом. Наклонные линии соотносят гомеозисный ген с передней частью сегмента, нарушенного у мутанта. *(По Peifer et al., 1987.)*

переднего компартмента жужжальца развивается передний компартмент крыла. Сходным образом ген *bxd* репрессирует активность *Ubx* в шестом парасегменте (Peifer et al., 1987).

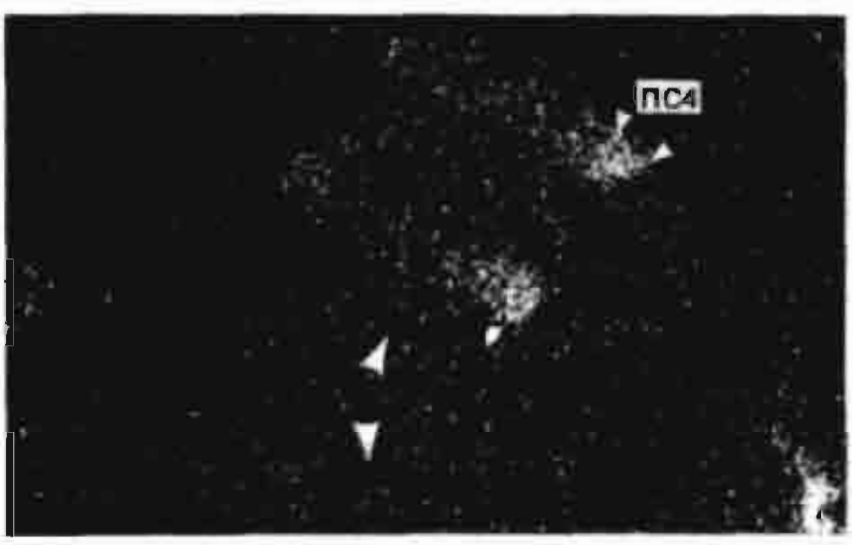
Как видно из рис. 18.29, число регуляторных локусов должно быть равно числу сегментов, контролируемых bithorax-комплексом. Это соответствует модели Льюиса. Анализ механизмов *цис*-регуляторного контроля парасегментарной и тканеспецифической экспрессии трех структурных генов bithorax-комплекса должен объяснить закономерности генетического контроля онто- и филогенетического становления пространственной организации дрозофилы.

Регуляция регуляторов

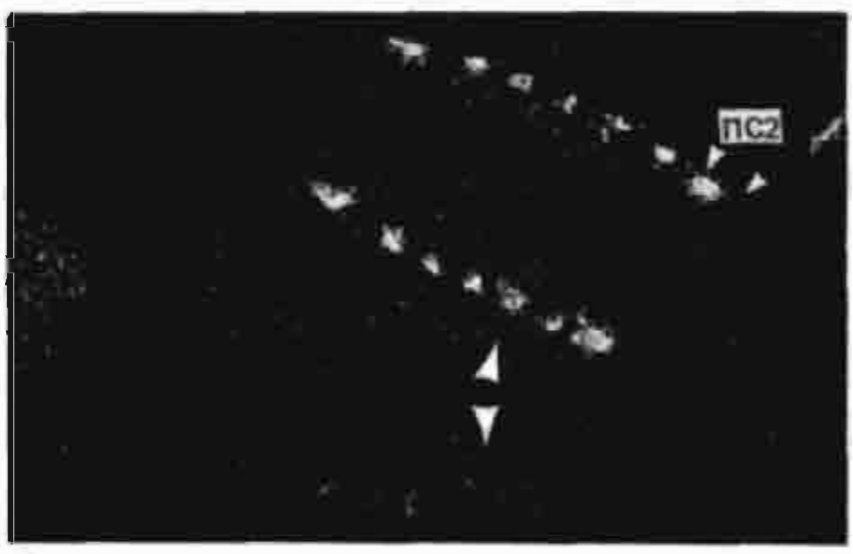
Генетический контроль при формировании пространственной организации у дрозофилы осуществляется посредством взаимодействия генов и их продуктов на трех уровнях. Первый уровень – это гены с материнским эффектом *bicaudal, bicoid* и *caudal* (см. гл. 7), устанавливающие переднезадний градиент (Meinhardt, 1986). На втором уровне гены сегментации интерпретируют возникший градиент и формируют набор парасегментов благодаря экспрессии генов gap-группы, отдельные парасегменты – благодаря экспрессии генов группы pair-rule и их компартменты – благодаря экспрессии генов группы segment-polarity. Третий уровень характеризует активность гомеозисных генов, определяющих морфологическую специфику отдельного парасегмента. Последовательная активация генов разных уровней устанавливает полярность ооцита и границы компартментов на стадии клеточной бластодермы, а экспрессия гомеозисных селекторных генов вскоре после гаструляции детерминирует судьбу отдельных групп клеток. Характер проявления мутации *Polycomb*, обусловливающей идентичность всех восьми абдоминальных сегментов, доказал независимый характер становления числа и положения (периодичности) сегментов от активности гомеозисных генов. Экспрессия генов сегментации, по-видимому, регулирует экспрессию гомеозисных генов двумя путями. Во-первых, гены, устанавливающие компартменты, детерминируют парасегментарные границы, в пределах которых транскрибируются гомеозисные гены (Akam, 1985). Таким образом, несмотря на экспрессию гена *Ultrabithorax* в парасегментах 5–13, он активен и у мутанта по гену gap-группы *hunchback* (White, Lehmann, 1986). Экспрессия гена *Ubx* в необычном для него месте приводит к трансформации головных и грудных сегментов в брюшные. Во-вторых, активация гомеозисных генов может зависеть от продуктов компартментализующих генов. Такая зависимость обнаружена с помощью гибридизации in situ радиоактивной ДНК с транскриптами гомеозисных генов. Рядом авторов (Duncan, 1986; Ingham, Martinez-Arias, 1986) было показано, что нормальная активность некоторых гомеозисных селекторных генов зависит от экспрессии гена *fushi tarazu* (рис. 18.30). В бластодерме



А



Б



В

зародышей *ftz*⁻ активность гена *Antennapedia* (который обычно экспрессируется в парасегментах 3 и 4) и гомеотического гена *Six comb reduced* (который обычно экспрессируется в семи парасегментах) ингибирована.

Удалось получить прямые данные, свидетельствующие о взаимодействии гена *ftz* с гомеозисными генами (Robertson, 1987). Это оказалось возможным благодаря конструированию плазмиды, у которой промоторы генов *Ubx* и *Antp* соединены с геном хлорамфениколацетилтрансферазы (ген *CAT*). По наличию или отсутствию хлорамфениколацетилтрансферазы можно судить о том, экспрессировался ли ген *CAT* или нет. Кроме того, была сконструирована плазмида с геном *ftz*, имеющим сильный актиновый промотор, благодаря которому ген экспрессировался практически в любой клетке. Различные комбинации плазмид трансфицировали в культуру клеток дрозофилы, инкубировали их в течение 1–3 сут и измеряли уровень ферментативной активности белка CAT (рис. 18.31). Клетки, трансфицированные геном *CAT* с промотором *Ubx* или *Antp* не экспрессировали хлорамфениколацетилтрансферазу. Однако если ген *ftz* также трансфицировали в клетку, то актиновый промотор активировал ген *CAT*. Таким образом, присутствие гена сегментации *ftz* необходимо для активации промоторов гомеозисных генов *Ultrabithorax* и *Antennapedia*.

Гомеозисные гены также способны регулировать экспрессию других гомеозисных генов. Гены *Antennapedia* и *Ultrabithorax* характеризуются комплементарностью экспрессии: *Ubx* активен в парасегментах с пятого по тринадцатый (с максимальным уровнем транскрипции в шестом парасегменте), а *Antp* – в третьем и четвертом. В *Ubx*⁻-зародыше активность гена *Antennapedia* не ограничена третьим и четвертым парасегментами, он начинает транскрибироваться в брюшке (Hafen et al., 1984b). Ген комплекса bithorax – *abd A* – также регулирует активность гена *Ubx*. Отсутствие активности *Abd A* приводит к сильно выраженной экспрессии гена *Ubx* в парасегментах 6–12, хотя обычно он экспрессируется в сегменте 6. В результате происходит гомеозисная трансформация парасегментов 7–12 в копии парасегмента 6. Следовательно, *abd A* осуществляет негативную регуляцию гена *Ubx* (Struhl, White, 1985).

Рис. 18.30. Зависимость экспрессии двух гомеозисных генов от активности гена сегментации *fushi tarazu*. Гибридизация in situ радиоактивных зондов ДНК *ftz* проведена на соседних срезах от двух зародышей на стадии клеточной бластодермы: нормальном (верхний из двух представленных на каждой части рисунка) и мутантном по гену *ftz* (нижний). *А*. Радиоавтография среза, на котором проводилась гибридизация с радиоактивной ДНК *ftz*: 7 полос РНК обнаружены в зародышах дикого типа и не обнаружены у мутантов по гену *ftz*. *Б*. Темнопольный радиоавтограф, полученный с использованием радиоактивной ДНК гена *Antennapedia*, показывает его экспрессию в 4-м парасегменте нормального зародыша (ПС4 и маленькие стрелки) и ее отсутствие у зародышей с мутацией *ftz* (большие стрелки). *В*. Темнопольный радиоавтограф гибридизации радиоактивной ДНК гена *Sex comb reduced (Scr)*, выявленной в 7 полосах у зародыша дикого типа, которые совпадают с активностью гена *ftz*. мРНК гена *Scr* не обнаружена у мутантных по гену *ftz* зародышей даже во 2-м парасегменте (ПС2 и большие стрелки). (Ingham, Martinez-Arias, 1986; фотография с любезного разрешения авторов.)

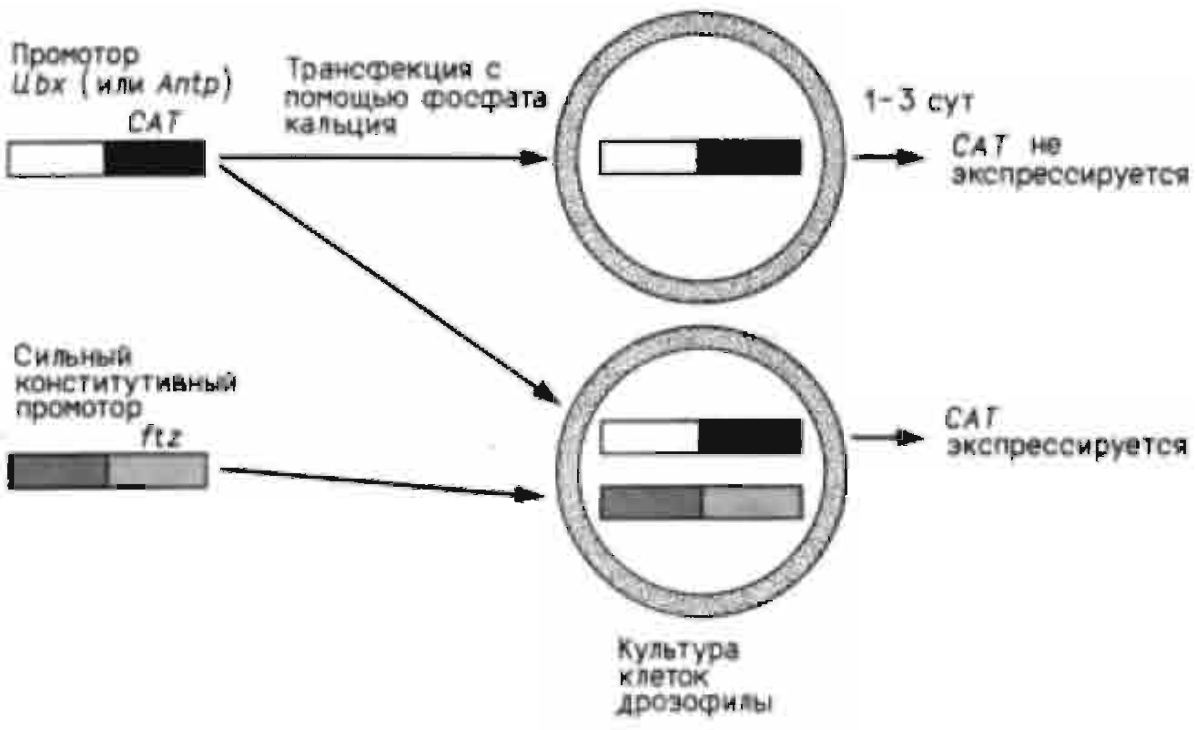


Рис. 18.31. **Влияние гена *fushi tarazu* на транскрипцию двух гомеозисных генов.** Культура клеток дрозофилы не экспрессирует трансфицированный в нее ген хлорамфениколацетилтрансферазы (*CAT*), присоединенный к промоторам генов *Ubx* и *Antp*. Однако совместная трансфекция гена *CAT* с промотором гена *Ubx* (или *Antp*) и плазмиды гена *ftz* с сильным активным промотором приводит к активации промоторов гомеозисных генов и экспрессии гена *CAT*.

Взаиморегуляцию гомеозисных генов удалось обнаружить in vitro (Krasnow et al. по Robertson, 1987). Как указывалось выше, совместная трансфекция гена *CAT* с промотором *Antp* и гена *ftz* с промотором актина обусловливала появление ферментативной активности белка CAT. Однако трансфекция третьей плазмиды – гена *Ubx* с сильным промотором – заметно снижала уровень синтеза белка. Следовательно, продукт гена *Ubx* дикого типа ингибирует промотор *Antp*. Причем продукт гена *Ubx* стимулирует гиперпродукцию белка геном *CAT* в плазмиде с промотором *Ubx*, а экспрессия гена *Ubx*, по-видимому, ингибирует *Antp* и активирует свою собственную транскрипцию (рис. 18.32). Множественные *цис*-регуляторные области bithorax-комплекса, вероятно, имеют сайты связывания с гомеозисными белками, действующими как *транс*-регуляторы.

Молекулярная биология генов, контролирующих пространственную организацию зародыша

Принято считать, что знание структуры любого биологического объекта (будь то кость или ген) приближает нас к пониманию его функций. Структура гомеозисных генов нацеливает исследователя на понимание сложных форм регуляции, поскольку клонирование гомеозисных генов установило далеко не простой характер их организации. Некоторые из них имеют несколько промоторов и сайтов инициации транскрипции. Ген *Antennapedia*, например, транскрибирует два типа РНК, причем синтез одной из них происходит внутри интрона другой (18.33) (Frischer et al., 1986). РНК некоторых гомеозисных генов, в частности гена *Ultrabithorax*, подвергаются тканеспецифическому дифференциальному сплайсингу. Другие гены, такие, как *fushi tarazu*, имеют множественные энхансерные области (Hiromi, Gehring, 1987). Последовательность ДНК рядом с геном *ftz* контролирует полосатый (тип зебра) характер его экспрессии. Присоединение его к другим генам приводит к появлению у них зебровой формы транскрипции. Левее элемента «зебра» расположен участок ДНК, ответственный за экспрессию *ftz* в клетках центральной нервной системы, а еще выше – энхансер зебровой формы проявления данного гена. Продукт гена *ftz* регулирует энхансер-зебра (рис. 18.34).

Последовательности ДНК, контролирующие становление пространственной организации, формируют сложные гены, которые регулируют такое становление, по-видимому, не только по принципу «включен – выключен», но и с помощью сочетания набора их альтернативных состояний. Способность клеток, экспрессирующих одни и те же гомеозисные гены в разных сегментах, формировать разные морфологические структуры возможна при соблюдении следующих условий: 1) регуляция синтеза гомеозисных белков в разных клетках должна осуществляться на разных уровнях, 2) в различных клетках должны возникать различные комбинации гомеозисных белков, 3) продукты генов сегментации должны сохраняться, чтобы модифицировать продукты гомеозисных генов и 4) в различных клетках должен происходить альтернативный сплайсинг или альтернативный процессинг (Scott, Carroll, 1987). Это особенно важно в случае активации гомеозисными генами различных батарей генов. Существуют данные в пользу каждой из предложенных моделей.

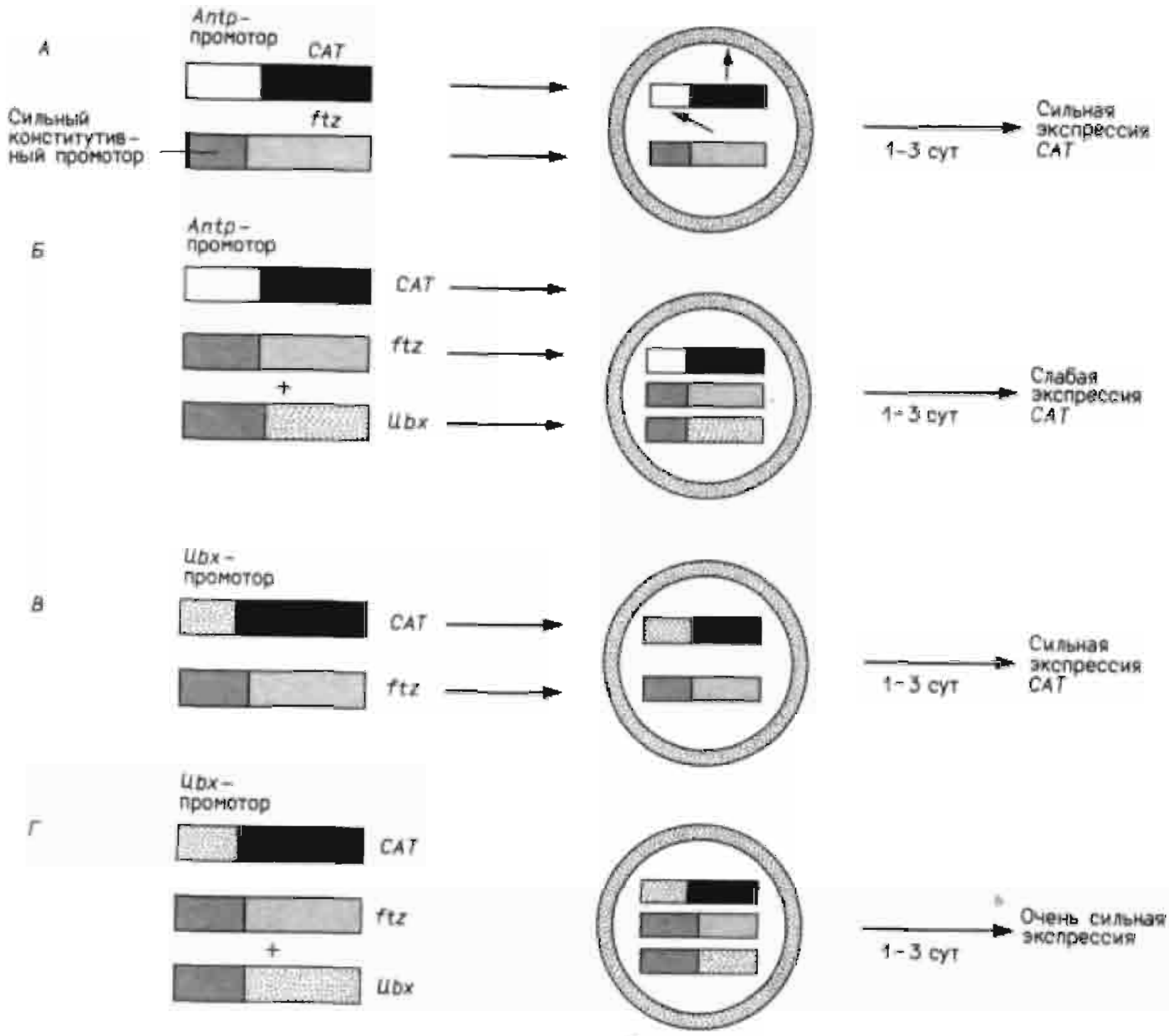


Рис. 18.32. Регуляторные взаимодействия двух гомеозисных генов. *А, Б.* Репрессия промотора *Antp* продуктом гена *Ubx*. *А.* Если ген *CAT* слит с промотором *Antp*, то в присутствии продукта гена *ftz* происходит транскрипция гена *CAT*. *Б.* Добавление в систему (А) продукта гена *Ubx* приводит к репрессии гена *CAT*. *В, Г.* Автостимуляция промотора *Ubx* продуктом гена *Ubx*. *В.* Ген *CAT* с промотором *Ubx* транскрибирует *CAT* в присутствии продукта гена *ftz*. *Г.* Добавление в систему продукта гена *Ubx* вызывает усиленную продукцию белка CAT.

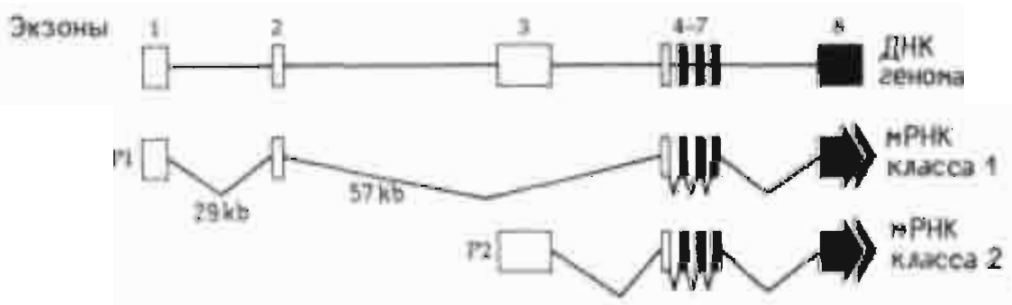


Рис. 18.33. Транскрипция гена *Antennapedia* инициируется в любого промотора: P1 или P2. На самом деле белок *Antennapedia* кодируют 5–8-й экзоны (черные). Терминация транскрипции может происходить в двух местах (двойные стрелки 8-го экзона). (По Frischer et al., 1986.)

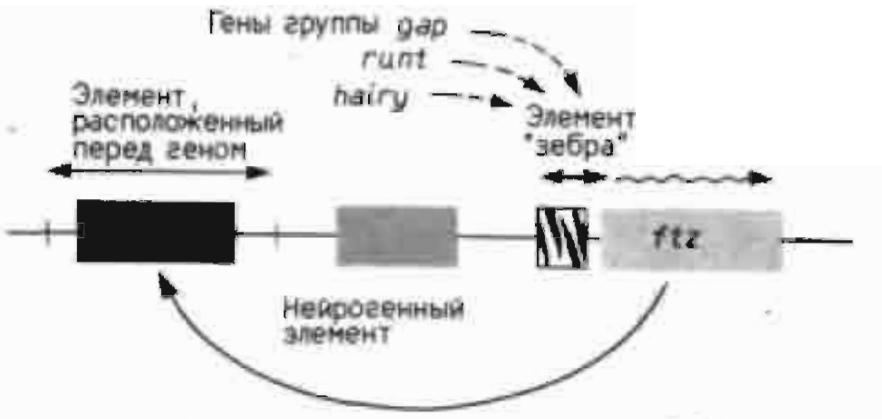


Рис. 18.34. Регуляторные элементы гена *fushi tarazu*. Элемент «зебра» обусловливает полосатый паттерн экспрессии гена на стадии бластодермы. Активность этого гена регулируют гены группы gap и некоторые гены группы pair-rule, такие, как *runt* и *hairy*. Расположенная перед геном *ftz* последовательность, позитивно реагирующая на белок *ftz*, как полагают, необходима для сохранения зебрового паттерна. Рядом с геном *ftz* обнаружена последовательность, контролирующая экспрессию гена *ftz* в нервной системе личинки. (По Hiromi, Gehring, 1987.)

Гомеобокс

Конкретные механизмы установления гомеозисными генами границ своей экспрессии пока не выяснены. Однако один из них, по всей видимости, найден: все шесть гомеозисных генов имеют общую последовательность длиной 180 пар нуклеотидов, которой соответствует определенный участок полипептидной цепи. Эта область ДНК была названа **гомеобоксом**, а ее белковый продукт – **гомеодоменом** (McGinnis et al., 1984; Scott, Weiner, 1984). Гомеодомены разных гомеозисных генов гомологичны на 80–90% (рис. 18.35).

Некоторые из генов сегментации и генов с материнским эффектом – *fushi tarazu*, *engrailed*, *caudal*, *zen* и *bicoid* – также имеют гомеобокс, хотя и с меньшей (около 50%) степенью гомологии. (Гомеобокс гена *fushi tarazu* более сходен с гомеобоксом гомеозисных генов, чем любой другой ген сегментации.) Имеет ли гомеобокс какое-либо регуляторное значение? Существуют данные в пользу утвердительного ответа на данный вопрос. Во-первых, гомеобокс сходен с некоторыми специфическими ядерными последовательностями (гл. 14), белковые продукты которых возвращаются в ядро. Во-вторых, эти белковые продукты способны присоединяться к ДНК (O'Farrell et al., 1985). Гомеодомен гена *engrailed* имеет специфическое сродство к своей собственной 5′-фланкирующей последовательности и таковой же гена *ftz* (Desplan et al., 1985). Продукт гена *even-skipped* также способен присоединяться к гену *engrailed*. В-третьих, эмбриональные клетки в раннем развитии характеризует специфический набор активных и неактивных гомеозисных генов (Levine et

	1																			20
Hox-1	Сер	Лиз	Арг	Гли	Арг	Тре	Ала	Тир	Тре	Арг	Про	Гли	Лей	Вал	Глу	Лей	Глу	Лиз	Глу	Фен
MM3	Арг	Лиз	Арг	Гли	Арг	Гли	Тре	Тир	Тре	Арг	Тир	Гли	Тре	Лей	Глу	Лей	Глу	Лиз	Глу	Фен
Antp	Арг	Лиз	Арг	Гли	Арг	Гли	Тре	Тир	Тре	Арг	Тир	Гли	Тре	Лей	Глу	Лей	Глу	Лиз	Глу	Фен
ftz	Сер	Лиз	Арг	Тре	Арг	Гли	Тре	Тир	Тре	Арг	Тир	Гли	Тре	Лей	Глу	Лей	Глу	Лиз	Глу	Фен
Ubx	Арг	Арг	Арг	Гли	Арг	Гли	Тре	Тир	Тре	Арг	Тир	Гли	Тре	Лей	Глу	Лей	Глу	Лиз	Глу	Фен

	21																			40
Hox-1	Гис	Фен	Асн	Арг	Тир	Лей	Мет	Арг	Про	Арг	Арг	Вал	Глу	Мет	Ала	Асн	Лей	Лей	Асн	Лей
MM3	Гис	Фен	Асн	Арг	Тир	Лей	Тре	Арг	Арг	Арг	Арг	Иле	Глу	Иле	Ала	Гис	Вал	Лей	Цис	Лей
Antp	Гис	Фен	Асн	Арг	Тир	Лей	Тре	Арг	Арг	Арг	Арг	Иле	Глу	Иле	Ала	Гис	Ала	Лей	Цис	Лей
ftz	Гис	Фен	Асн	Арг	Тир	Иле	Тре	Арг	Арг	Арг	Арг	Иле	Асп	Иле	Ала	Асн	Ала	Лей	Сер	Лей
Ubx	Гис	Тре	Асн	Гис	Тир	Лей	Тре	Арг	Арг	Арг	Арг	Иле	Глу	Мет	Ала	Тир	Ала	Лей	Цис	Лей

	41																			60
Hox-1	Тре	Глу	Арг	Гли	Иле	Лиз	Иле	Три	Фен	Гли	Асн	Арг	Арг	Мет	Лиз	Тир	Лиз	Лиз	Асп	Гли
MM3	Тре	Глу	Арг	Гли	Иле	Лиз	Иле	Три	Фен	Гли	Асн	Арг	Арг	Мет	Лиз	Три	Лиз	Лиз	Глу	Асн
Antp	Тре	Глу	Арг	Гли	Иле	Лиз	Иле	Три	Фен	Гли	Асн	Арг	Арг	Мет	Лиз	Три	Лиз	Лиз	Глу	Асн
ftz	Сер	Глу	Арг	Гли	Иле	Лиз	Иле	Три	Фен	Гли	Асн	Арг	Арг	Мет	Лиз	Сер	Лиз	Лиз	Асп	Арг
Ubx	Тре	Глу	Арг	Гли	Иле	Лиз	Иле	Три	Фен	Гли	Асн	Арг	Арг	Мет	Лиз	Лей	Лиз	Лиз	Глу	Иле

Рис. 18.35. Гомеодомены пяти белков, кодируемых генами с гомеобоксами: *Antp*, *ftz* и *Ubx* – у дрозофилы; *Hox-1* – у мыши и *MM3* – у шпорцевой лягушки. Светлые рамки соответствуют гомологичным последовательностям (гомеодомен гена *Antp* принят за стандарт). Полагают, что вариабельные последовательности (заключены в жирную рамку) соответствуют ДНК-связывающим сайтам. (из Gehring, 1985.)

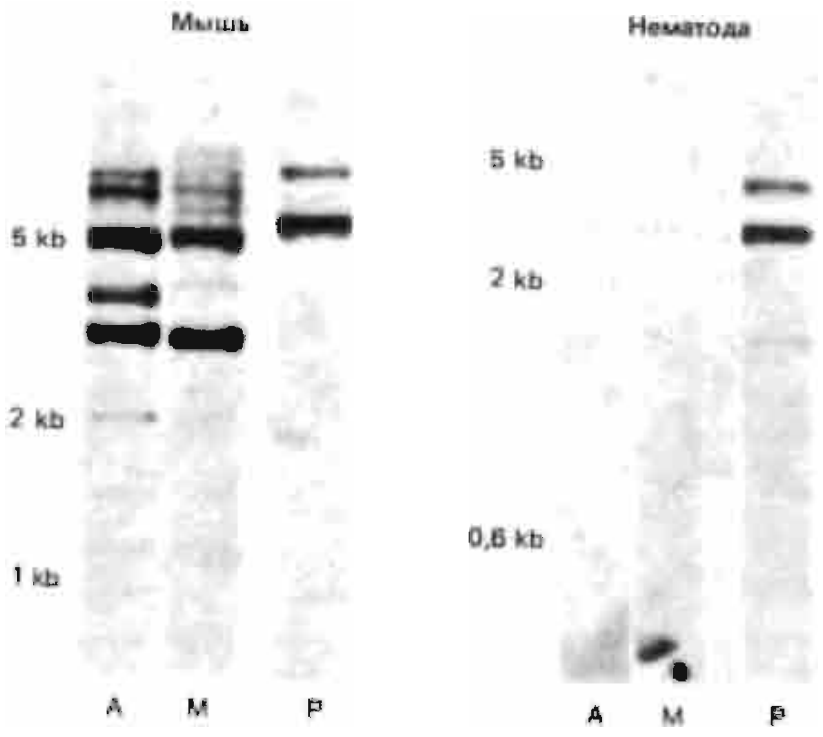


Рис. 18.36. Перенос по Саузерну ДНК мыши и ДНК нематоды, обработанных рестриктазой *Eco*R1 и гибридизованной с ДНК гена *Antennapedia*. Электрофорез ДНК мыши выявил 7 полос. A, M – зонды гомеобоксов; P – зонд рибосомной РНК. Цифры слева от дорожек указывают на величину соответствующих фрагментов в килобазах (kb). (Holland, Hogan, 1986; фотографии с любезного разрешения B. Hogan.)

al., в печати). Этого и следует ожидать при условии, что разные комбинации белков с гомеодоменом активируют различные батареи структурных генов.

Другой категорией данных в пользу принципиальной роли гомеобокса в развитии является его жесткая филогенетическая консервативность. Удивительное сходство можно обнаружить при сравнении гомеодоменов гена *MM3* лягушки и гена *Antennapedia* дрозофилы (рис. 18.35). В данном случае 59 из 60 аминокислотных остатков одинаковы, несмотря на то, что мухи и лягушки развивались независимо около 600 млн. лет (Müller et al., 1984). Тестирование генома различных животных радиоактивной ДНК гена *Antennapedia*, имеющего гомеобокс, с помощью Саузерн-переноса позволило выявить у них гены с гомеобоксом (рис. 18.36). Выделение генов с гомеобоксом оказалось возможным благодаря клонированию и скринингу их клонов ДНК гена *Antp*. Такие гены удалось обнаружить у лягушек, мышей, человека, иглокожих, аннелид и моллюсков; у плоских и круглых червей, дрожжей и миксомицетов они не обнаружены (Holland, Hogan, 1986). У человека и мыши гены с гомеобоксом активны в определенное время и определенных тканях в раннем развитии. Так же как и у насекомых, они экспрессируются в нервной системе (Simeone et al., 1986; Awgulewitsch et al., 1986). Один из них – *Hox-2.1*, – локализованный в хромосоме 11 мыши, активен в клетках заднего мозга на 11–13 сут развития. Другой ген – *Hox-3.1*, – находящийся в хромосоме 15, экспрессируется в шейном и грудном отделах спинного мозга, а *Hox-1.3*, активность которого также обнаружена в грудных структурах, первоначально экспрессируется в клетках осевой мезодермы и нейральной эктодермы (рис. 18.37). Гомеодомен гена *Hox-1.5* мыши присоединяется к своему собственному гомеобоксу (Fainsod et al., 1986). Приведенные данные позволяют утверждать, что у позвоночных гены с гомеобоксом выполняют морфогенетические функции. Если это действительно так, то обнаружен один из фундаментальных принципов онтогенеза животных.





Рис. 18.37. Локализация мышиного гена *Hox-1.3*, содержащего гомеобокс, выявленная методом гибридизации in situ. Срезы 9-дневного зародыша мыши фиксировали и окрашивали (*А*) или инкубировали с радиоактивными нуклеотидами, полученными с помощью клонированного гена *Hox-1.3* (*Б*). мРНК гена обнаружена в осевой мезодерме и нервной трубке. Ген экспрессируется на 8–13-е сутки эмбриогенеза мыши. (Из Dony, Gruss, 1987; фотографии с любезного разрешения P. Gruss.)

Дополнительные сведения и гипотезы

Эволюция на основе гомеозисных генов?

В конце 30-х гг. Рихард Гольдшмидт и Конрад Уоддингтон предположили, что гомеозисные гены являются тем звеном, которое связывает развитие, генетику и эволюцию. Уоддингтон (Waddington, 1940) подчеркивал, что гомеозисные гены представляют собой эмбриональные переключатели, способные регулировать направление дифференцировки. Гольдшмидт (Goldschmidt, 1938) рассматривал гомеозисные гены как гены, вызывающие одновременно крупные изменения в развитии зародыша и, таким образом, играющие важную роль в эволюционном процессе. Внимание, которое уделяли гомеозисным генам Гольдшмидт и Уоддингтон, предвосхитило успехи науки наших дней. Используя делеционных мутантов дрозофилы, можно в общих чертах воспроизвести эволюционное становление этого вида (рис. 18.38). Полагают, что дрозофила как представитель отряда двукрылых происходит от насекомых с четырьмя крыльями. Этот эволюционный шаг может быть генетически смоделирован делецией гена *Ubx* (рис. 18.28). Исследователи считают, что крылатые насекомые происходят от первичнобескрылых насекомых. Это можно представить как результат делеции гена *Antennapedia*, которая трансформирует все грудные сегменты в первый грудной сегмент, не имеющий крыльев. Бескрылые насекомые произошли от членистоногих, подобных многоножкам. Это имитирует делеция всего bithorax-комплекса и соответствующая ей трансформация всех брюшных сегментов в грудные. И наконец, делеция обоих наборов гомеозисных генов (Antennapedia- и bithorax-комплексов) приводит к состоянию примитивных членистоногих – онихофор. Рэфф и Кофмен утверждают, что благодаря последовательным делециям относительно небольших участков наследственной молекулы можно раскапывать слои генетического грунта. Однако они предостерегают от буквальной интерпретации подобной аналогии, поскольку полная делеция даже одного комплекса Antennapedia приводит к появлению не многоножки, а летального мутанта.

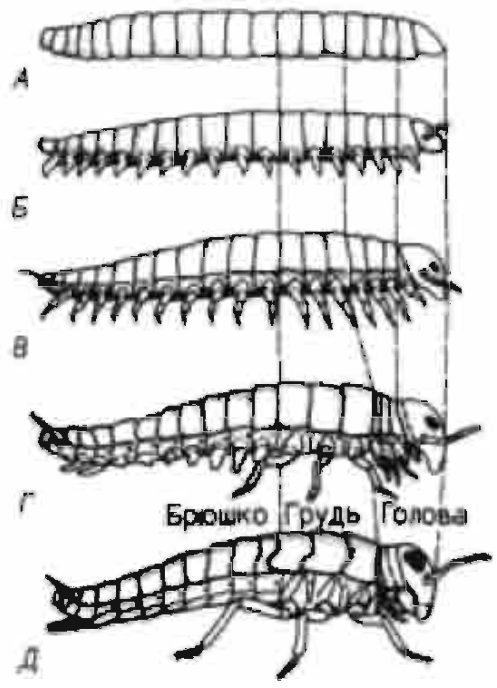


Рис. 18.38. Схема эволюционных преобразований насекомых, контролируемых гомеозисными генами. *А*. Аннелиды. *Б*. Онихофоры. *В*. Многоножки. *Г*. Бескрылые насекомые. *Д*. Насекомые с крыльями. (По Raff, Kaufman, 1983.)

Формирование специфического фенотипа клеток: позиционная информация

На заключительном этапе реализации генотипа у дрозофилы активируются специфические батареи генов (в основном благодаря их активации белковыми продуктами гомеозисных генов). Это чрезвычайно сложное событие происходит на основе двух процессов. Одним из них является дифференцировка, во время которой клетка получает инструкцию относительно спектра белков, которые ей предстоит синтезировать. Однако до этого клетка должна определить свою позицию: находится ли она, например, во втором грудном сегменте около основания ноги (около коксы или вертлуга) или около ее терминальных структур (лапки или коготка)? Типы клеток в этих структурах могут быть идентичны друг другу, однако различны по своей позиции.

Отсюда следует, что *спецификация* клеток – способность формировать определенную структуру внутри морфогенетического поля – не зависит от типа детерминации клетки. Например, детерминация клеток имагинальных дисков существенно различается: крыловые диски развиваются в крылья, ножные – в ноги, однако спецификация их может быть идентичной. Это иллюстрирует гомеозисный мутант Antennapedia, у которого структуры антенны трансформированы в структуры ноги (Postlethwait, Schneiderman, 1971). Изредка трансформация может захватывать целую антенну и она вся превращается в ногу, однако чаще она ограничена отдельными члениками антенны. В этом последнем случае категория замещений проявляет позиционную специ-

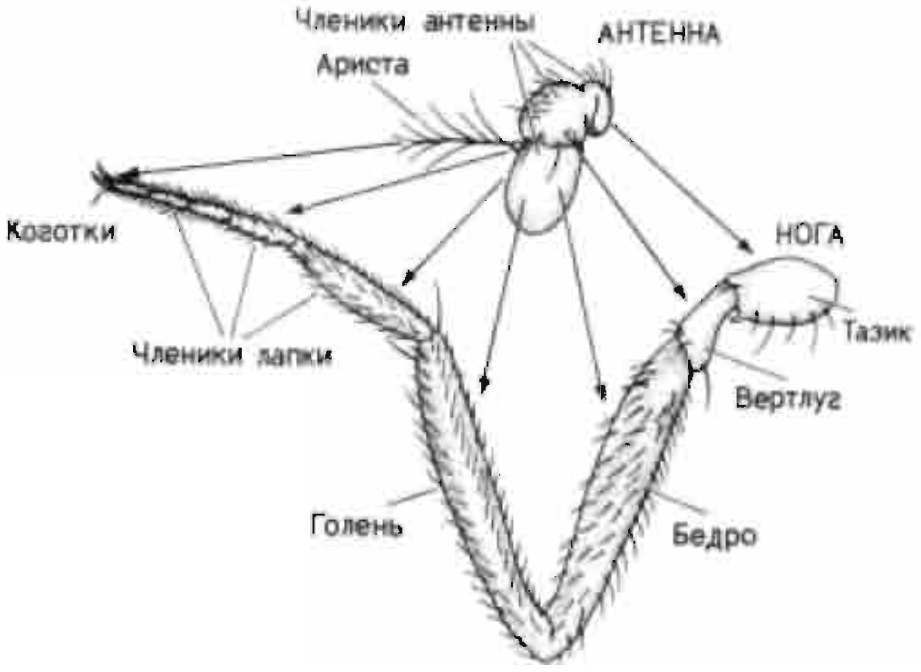


Рис. 18.39. Соответствие структур антенны и ноги. У мутанта *Antennapedia* отдельные членики антенны трансформированы в структуры ноги (см. рис. 9.6, *Б*). Стрелки указывают трансформацию структур одного органа в другой. (По Postlethwait, Schneiderman, 1971.)

фичность. Клетки антеннального диска, в норме формирующие дистальный членик антенны (аристу), способны трансформироваться только в дистальные структуры ноги (коготок); клетки второго членика антенны – только во второй сегмент ноги и т. д. Оба органа, антенна и нога, и соответствующие превращения структур антенны в структуры ноги представлены на рис. 18.39. На основании приведенных результатов следует сделать вывод о том, что два различно детерминированных диска используют один и тот же механизм спецификации судьбы отдельных клеток.

Мы еще только начинаем постигать закономерности воздействий генома на строение того или иного организма. Гены, регулирующие формирование пространственной организации у дрозофилы, функционируют в соответствии с определенными принципами. Во-первых, с временны́м принципом транскрипции разных групп генов; во-вторых, с принципом пространственной детерминации распределения активности генов, осуществляемой взаимодействием с продуктами экспрессии генов данной группы и предшествующих групп генов; в-третьих, в соответствии с позицией клетки на продольной оси зародыша, гетерогенность которой определена пространственным распределением соответствующих генных продуктов. Взаимодействие продуктов различных генов детерминирует судьбу клетки. Однако механизмы, на основе которых гены сегментации интерпретируют различные концентрации продуктов генов с материнским эффектом и определяют активность гомеозисных генов, остаются загадкой, равно как и механизмы активации специфических наборов генов, определяющих конечный фенотип клетки.

Мы далеки от полного понимания законов формирования пространственной организации дрозофилы, но все-таки ближе к нему, чем 5 лет назад. Анализ продуктов мутантных и нормальных аллелей дрозофилы явился первым шагом в исследовании многоуровневой регуляции становления пространственной организации у более сложных организмов. Следующее десятилетие должно ознаменоваться получением новых знаний о плодовой мухе и ее развитии.

ЛИТЕРАТУРА

Akam M. E. (1985). Segments, lineage boundaries and the domains of expression of homeotic genes, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B **312**, 179–187.

Augulewitsch A., Utset M. F., Hart C. P., McGinnis W., Ruddle F. H. (1986). Spatial restriction in expression of a mouse homeobox locus within the central nervous system, Nature, **320**, 328–335.

Brower D. L., Piovant M., Reger L. A. (1985). Developmental analysis of *Drosophila* position-specific antigens, Dev. Biol., **108**, 120–130.

Carroll S. B., Winslow G. M., Schüpbach T., Scott M. P. (1986). Maternal control of *Drosophila* segmentation gene expression, Nature, **323**, 278–280.

Carroll S. B., Scott M. P. (1986). Zygotically active genes that affect the spatial expression of the *fushi tarazu* segmentation gene during early *Drosophila* embryogenesis, Cell, **45**, 113–126.

Casanova J., Sanchez-Herrero E., Busturia A., Morata G. (1987). Double and triple mutant combination of the bithorax complex of *Drosophila*, EMBO J., **6**, 3103–3109.

Casanova J., Sanchez-Herrero E., Morata G. (1985). Prothoracic transformation and functional structure of the *Ultrabithorax* gene of *Drosophila*, Cell, **42**, 663–669.

Crick F. H. C., Lawrence P. A. (1975). Compartments and polyclones in insect development, Science, **189**, 340–347.

Desplan C., Theis J., O'Farrell P. H. (1985). A *Drosophila* developmental gene, *engralied*, encodes a sequence-specific DNA binding activity, Nature, **318**, 630–635.

Dony C., Gruss P. (1987). Specific expression of the *Hox-1.3* homeo box gene in murine embryonic structures originating or induced by the mesoderm, ENBO J., **6**, 2965–2975.

Duncan I. (1986). Control of bithorax complex functions by the segmentation gene *fushi tarazu* of *D. melanogaster*, Cell, **47**, 297–309.

Edgar B. A., Schubiger G. (1986). Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development, Cell, **44**, 871–877.

Fainsod A., Bogarad L. D., Ruusala T., Lubin M., Crothers D. M., Ruddle F. H. (1986). The homeo domain of a murine protein binds 5′ to its own homeobox, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 9532–9536.

Foe V. E., Alberts B. M. (1983). Studies of nuclear and cytoplasmic behavior during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis, J. Cell Sci., **61**, 31–70.

Frischer L. E., Hagen F. S., Garber R. L. (1986). An inversion that disrupts the *Antennapedia* gene causes abnormal structure and localization of RNAs, Cell, **47**, 1017–1023.

Garcia-Bellido A. (1975). Genetic control of wing development in *Drosophila*, Ciba Found. Symp., **29**, 161–182.
Gehring W.J. (1985). Homeotic genes, the homeobox, and the genetic control of development, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **50**, 243–251.
Goldschmidt R.B. (1938). Physiological Genetics, McGraw-Hill, New York.
Hafen E., Kuroiwa A., Gehring W.J. (1984a). Spatial distribution of transcripts from the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* embryonic development, Cell, **37**, 833–841.
Hafen E., Levine M., Gehring W.J. (1984b). Regulation of *Antennapedia* transcript distribution by the bithorax complex in *Drosophila*, Nature, **307**, 287–289.
Harding K., Rushlow C., Doyle H.J., Hoey T., Levine M. (1986). Cross-regulatory interactions among pair-rule genes in *Drosophila*, Science, **233**, 953–959.
Harding K., Wedeen C., McGinnis W., Levine M. (1985). Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila*, Science, **229**, 1236–1242.
Hiromi Y., Gehring W.J. (1987). Regulation and function of the *Drosophila* segmentation gene *fushi tarazu*, Cell, **50**, 963–974.
Holland P.W.H., Hogan B.L.M. (1986). Phylogenetic distribution of *Antennapedia*-like homeoboxes, Nature, **321**, 251–253.
Howard K., Ingham P. (1986). Regulatory interactions between the segmentation genes *fushi tarazu*, *hairy*, and *engrailed* in the *Drosophila* blastoderm, Cell, **44**, 949–957.
Ingham P.W., Martinez-Arias A. (1986). The correct activation of *Antennapedia* and bithorax complex genes requires the *fushi tarazu* gene, Nature, **324**, 592–597.
Ingham P.W., Ish-Horowicz D., Howard K.R. (1986). Correlative changes in homeotic and segmentation gene expression in Krüppel mutant embryos of *Drosophila*, EMBO J., **5**, 1659–1665.
Jäckle H., Tautz D., Schuh R., Seifert E., Lehmann R. (1986). Cross-regulatory interactions among the gap genes of *Drosophila*, Nature, **324**, 668–670.
Just E.E. (1939). The Biology of the Cell Surface, Blakiston, Philadelphia.
Karch F., and 7 others (1985). The abdominal region of the bithorax complex, Cell, **43**, 81–96.
Kauffman S.A., Shymko R.M., Trabert K. (1978). Control of sequential compartment formation in *Drosophila*, Science, **199**, 259–270.
Kornberg T., Sidén I., O'Farrell P., Simon M. (1985). The *engrailed* locus of *Drosophila*: In situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression, Cell, **40**, 45–53.
Laughton A., Carroll S.B., Storfer F.A., Riley P.D., Scott M.P. (1985). Common properties of proteins encoded by the *Antennapedia* complex genes of *Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **50**, 253–262.
Lawrence P.A., Morata G. (1976). Compartments in the wing of *Drosophila*: A study of the *engrailed* gene, Dev. Biol., **50**, 321–337.
Levine M., Frasch M., Hoey T., Harding K. (in press). Homeobox gene expression in *Drosophila*, UCLA Symp. Mol. Cell Biol.
Levine M., Harding H., Wedeen C., Doyle H., Hoey T., Radomska H. (1985). Expression of the homeobox gene family in *Drosophila*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **50**, 209–222.
Lewis E.B. (1985). Regulation of the genes of the bithorax complex in *Drosophila*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **50**, 155–164.
Lewis E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*, Nature, **276**, 565–570.
MacDonald P.M., Ingham P., Struhl G. (1986). Isolation, structure, and expression of *even-skipped*: A second pair-rule gene of *Drosophila* containing a homeobox, Cell, **47**, 721–734.
MacDonald P.M., Struhl G. (1986). A molecular gradient in early *Drosophila* embryos and its role in specifying the body pattern, Nature, **324**, 537–545.
Martinez-Arias A., Lawrence P.A. (1985). Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo, Nature, **313**, 639–642.
Mayr E. (1982). The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance, Harvard University Press, Cambridge, MA.
McGinnis W., Garber R.L., Wirz J., Kuroiwa A., Gehring W.J. (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans, Cell, **37**, 403–408.
Meinhardt H. (1984). Models for positional signaling, the three fold subdivision of segments and the pigmentation pattern of molluscs, J. Embryol. Exp. Morphol., **83** [Suppl.], 289–311.
Meinhardt H. (1986). Hierarchical inductions of cell states: A model for segmentation in *Drosophila*, J. Cell Sci., **4** [Suppl.], 357–381.
Müller M.M., Carrasco A.E., deRobertis E.M. (1984). A homeobox-containing gene expressed during oogenesis in *Xenopus*, Cell, **39**, 157–162.
Morata G., Lawrence P.A. (1977). Homeotic genes control compartments and cell determination in *Drosophila*, Nature, **265**, 211–216.
Murray J.D. (1981). A pre-pattern formation mechanism for animal coat markings, J. Theoret. Biol., **88**, 161–199.
Newman S.A., Frisch H.L. (1979). Dynamics of skeletal pattern formation in developing chick limb, Science, **205**, 662–668.
Nüsslein-Volhard C., Kluding H., Jürgens G. (1985). Genes affecting the segmental subdivision of the *Drosophila* embryo, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **50**, 145–154.
Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*, Nature, **287**, 795–801.
O'Farrell P.H., and 7 others. (1985). Embryonic pattern in *Drosophila*: The spatial distribution and sequence-specific DNA binding of engrailed protein, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **50**, 235–242.
Peifer M., Bender W. (1986). The *anterobithorax* and *bithorax* mutations of the bithorax complex, EMBO J., **5**, 2293–2303.
Peifer M., Karch F., Bender W. (1987). The bithorax complex: Control of segmental identity, Genes Dev., **1**, 891–898.
Postlethwait J.H., Schneiderman H.A. (1971). Pattern formation and determination in the antenna of the homeotic mutant *Antennapedia* of *Drosophila melanogaster*, Dev. Biol., **25**, 606–640.
Prigogine I., Nicolis G. (1967). On symmetry-breaking instabilities in dissipative systems, J. Chem. Phys., **46**, 3542–3550.
Raff R., Kaufman T.C. (1983). Embryos, Genes and Evolution: The Developmental–Genetic Basis of Evolutionary Change, Macmillan, New York.
Robertson M. (1987). A genetic switch in *Drosophila* morphogenesis, Nature, **327**, 556–557.
Rosenberg N.B., Schroader C., Preiss A., Krenlim A., Cote S., Ried I., Jäckle H. (1986). Structural homology of the product of the *Drosophila Krüppel* gene with *Xenopus* transcription factor IIIA, Nature, **319**, 336–339.
Sánchez-Herrero E., Vernós I., Marco R., Morata G. (1985). Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex, Nature, **313**, 108–113.
Schneuwly S., Kuroiwa A., Gehring W.J. (1987). Molecular analysis of the dominant homeotic *Antennapedia* phenotype, EMBO J., **6**, 201–206.

Scott M. P., Carroll S. B. (1987). The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development, Cell, **51**, 689–698.
Scott M. P., O'Farrell P. H. (1986). Spatial programming of gene expression in early *Drosophila* embryogenesis, Annu. Rev. Cell. Biol., **2**, 49–80.
Scott M. P., Weiner A. J. (1984). Structural relationships among genes that control development: sequence homology between the *Antennapedia, Ultrabithorax*, and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 4115–4119.
Simeone A. and 7 others. (1986). A human homeobox gene specifically expressed in spinal cord during embryonic development, Nature, **320**, 763–765.
Spierer P., Goldschmidt-Clermont M. (1985). La génétique du développement de la mouche, La Recherche, **16**, 452–461.
Struhl G., White R. A. (1985). Regulation of the *Ultrabithorax* gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes, Cell, **43**, 507–519.
Turing A. M. (1952). The chemical basis of morphogenesis, Philos. Trans. R. Soc. Lond. B **237**, 37–72.
Turner R. F., Mahowald A. P. (1977). Scanning electron microscopy *Drosophila melanogaster* embryogenesis, Dev. Biol., **57**, 403–416.
Waddington C. H. (1940). Organisms and Genes, Cambridge University Press, Cambridge.
Wakimoto B. T., Turner F. R., Kaufman T. C. (1984). Defects in embryogenesis in mutants associated with the *Antennapedia* gene complex of *Drosophila melanogaster*, Dev. Biol., **102**, 147–172.
Wedeen C., Harding K., Levine M. (1986). Spatial regulation of *Antennapedia* and *bithorax* gene expression by the *Polycomb* locus in *Drosophila*, Cell, **44**, 739–748.
Weir M. P., Lo C. (1982). Gap junction communication compartments in the *Drosophila* wing disc, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 3232–3235.
Welsh B. J., Gomatam J., Burgess A. E. (1983). Three-dimensional chemical waves in the Belousov-Zhabotinski reaction, Nature, **304**, 611–614.
White R. A. H., Lehmann R. (1986). A gap gene *hunchback*, regulates the spatial expression of *Ultrabithorax*, Cell, **47**, 311–321.
Winfree A. T. (1974). Rotating chemical reactions, Sci. Am., **230(6)**, 82–95.
Wolpert L., Hornbruch A. (1987). Position signalling and the development of the humerus in the chick limb bud, Development, **100**, 333–338.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА К 3-МУ ИЗДАНИЮ

Anderson K. V. (1989). *Drosophila*: The maternal contribution. In: D. M. Glover, B. D. Hames (eds.), Genes and Embryos, IRL, New York, p. 1–37.
Berleth T. and several others. (1988). The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo, EMBO J., **7**, 1749–1756.
Degelmann A., Hardy P. A., Perrimon N., Mahowald A. P. (1986). Developmental analysis of the *torso*-like phenotype in *Drosophila* produced by a maternal-effect locus, Dev. Biol., **115**, 479–489.
Driever W., Nüsslein-Volhard C. (1988a). A gradient of *bicoid* protein in *Drosophila* embryos, Cell, **54**, 83–93.
Driever W., Nüsslein-Volhard C. (1988b). The *bicoid* protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner, Cell, **54**, 95–104.
Driever W., Nüsslein-Volhard C. (1989). The *bicoid* protein in a positive regulator of *hunchback* transcription in the early *Drosophila* embryo, Nature, **337**, 138–143.
Driever W., Thoma G., Nüsslein-Volhard C. (1989). Determination of spatial domains of zygotic gene expression in the *Drosophila* embryo by the affinity of binding sites for the *bicoid* morphogen, Nature, **340**, 363–367.
Driever W., Siegal V., Nüsslein-Volhard C. (1990). Autonomous determination of anterior structures in the early *Drosophila* embryo by the bicoid morphogen, Developmen, **109**, 811–820.
French V. (1988). Gradients and insect segmentation. In: V. French, P. Ingham, J. Cooke, J. Smith (eds.), Mechanisms of Segmentation, Company of Biologist, Cambridge, pp. 3–16.
Frigerio G., Burri M., Bopp D., Baumgartner S., Noll M. (1986). Structure of the segmentation gene *paired* and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network, Cell, **47**, 735–746.
Hülskamp M., Schröder C., Pfeifle C., Jäckle H., Tautz D. (1989). Posterior segmentation of the *Drosophila* embryo in the absence of a maternal posterior organizer gene, Nature, **338**, 629–632.
Irish V., Lehmann R., Akam M. (1989). The *Drosophila* posterior-group gene *nanos* functions by repressing hunchback activity, Nature, **338**, 646–648.
Kalthoff K. (1969). Der Einfluss verscheiedener Versuchparameter auf die Häufigkeit der Missbildung "Doppelabdomen" in UV-bestrahlten Eiern von *Smittia* sp. (Diptera, Chironomidae), Zool. Anz. Suppl., **33**, 59–65.
Kalthoff K., Sander K. (1968). Der Entwicklungsgang der Missbildung "Doppelabdomen" im partiell UV-bestrahlten Ei von *Smittia parthenogenetica* (Diptera, Chironomidae), Wilh. Roux Arch. Entwick. Org., **161**, 129–146.
Kandler-Singer I., Kalthoff K. (1976). RNase sensitivity of an anterior morphogenetic determinant in an insect egg (*Smittia* sp., Chironomidae, Diptera), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73**, 3739–3743.
Klingler M., Erdélyi M., Szabad J., Nüsslein-Volhard C. (1988). Function of *torso* in determining the terminal anlagen of the *Drosophila* embryo, Nature, **335**, 275–277.
Lehmann R., Nüsslein-Volhard C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation and embryonic polarity require the localized activity of *oscar*, a maternal gene in *Drosophila*, Cell, **47**, 141–152.
Lehmann R., Nüsslein-Volhard C. (1987). Involvement of the *pumilio* gene in the transport of the abdominal signal in the *Drosophila* embryo, Nature, **329**, 167–170.
Nüsslein-Volhard C., Frohnhöfer H. G., Lehmann R. (1987). Determination of anterioposterior polarity in *Drosophila*, Science, **238**, 1675–1681.
Sander K. (1975). Pattern specification in the insect embryo. In: Cell Patterning, CIBA Foundation Symp., **29**, 241–263.
Schüpbach T., Wieschaus E. (1986). Maternal effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo, Roux Arch. Dev. Biol., **195**, 302–317.
Stevens L. M., Frohnhöfer H. G., Klingler M., Nüsslein-Volhard C. (1990). Localized requirement for *torso*-like expression in follicle cells for development of terminal anlagen of the *Drosophila* embryo, Nature, **346**, 660–662.
Struhl G. (1989). Differing strategies for organizing anterior and posterior body pattern in *Drosophila* embryos, Nature, **338**, 741–744.
Struhl G., Struhl K., Macdonald P. M. (1989). The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator, Cell, **57**, 1259–1273.
Tautz D. (1988). Regulation of the *Drosophila* segmentation gene *hunchback* by two maternal morphogenetic centers, Nature, **332**, 281–284.
Wharton R. P., Struhl G. (1989). Structure of the *Drosophila* BicaudalD protein and its role in localizing the posterior determinants nanos, Cell, **59**, 881–892.

Глава 19

Клеточные взаимодействия на расстоянии Гормоны как медиаторы развития

Изменяясь, старый порядок уступает место новому.

АЛФРЕД ЛОРД ТЕННИСОН (1886)

На ранних, «приземленных» стадиях развития они приобрели громадные пищеварительные тракты и влачили существование гусениц. Впоследствии при создании совершенно нового организма – летающей машины, преданной одной цели – размножению, эти их приобретения могли быть ликвидированы и заменены иными.

КЭРРОЛЛ М. УИЛЬЯМС (1958)

Введение

Формирование органов у животных осуществляется путем взаимодействия многих типов разнообразно дифференцированных клеток. В четырех предшествующих главах были рассмотрены ближние клеточные взаимодействия. Эта глава будет посвящена проблемам регуляции развития с помощью растворимых молекул, путешествующих на дальние расстояния от клеток одного типа к клеткам другого. Такие диффундирующие регуляторы развития, способные изменять *дифференцировку* или *морфогенез* других тканей, называются **гормонами**.

Метаморфоз. Гормональная реактивация развития

Поскольку гормоны способны оказывать свое действие в очень малых дозах, выделить их из зародышей чрезвычайно сложно. Поэтому наиболее корректный способ изучения гормонального контроля связан с регуляцией одного из типов развития – развития с **метаморфозом.**

Животные многих видов в своем развитии проходят личиночную стадию, которая весьма значительно отличается от взрослого организма. Очень часто личиночные формы специализированы для выполнения определенных функций, таких, как рост или расселение. Например, плутеус – личинка морского ежа – переносится на различные расстояния морскими течениями, тогда как взрослый морской еж ведет практически неподвижный образ жизни. Гусеницы бабочек специализированы для питания, а взрослые формы приспособлены для полета и размножения и часто лишены ротовых частей, необходимых для потребления пищи. Разделение функций между личинкой и взрослым животным в ряде случаев оказывается исключительно четким (Wald, 1981). Личинки поденок, вылупившиеся из яиц, развиваются несколько месяцев, а полностью сформированные крылатые насекомые живут всего лишь один день, в течение которого они должны спариться, прежде чем погибнут.

Как и следует ожидать, личинки и взрослые животные часто населяют различные местообитания, следовательно и действие на них естественного отбора также различно. Взрослая бабочка вице-король имитирует несъедобную бабочку-данаиду, но ее гусеница совершенно не похожа на красивую гусеницу данаид, – она скорее напоминает птичий помет (Begon et al., 1986).

Реактивация процессов развития при метаморфозе обусловливается специфическими гормонами, при этом изменяется весь организм, переходя к новому способу существования. Эти изменения затрагивают не только форму. Так, у головастиков амфибий во время метаморфоза происходит созревание печеночных ферментов, гемоглобина, зрительных пигментов, а также перестройка нервной, пищеварительной и репродуктивной систем. Таким образом, метаморфоз – это период драматических событий в развитии, захватывающих весь организм.

В этой главе мы сосредоточим внимание на трех примерах реактивации развития под действием гормонов – это метаморфоз у амфибий, метаморфоз у насекомых и развитие молочной железы у мыши.

Метаморфоз у амфибий

Феномен метаморфоза у амфибий

У амфибий метаморфоз обычно связан с изменениями, обусловливающими переход водного организма к жизни на суше. У хвостатых амфибий эти изменения включают резорбцию хвостового плавника, наружных жабер и изменения в строении кожи. Метаморфоз бесхвостых амфибий (лягушек и жаб) более значителен – изменения затрагивают почти каждый орган животного (табл. 19.1). Особенно наглядны изменения формы (рис. 19.1). Регрессии подвергаются не только хвост головастика и его наружные жабры, но и роговые зубы. В то же самое время развиваются конечности и кожные железы. Пока дифференцируются передние и задние конечности, локомоция осуществляется с помощью хвостового плавника. Роговые зубы, которыми головастик соскабливает растительные обрастания подводных предметов, исчезают по мере того как рот и челюсти приобретают новую форму и развиваются мышцы языка. Тем временем удлиненный пищеварительный тракт травоядного головастика укорачивается в соответствии с рационом плотоядной взрослой лягушки. Исчезают жабры и подвергаются регрессии жаберные дуги. Увеличиваются легкие, развиваются мышцы и хрящевые структуры, обеспечивающие нагнетание воздуха в легкие и изгнание его из легких. Изменяются органы чувств – система боковой линии

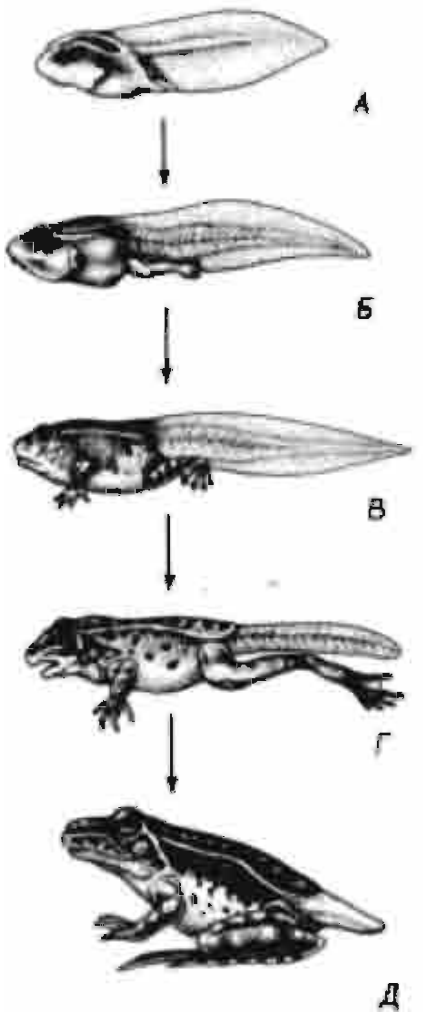


Рис. 19.1. Последовательность событий при метаморфозе лягушки *Rana pipiens*. *А*. Премета морфный головастик. *Б*. Прометаморфный головастик; заметен рост задних конечностей. *В*. С появлением передних конечностей метаморфоз вступает в решающую стадию (климакс). *Г*, *Д*. Климаксные стадии.

головастика исчезает, но прогрессирует дифференцировка глаз и органа слуха. Развивается среднее ухо и барабанная перепонка, столь характерная для

Таблица 19.1. Основные изменения, происходящие в процессе метаморфоза у бесхвостых амфибий

Система органов	Личинка	Взрослое животное
Локомоторная	Водная; хвостовые плавники	Наземное; бесхвостое четвероногое
Дыхательная	Жабры, кожа, легкие; личиночные гемоглобины	Кожа, легкие; гемоглобины взрослого животного
Кровеносная	Дуги аорты; аорта; передняя, задняя и общая кардинальные (кювьеров проток) вены	Каротидная дуга; системная дуга; яремные вены
Пищеварительная	*Вегетарианская*: длинный спиральный кишечник, кишечные симбионты; небольшой рот, роговые челюсти, губные зубы	*Плотоядная*: короткий кишечник, протеазы; большой рот, длинный язык
Нервная, органы чувств	Отсутствие мигательной перепонки, порфиропсин; система органов боковой линии и нейроны Маутнера	Развитие глазных мышц, мигательная перепонка, родопсин, утрата системы органов боковой линии и дегенерация нейронов Маутнера; барабанная перепонка
Выделительная	Мезонефрос; главным образом аммиак, немного мочевины (аммониотелия)	Мезонефрос; главным образом мочевина, высокая активность ферментов цикла орнитин-мочевины (уротелия)

Из Turner, Bagnara, 1976.

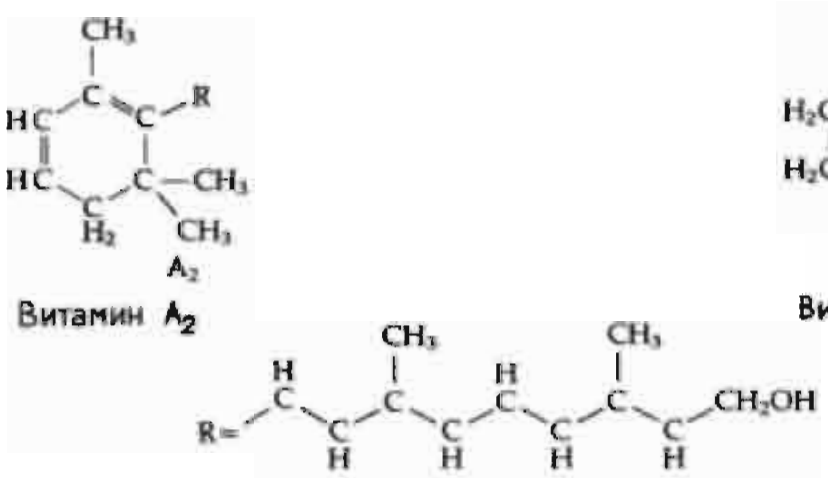


Рис. 19.2. Структурные формулы участков зрительных пигментов головастика и лягушки, представленных витамином А. Порфиропсин головастика (в его состав входит витамин A_2) поглощает свет с большей длиной волны, чем родопсин лягушки (в его состав входит витамин A_1).

лягушек и жаб. В глазу возникает мигательная перепонка и веки. Кроме того, изменяется зрительный пигмент. У головастиков, как и у пресноводных рыб, основным фотопигментом сетчатки является **порфиропсин** – комплекс белка опсина с альдегидом витамина A_2 (рис. 19.2). У взрослых лягушек этот пигмент сменяется **родопсином** – фотопигментом наземных и морских позвоночных. Родопсин представляет собой опсин, связанный с альдегидом витамина A_1 (Wald, 1945, 1981; Smith-Gill, Carver, 1981).

С метаморфозом связаны и другие биохимические процессы. Так, гемоглобин головастика присоединяет кислород быстрее и высвобождает его более медленно, чем гемоглобин взрослых животных (McCutcheon, 1936). Кроме того, Риггс (Riggs, 1951) показал, что связывание кислорода гемоглобином головастика не зависит от pH, тогда как гемоглобин лягушки (как и большинство гемоглобинов других позвоночных) интенсивнее связывается с кислородом по мере повышения pH (эффект Бора). Наиболее впечатляющим событием метаморфоза на биохимическом уровне является, по-видимому, индукция ферментов, необходимых для образования мочи. Головастики, как и большинство пресноводных рыб, относятся к **аммониотелическим**, т. е. выделяющим аммиак, животным. Однако взрослые лягушки, как и большинство наземных позвоночных, относятся к **уротелическим**, т. е. выделяющим мочевину, животным. Во время метаморфоза в печени синтезируются ферменты, необходимые для образования мочевины из двуокиси углерода и аммиака: эти ферменты обеспечивают **цикл мочевины** (рис. 19.3).

Гормональный контроль метаморфоза у амфибий

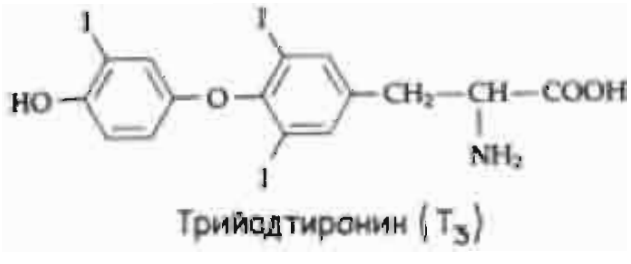
Все разнообразные изменения, связанные с метаморфозом, вызываются секрецией гормонов **тироксина** (T_4) и **трийодтиронина** (T_3) щитовидной железой во время метаморфоза (рис. 19.4). Сейчас принято считать, что активным гормоном служит T_3, поскольку он стимулирует метаморфозные изменения у тиреоидэктомированных животных в гораздо меньших концентрациях, чем T_4 (Kistler et al., 1977; Robinson et al., 1977). Оба гормона в небольших количествах продуцируются щитовидной железой личинок как хвостатых, так и бесхвостых амфибий, но их действие уравновешивается секрецией гормона **пролактина** передней долей гипофиза. Пролактин выполняет функцию личиночного гормона роста и ингибирует метаморфоз (Etkin, Gona, 1967; Bern et al., 1967). В ходе метаморфоза концентрация тиреоидных гормонов T_3 и T_4 возрастает, заставляя головастиков превращаться в лягушек, а личинок хвостатых амфибий становиться сухопутными. В онтогенезе хвостатых амфибий тироксин начинает превалировать над пролактином позже, вынуждая их во взрослом состоянии возвращаться в воду для выметывания половых продуктов (Grant, Grant, 1958). Таким образом, некоторые хвостатые амфибии претерпевают два метаморфоза: один стимулируется тироксином, другой – пролактином. Более того, даже после второго метаморфоза инъекция тироксина может заставить взрослого тритона вернуться на сушу в качестве сухопутной формы (Grant, Cooper, 1964).

О том, что метаморфоз контролируется гормонами щитовидной железы, было известно еще в начале века (Gudernatsch, 1912): при добавлении в корм головастиков порошкообразной щитовидной железы овцы наступление метаморфоза у них ускорялось. Аллен (Allen, 1916), а также Хоскинс и Хоскинс (Hoskins, Hoskins, 1917) обнаружили, что удаление у ранних головастиков зачатка щитовидной железы приводит к росту гигантских головастиков, которые так и не приступают к метаморфозу.

Выделение T_3 осуществляется под контролем гипоталамического отдела головного мозга (Etkin, 1968). В процессе личиночного роста (премета морфоза) эта часть мозга отстает в развитии, следовательно степень контроля мозга над передней долей гипофиза невелика (рис. 19.5). В отсутствие гипоталамической регуляции уровень секреции пролактина оказывается высоким, а уровень секреции гипофизом **тиреотропного гормона** (ТТГ) – низким. Таким образом,

Рис. 19.3. Становление цикла мочевины в ходе метаморфоза у бесхвостых амфибий. *А*. Основные вехи цикла мочевины, служащего для обезвреживания и выведения азотсодержащих шлаков. *Б*. Проявление активности ферментов цикла мочевины на разных стадиях метаморфоза лягушки *Rana catesbeiana*. Светлосерыми столбцами на диаграмме обозначена аргининсукцинатлиаза. (По Cohen, 1970.)

уровень T_3 низок, а уровень пролактина высок. По мере развития гипоталамуса секреция **рилизинг-фактора тиреотропного гормона** (РФ-ТТГ) стимулирует повышение уровня ТТГ. Последний обусловливает повышение синтеза T_3 и тироксина в щитовидной железе. Повышающаяся концентрация T_3, который выделяется из щитовидной железы, вызывает появление первых признаков метаморфоза (**прометаморфоз**). В это время начинается рост почек конечностей. Кроме того, повышение уровня T_3 стимулирует дальнейшее развитие средней доли гипофиза, что дает возможность РФ-ТТГ поступать в его переднюю долю, вследствие чего устанавливается положительная обратная связь: увеличение концентрации T_3 стимулирует его дальнейшее накопление. В гипоталамусе начинается синтез еще одного активного фактора, вероятно, дофамина (White, Nicoll, 1981), ингибирующего гипофизарный синтез пролактина. В результате соотношение T_3 и пролактина возрастает до предела, при котором метаморфоз вступит в свою критическую фазу (**метаморфозный климакс**), во время которой и происходят его основные события. Одно из следствий метаморфоза – частичная дегенерация щитовидной железы. Кроме того, не исключено, что высокий уровень T_3 ингибирует продукцию ТТГ или РФ-ТТГ (Goos, 1978). Таким образом, необходимо установление нового гормонального баланса.



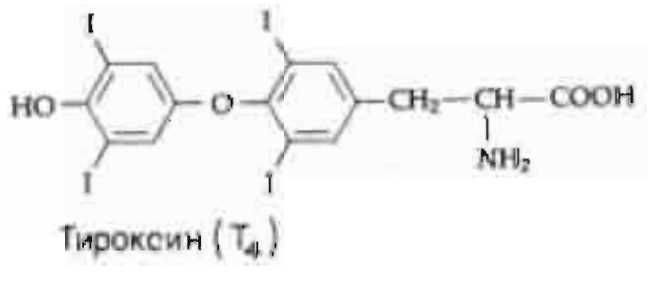


Рис. 19.4. Формулы тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3).

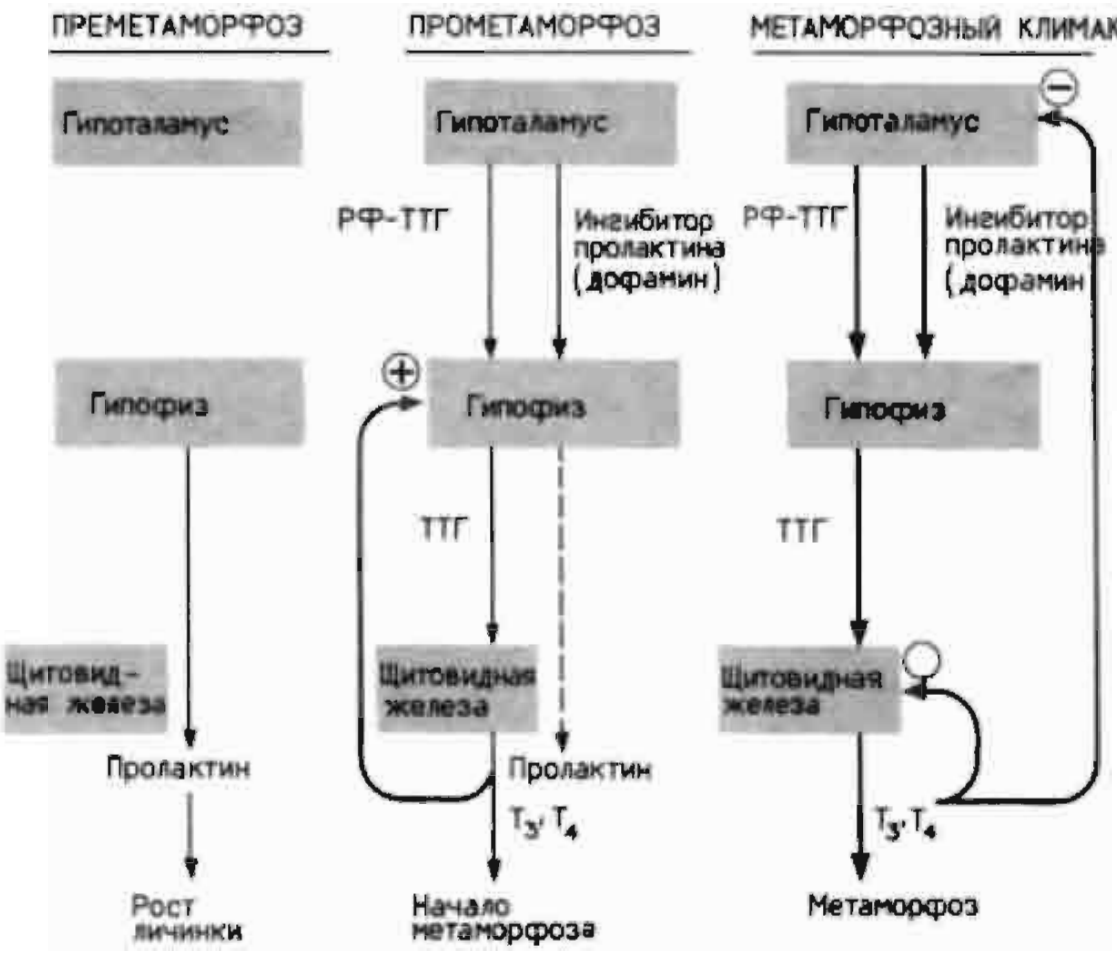


Рис. 19.5. Функциональные связи между гипоталамусом, гипофизом и щитовидной железой на разных стадиях метаморфоза бесхвостых амфибий. По мере своего развития гипоталамус стимулирует гипофиз к активации щитовидной железы, секретирующей тироксин, и ингибированию секреции пролактина. T_3 – трийодтиронин; T_4 – тироксин; ТТГ – тиреотропный гормон; РФ-ТТГ – рилизинг-фактор тиреотропного гормона.

Реакция разных органов тела на гормональные воздействия различна. Один и тот же стимул может привести к регрессии одних тканей и развитию и дифференцировке других. Так, резорбция хвоста находится в явной зависимости от повышения уровня тиреоидных гормонов. Эту корреляцию можно продемонстрировать in vitro (Weber, 1967): изолированные хвосты помещают в чашку с агаром и подвергают различным химическим воздействиям (рис. 19.6). Хвосты растут в нормальной среде, но при добавлении тиреоидных гормонов претерпевают регрессию. Более того, пролактин ингибирует регрессию хвоста, вызванную тиреоидными гормонами (Brown, Frye, 1969). Регрессия хвоста происходит в четыре этапа. Сначала в поперечнополосатых мышечных клетках хвоста снижается уровень синтеза белка (Little et al., 1973). Затем повышается содержание лизосомных ферментов. Увеличивается концентрация катепсина D (протеазы), РНКазы, ДНКазы, коллагеназы, фосфатазы, гликозидазы в эпидермисе, хорде и в клетках нервного ствола (Fox, 1973). Выход этих ферментов в цитоплазму, очевидно, обусловливает гибель клеток. Перевариванию мышечных тканей способствует эпидермис, по-видимому секретирующий эти ферменты. Если удалить эпидермис с кончиков хвоста хирургическим путем, то они не будут подвергаться регрессии в присутствии тироксина в культуральной среде (Eisen, Gross, 1965; Niki et al., 1982). Гибель клеток в области хвоста сопровождается скоплением макрофагов, которые переваривают дебрис с помощью своих протеолитических ферментов (Kaltenbach et al., 1979). В результате хвост превращается в обширное вместилище последних (рис. 19.7).

Определенная реакция ткани на тиреоидные гормоны – свойство данной ткани, не зависящее от ее окружения. Об этом свитедельствуют эксперименты по трансплантации дистальных фрагментов хвоста в область туловища или глазных чаш в ткань хвоста (Schwind, 1933; Geigy, 1941). Дополнительный кончик хвоста, пересаженный в область туловища, не защищен от регрессии, а глаз сохраняет свою целостность, несмотря на имплантацию в дегенерирующий хвост (рис. 19.8). Следовательно, хвост представляет собой пример запрограммированной гибели клеток. Реакция ткани на данный сигнал специфична. Запрограммированная гибель клеток играет важную роль в морфогенезе. Например, у человека такая гибель наблюдается в тканях между большим и указательным пальцами, а дегенерацию хвоста у него на четвертой неделе развития можно уподобить регрессии хвоста у головастика (Fallon, Simandl, 1978).

Одна из важнейших проблем метаморфоза – это координация его событий. Хвост не должен дегенерировать раньше, чем разовьются другие локомоторные органы – конечности; жабры не должны подвергнуться регрессии до того, как разовьются мышцы легких. В основе этой координации, по всей вероятности, лежат количественные различия между гормонами, стимулирующими то или иное специфическое событие (Kollros, 1961). Эта модель известна под названием **концепции порога.** По мере повышения концентрации тиреоидных гормонов происходит

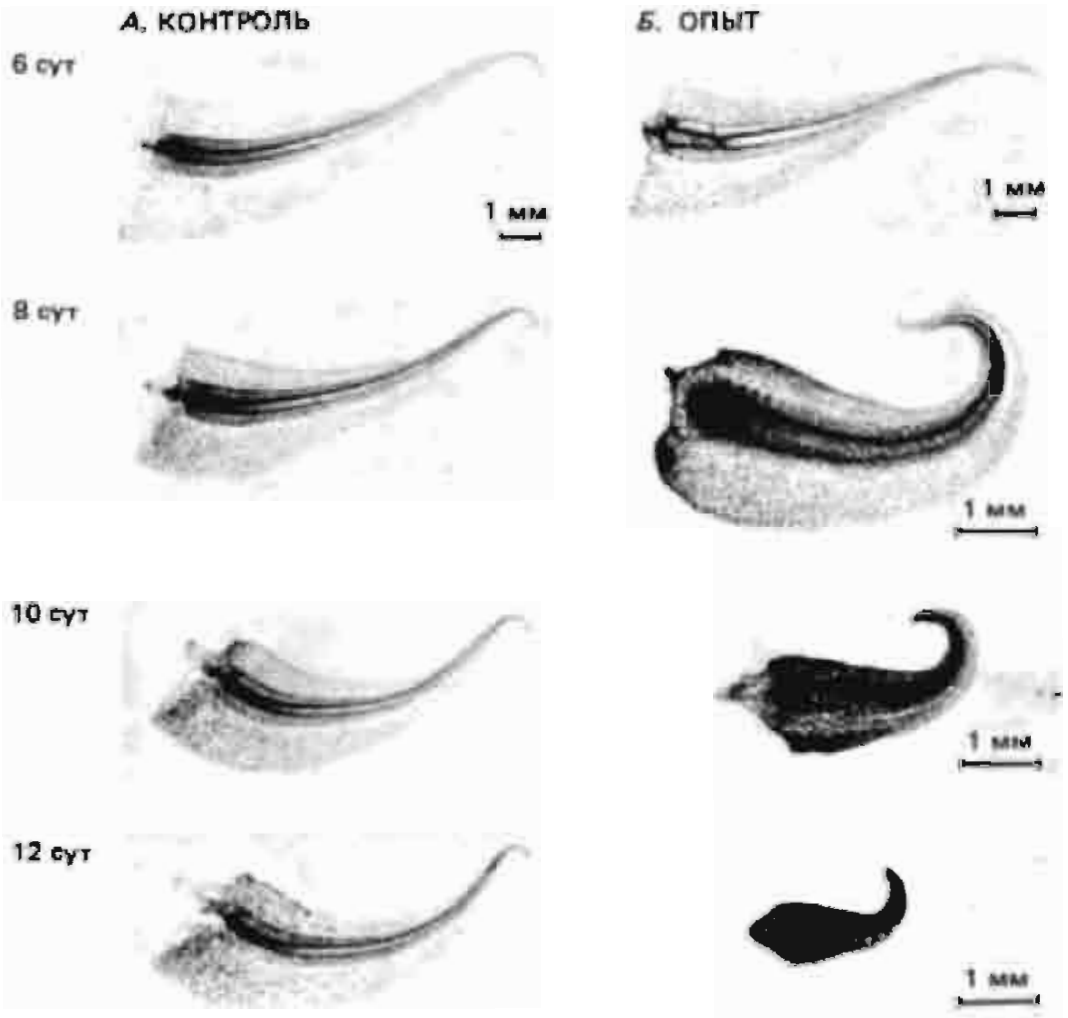


Рис. 19.6. Регрессия изолированных кончиков хвоста под действием тироксина. *А*. Контрольные кончики хвостов головастиков *Xenopus*, культивированные в растворе Гольтфретера в течение 6, 8, 10 и 12 сут. *Б*. Кончики хвостов от головастиков того же возраста, что и контрольные, но после культивирования в среде с тироксином. (Из Weber, 1965.)

дифференциальное осуществление тех или иных процессов. У головастиков с удаленной щитовидной железой, но культивируемых в разбавленном растворе тиреоидных гормонов, единственный морфогенетический эффект сводится к укорачиванию пищеварительного тракта и ускорению роста зачатков конечностей. Однако при повышении концентрации тиреоидных гормонов можно наблюдать регрессию хвоста до формирования почек конечностей. Результаты экспериментов позволяют предположить, что рост концентрации тиреоидного гормона сначала вызывает развитие почек задних конечностей, а затем регрессию хвоста. Следовательно, временные параметры морфогенеза определяются компетенцией различных

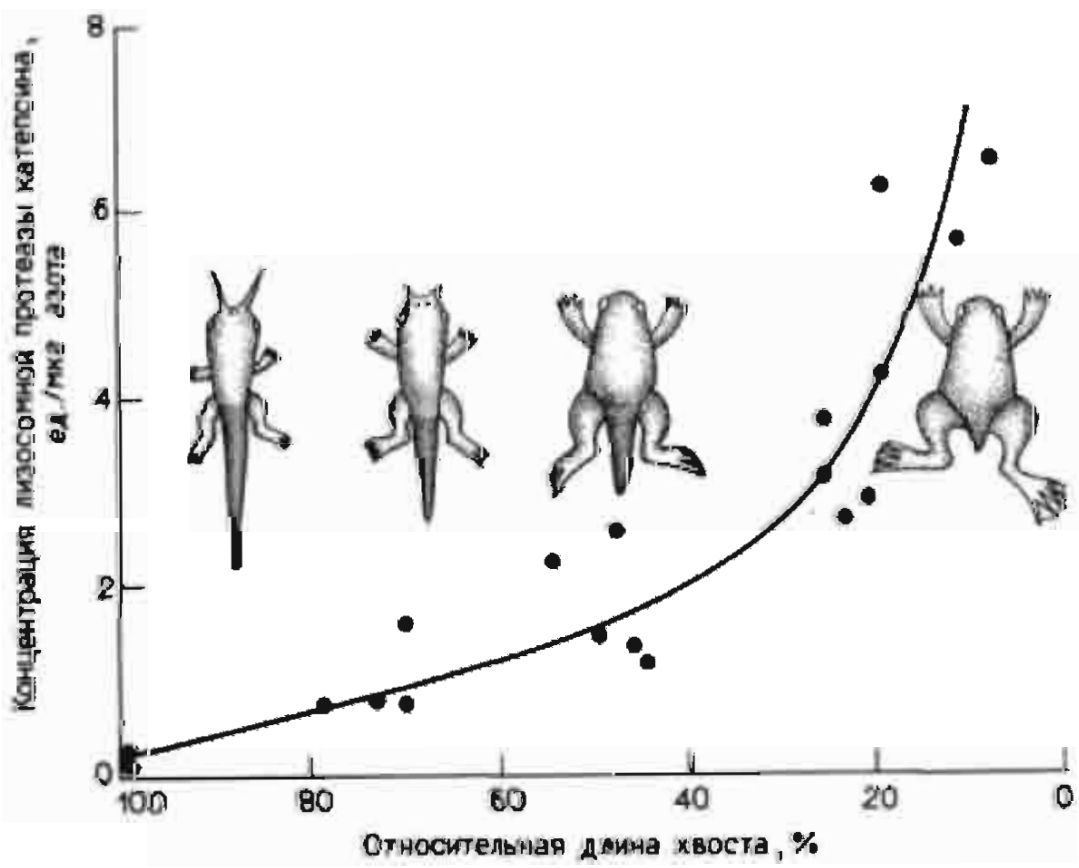


Рис. 19.7. Повышение концентрации лизосомной протеазы катепсина при регрессии хвоста у *Xenopus laevis*. Полагают, что ферменты лизосом ответственны за деградацию клеток хвоста. (По Karp, Bertrill, 1981.)

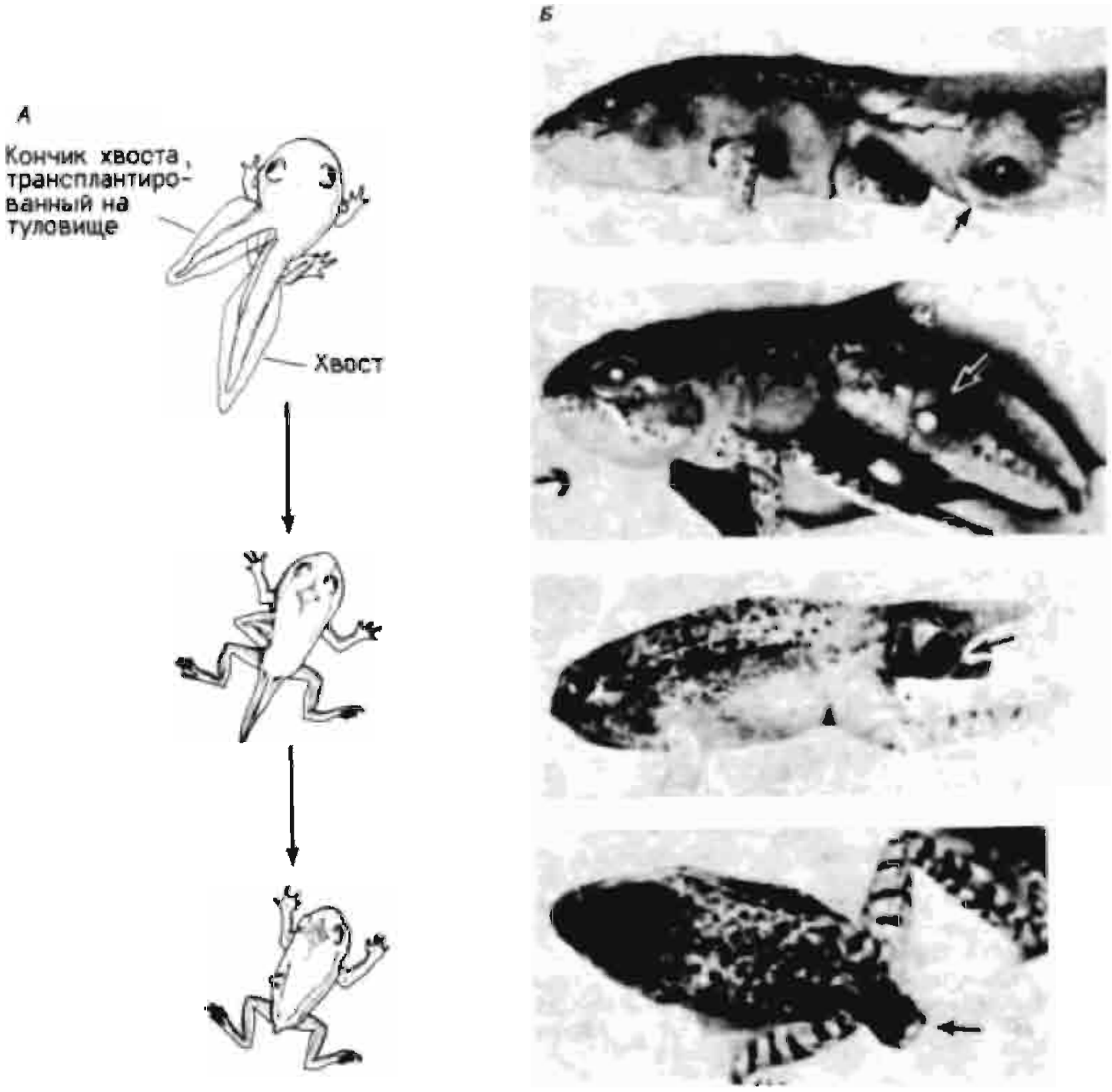


Рис. 19.8. Органная специфичность при метаморфозе лягушки. *А*. Кончики хвоста подвергаются регрессии, даже если их трансплантируют в область туловища, тогда как (*Б*) глазные чаши (отмечены стрелкой), трансплантированные в область регрессирующего хвоста, остаются интактными. (По Schwind, 1933; фотографии с любезного разрешения Geigy, 1941.)

тканей реагировать на тиреоидные гормоны.

Но что происходит с нервной системой животного, когда на основе старого организма возникает новый? Безусловно, адаптационные анатомические признаки лягушки отличаются от таковых головастика. Одно из характерных явлений при метаморфозе амфибий – это перемещение глаз из положения по бокам головы вперед и вверх [1] (рис. 19.9). Боковое положение глаз головастика типично для травоядных животных, служащих добычей хищникам; расположенные же фронтально глаза лягушки отвечают требованиям хищного образа жизни. Чтобы поймать свою жертву, лягушка должна видеть в трех измерениях. Иначе говоря, ей необходимо бинокулярное зрение, при котором проводящие пути от обоих глаз сходятся в мозге. У головастика правый глаз иннервируется левой стороной мозга, и наоборот; ипсилатеральные (на одной и той же стороне) отростки нейронов сетчатки отсутствуют. Однако в процессе метаморфоза эти дополнительные ипсилатеральные отростки возникают, вследствие чего проводящие пути от обоих глаз могут достигать одного и того же отдела мозга (Currie, Cowan, 1974; Hoskins, Grobstein, 1985a). У *Xenopus* эти новые нервные пути идут не от существующих преобразованных нейронов, а от новообразованных, дифференцированных в ответ на тиреоидные гормоны (Hoskins, Grobstein, 1985a, b).

[1] Еще более эффектно смещение глаз в ходе метаморфоза у плоских рыб, например у камбалы. Сначала глаза у нее расположены по бокам головы, затем по мере развития один глаз начинает мигрировать дорсально и встречается с другим в верхней части головы, что позволяет рыбе, ведя донный образ жизни, смотреть вверх (Martin, Drewry, 1978).

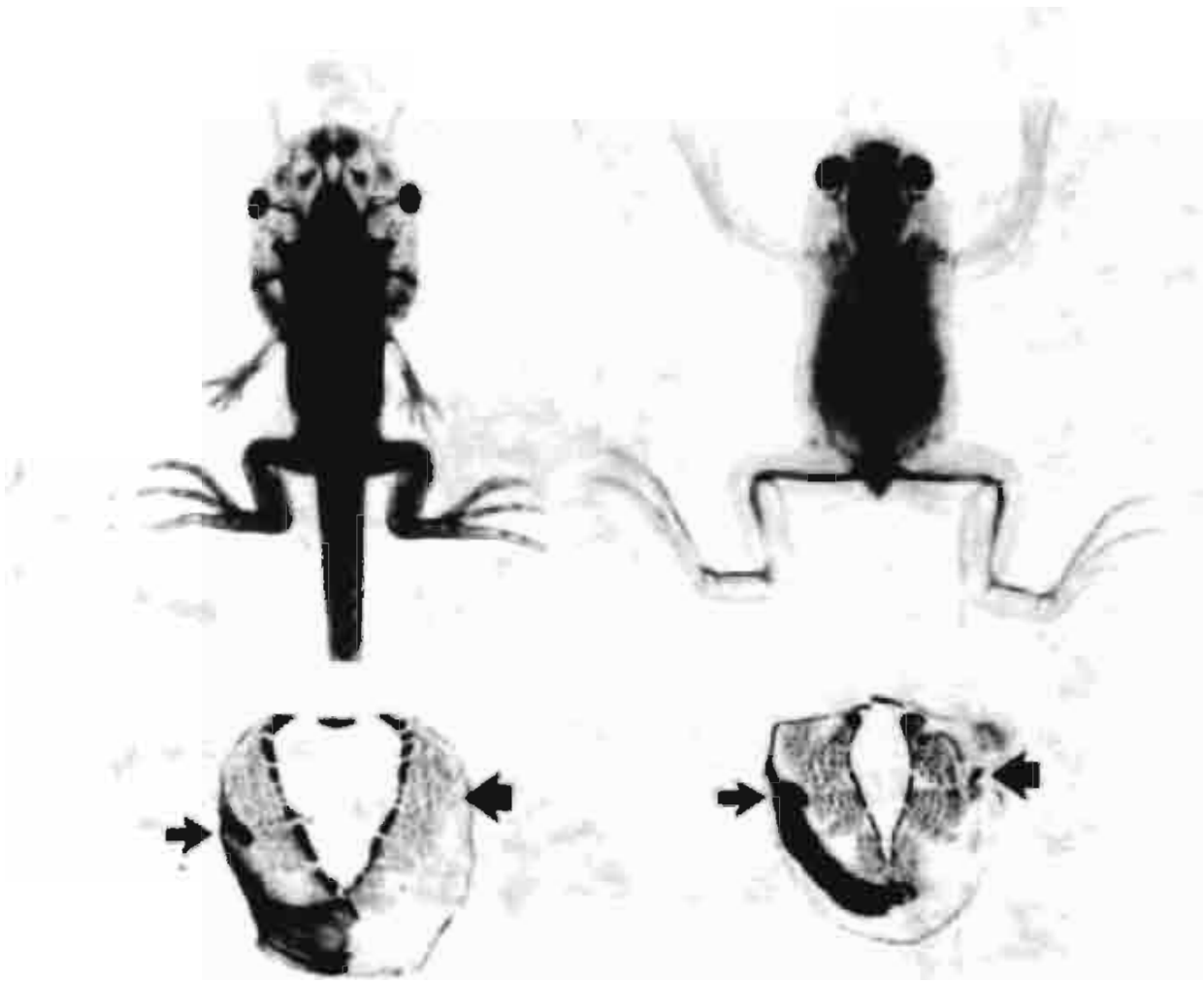


Рис. 19.9. Миграция глаз и связанные с ней изменения в нервной системе при метаморфозе головастика *Xenopus laevis*. Глаза у головастика расположены по бокам головы, поэтому у него создается относительно небольшое поле бинокулярного зрения. В ходе метаморфоза глаза перемещаются в дорсальном и ростральном направлениях, обеспечивая увеличенное поле бинокулярного зрения лягушки. Ниже изображений метаморфизирующих головастиков показаны срезы через зрительную область мозга. По зрительным нейронам пероксидаза хрена перемещается на контрлатеральную (противолежащую) сторону мозга (маленькая стрелка), но не попадает на ипсилатеральную. По мере того как метаморфоз прогрессирует, становятся видны и ипсилатеральные отростки, связанные с бинокулярным зрением (большая стрелка). (Из Hoskins, Grobstein, 1984; фотографии с любезного разрешения P. Grobstein.)

Оба процесса – как смещение глаз, так и дифференцировка новых нейронов, посылающих отростки ипсилатерально,– гормонально регулируемые процессы.

Другие нейроны также подвергаются фундаментальным изменениям. Некоторые нервные клетки, например клетки, иннервирующие мышцы хвоста головастика, погибают (Forehand, Farel, 1982). Полагают, что причиной гибели этих нейронов служит не разрушение окружающей ткани, а их непосредственная реакция на действие тиреоидных гормонов. Другие нейроны, например некоторые двигательные нейроны челюсти головастика, переключаются с иннервирования личиночной мускулатуры на иннервирование соответствующей взрослой (Alley, Barnes, 1983). Ряд нейронов, например нейроны, иннервирующие язык (новообразования мышц у личинки не наблюдаются), остаются покоящимися на стадии головастика и начинают формировать связи только при метаморфозе (Grobstein, 1987). Мозг также подвергается изменениям во время метаморфоза. Таким образом, нервная система у бесхвостых амфибий в процессе метаморфоза подвергается естественной реконструкции. Одни нейроны гибнут, другие образуются, третьи меняют свою специфичность. Так организм адаптируется к новым условиям обитания.

Молекулярный механизм ответа на тиреоидные гормоны при метаморфозе

Тиреоидные гормоны могут вызывать разрушение существующей ткани или изменение ее функций в соответствии с переходом к взрослому состоянию. Так, клетки печени головастика при метаморфозе не разрушаются и не замещаются новыми, однако строение существующих печеночных клеток изменяется. Эти изменения сопровождаются значительным возрастанием синтеза рРНК, мРНК, а скорость синтеза белка после стимуляции тиреоидным гормоном в течение 4 ч возрастает почти в 100 раз (Cohen et al., 1978). Многие из новосинтезированных мРНК понадобятся для кодирования функций печени у взрослой лягушки.

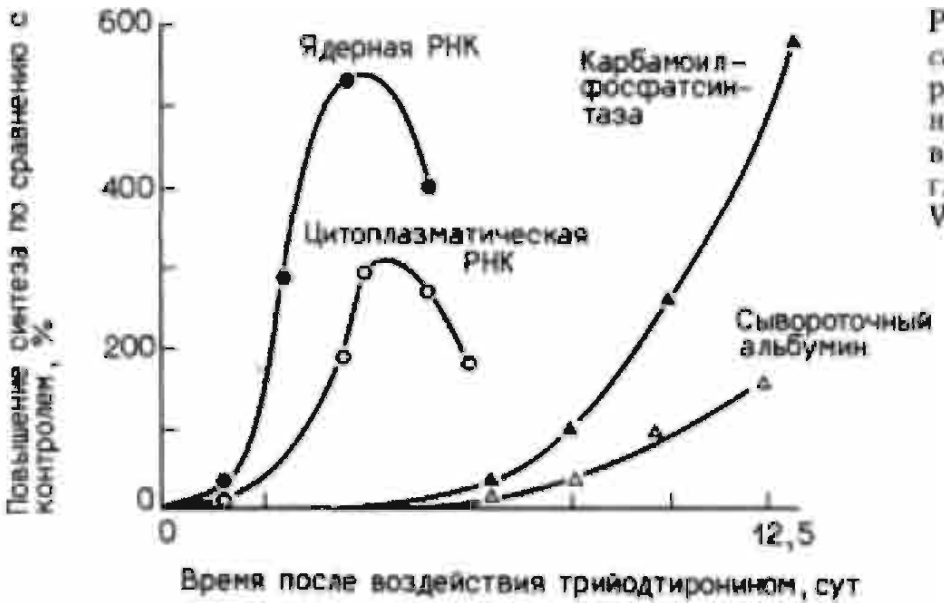


Рис. 19.10. Молекулярный синтез в клетках печени *Rana catesbeiana* после воздействия на головастиков трийодтрионином. Сначала наблюдается увеличение синтеза ядерной, затем цитоплазматической РНК, а после этого возрастает синтез специфических белков печени, связанных главным образом с циклом мочевины. (Из Graham, Wareing, 1976.)

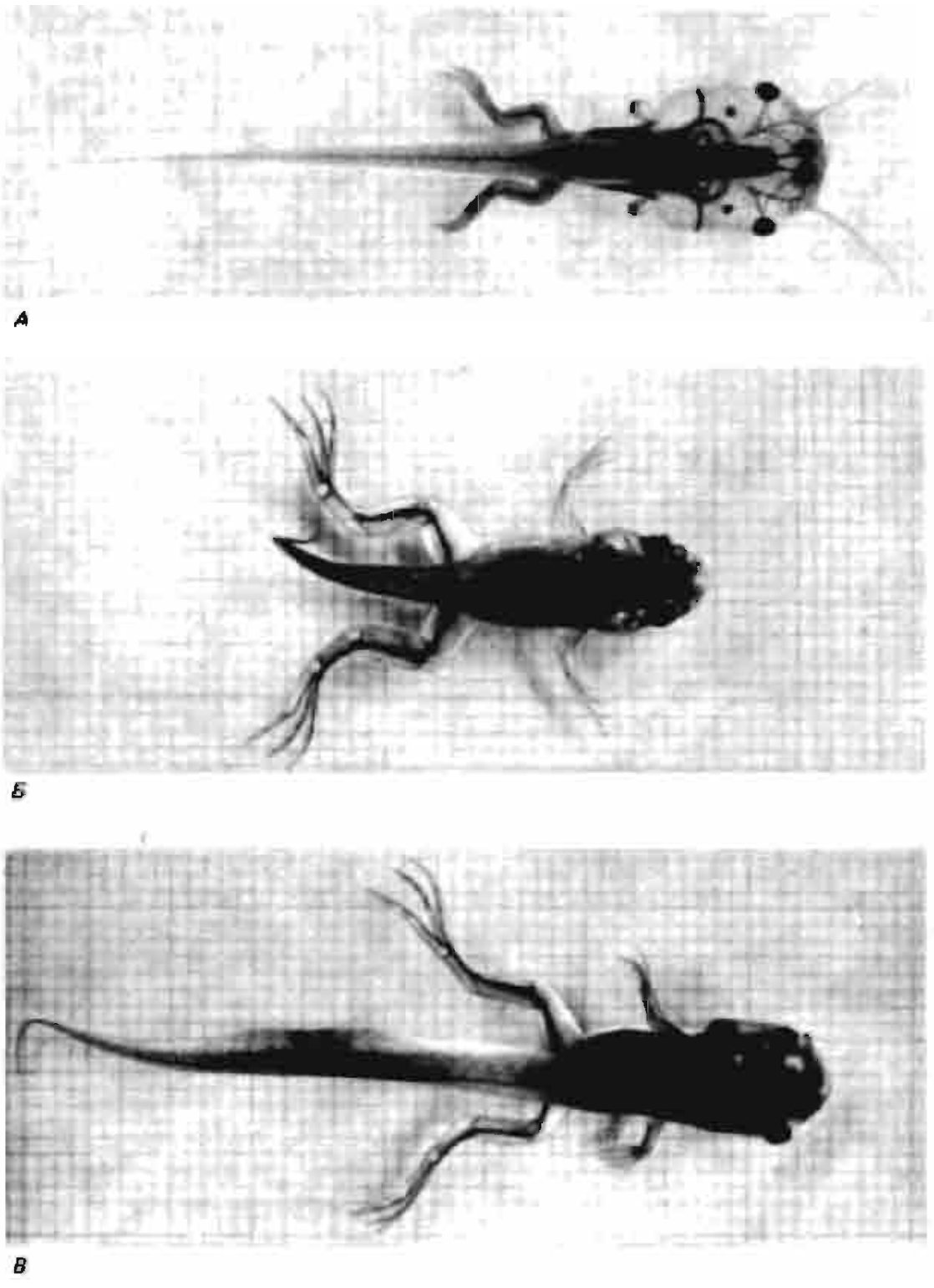


Рис. 19.11. Роль новой транскрипции во время метаморфоза. *А*. Головастик *Xenopus laevis* в начале метаморфозного климакса. *Б*. Нормальный головастик 7 сут спустя. *В*. Головастик на той же стадии развития, что и на рис. *Б*, но после инъекции одной дозы актиномицина D, которая была сделана головастику, находящемуся на той же стадии развития, что и головастик *А*. (Из Weber, 1967.)

Повышение уровня синтеза белка связано с транскрипцией новых мРНК. Рис. 19.10 иллюстрирует синтез карбамоилфосфатсинтазы (фермента цикла мочевины), активизирующейся после резкого повышения синтеза РНК; Уэбер (Weber, 1967) показал, что инъекция актиномицина D нормальным головастикам перед началом метаморфоза ингибирует регрессию хвоста и реконструкцию головы (рис. 19.11). Эксперименты по гибридизации радиоактивной мРНК прометаморфозных головастиков лягушки-быка и головастиков, приступивших к метаморфозу, с клонированными генами (методом блоттинга), выявили три типа ответов на действие тиреоидных гормонов. Один набор генов реагирует на естественный или индуцированный тироксином метаморфоз повышением своего до тех пор низкого уровня транскрипции. Уровень транскрипции другого набора генов снижается, а на третий набор тиреоидные гормоны не действуют (Lyman, White, 1987; Mathison, Miller, 1987). Мори и др. (Mori et al., 1979) показали, что увеличение уровня карбамоилфосфатсинтазы можно объяснить повышением уровня транскрипции соответствующего гена. Следовательно, метаморфоз в определенной степени контролируется на уровне транскрипции. О способности тиреоидных гормонов регулировать активность генов на уровне транскрипции свидетельствуют и другие эксперименты. У млекопитающих выделены T_3-связывающие белки, которые оказались гомологичными стероидсвязывающим белкам, выполняющим функцию переноса стероидов к ДНК. В самом деле, эти T_3-связывающие белки содержат область, связывающуюся со специфической ДНК, обнаруженной в промоторных участках некоторых генов, ответственных за синтез T_3 (Weinberger et al., 1986; Crew, Spindler, 1986). Это не означает, что регуляция генов, работающих во время метаморфоза, осуществляется только на уровне транскрипции, но, несомненно, этот аспект очень важен [1].

[1] Как известно, небольшие молекулы гормонов (например, тироксина или половых стероидов) способны проникать через плазматическую мембрану и связываться со специфическими внутриклеточными рецепторами. Пептидные же гормоны обычно остаются снаружи и осуществляют свою функцию посредством связывания со специфическим рецептором на плазматической мембране. Комплекс пептидного гормона с рецептором часто активирует связанный с мембраной фермент **аденилатциклазу**, превращающую АТФ в циклический АМФ (цАМФ), а цАМФ может изменить тип синтезируемого клеткой белка. Например, РФ-ТТГ гипоталамуса осуществляет свою функцию посредством связывания с РФ-ТТГ-рецептором на поверхности клеток гипофиза, синтезирующих ТТГ. Связывание стимулирует клеточную аденилатциклазу к образованию бо́льших количеств цАМФ, который, действуя как «второй посредник», вызывает (пока неизвестным способом) синтез и выделение клеткой ТТГ. Полагают, что действие ТТГ на клетки щитовидной железы также опосредовано цАМФ.

Дополнительные сведения и гипотезы

Гетерохрония

Животные большинства видов проходят в своем развитии стадию личинки. Часто эта стадия оказывается высокоспециализированной, позволяющей находить и переваривать специальные типы пищи и переживать особые условия среды обитания.

В некоторых случаях в результате значительного удлинения или укорачивания личиночного периода происходит изменение жизненного цикла. Явление изменения относительного времени появления и скорости развития признаков, которыми обладали предки данных животных, называют **гетерохронией.** Здесь мы коснемся трех крайних типов гетерохроний: **неотении,** при которой личиночная форма сохраняется на протяжении всего жизненного цикла индивидуума, хотя при этом гонады созревают; **прогенеза,** при котором гонады созревают, но организм продолжает оставаться ювенильным, и **прямого развития,** при котором стадия личинки полностью утрачивается и зародыш преобразуется в маленький организм, по своему виду напоминающий взрослый.

Неотения

У многих хвостатых амфибий личиночная форма может сохраняться в течение всей жизни и достигать половой зрелости, не приступив к метаморфозу. В этом случае гетерохрония заключается в ускорении развития репродуктивной системы (и половых клеток) по сравнению с остальными системами и органами. Сохранение ювенильных признаков у половозрелых особей называется *неотенией*. Скорость выраженности метаморфоза варьирует у разных видов. Мексиканский аксолотль (*Ambystoma mexicanum*) вообще не приступает к метаморфозу в природных условиях, так как у него не синтезируется ТТГ, стимулирующий функционирование щитовидной железы (Prahlad, DeLanney, 1965; Norris et al., 1973; Taurog et al., 1974). Однако после воздействия тиреоидным гормоном или ТТГ этот неотенический аксолотль превращается во взрослую форму, которая не

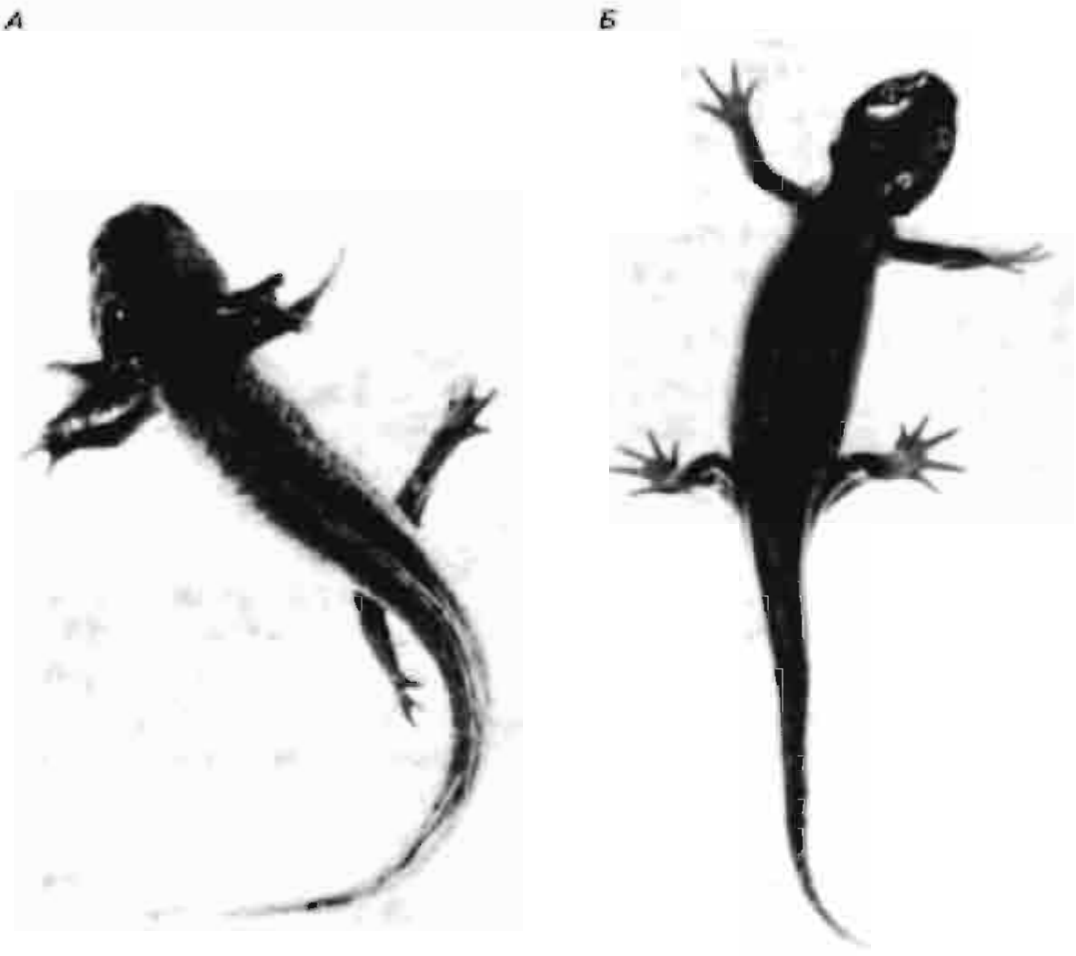


Рис. 19.12. Индукция метаморфоза у аксолотля. *А*. Нормальный аксолотль. *Б*. Особь после воздействия тироксином, индуцирующим метаморфоз. (Из Maiacinski, 1978.)

встречается в природе (Huxley, 1920). Другие виды, например *Ambystoma tigrinum*, приступают к метаморфозу только после сигнала из окружающей среды, в противном случае они остаются неотеническими, с успехом размножаясь в этом состоянии. Так, *A. tigrinum* – неотеническая саламандра, обитающая в холодных озерах Скалистых гор, – в более теплой зоне своего ареала после личиночной стадии превращается в сухопутную тигровую саламандру. У неотенической популяции Скалистых гор метаморфоз можно индуцировать, просто поместив животных в воду с более высокой температурой. По-видимому, у этого вида при низких температурах гипоталамус не образует РФ-ТТГ.

Некоторые хвостатые амфибии, однако, и в лабораторных условиях продолжают оставаться неотеническими. Наряду с *A. mexicanum*, у которой воздействием тироксина можно получить взрослую форму (рис. 19.12), существуют неотенические виды *Necturus* и *Siren*, не реагирующие на тиреоидные гормоны. Вероятно, их ткани-мишени утратили способность отвечать на это воздействие и неотения стала постоянной (Frieden, 1981). Генетические дефекты, ответственные на неотению у некоторых видов, представлены на рис. 19.13.

Де Бир (De Beer, 1940) и Гулд (Gould, 1977) высказывали гипотезы, согласно которым неотения служит важным фактором эволюции более сложных таксонов. Запаздывание развития соматических тканей обеспечивает большую пластичность материала для естественного отбора. По мнению Гулда, неотения «дает возможность избежать специализации. Отказываясь от своих высокоспециализированных взрослых форм, животные возвращаются к лабильному состоянию, свойственному ранним стадиям онтогенеза, и таким образом готовят себя к эволюции в новых направлениях».

Прогенез

Сохранение ювенильной формы взрослым потомством может быть достигнуто двумя путями. При неотении развитие большинства соматических тканей задерживается, хотя гонады развиваются с нормальной скоростью. В случае *прогенеза* ускоряется созревание гонад, а остальные органы до определенной стадии развиваются нормально. Прогенез дает возможность некоторым видам хвостатых амфибий занять новые экологические ниши. Листовая саламандра (*Bolitoglossa occidentalis*), обитающая в тропиках, в отличие от других представителей рода живет на деревьях. Она имеет небольшие размеры и перепончатые конечности, которые использует как присоски при перемещении по деревьям; незначительный вес тела делает такой способ передвижения более эффективным. Было обнаружено (Alberch, Alberch, 1981), что листовая саламандра очень напоминает ювенильные формы родственных видов – светлоспинной саламандры (*B. subpalmata*) и высокогорной саламандры (*B. rostrata*) (молодь которых характери-

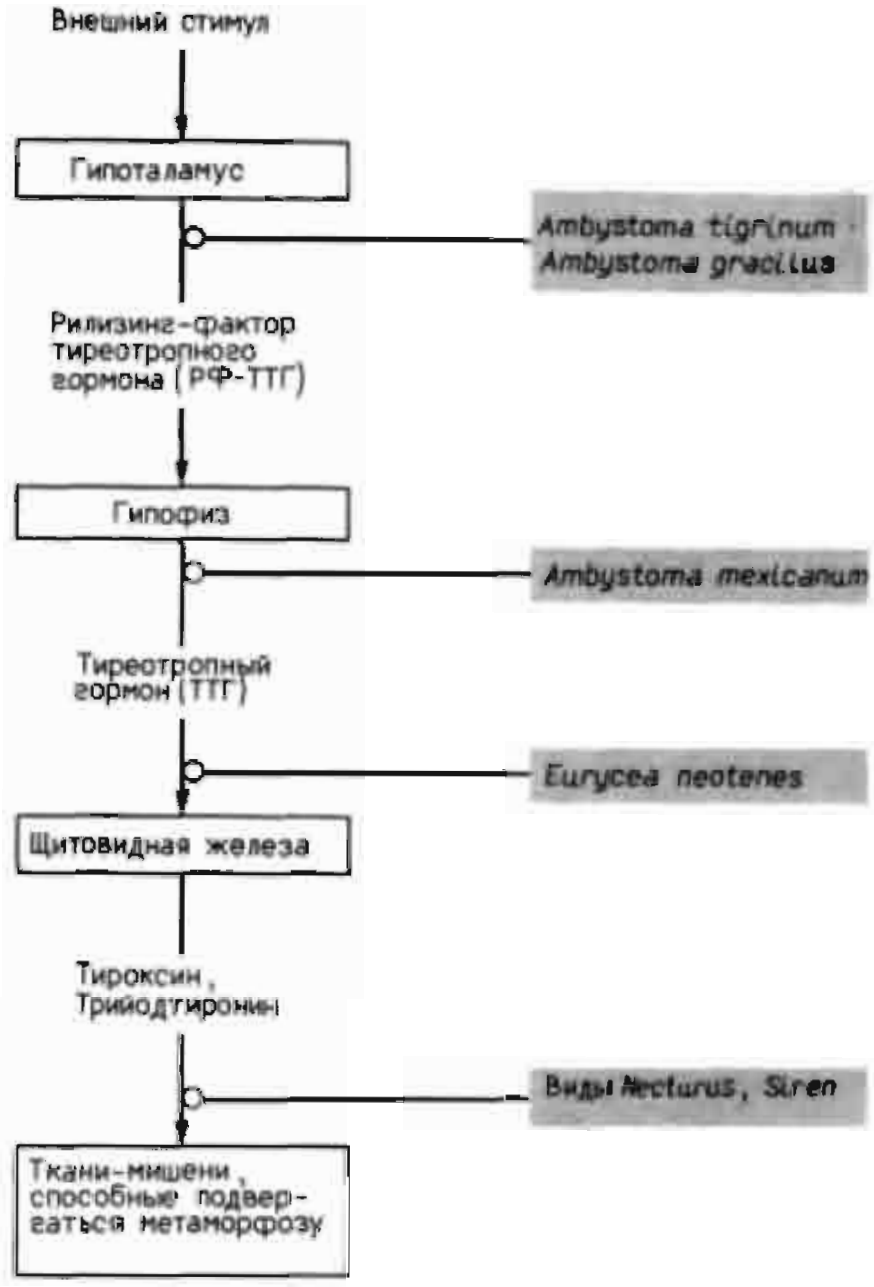


Рис. 19.13. Соотношение уровней функционирования системы гипоталамус – гипофиз – щитовидная железа с блокированием метаморфоза у разных хвостатых амфибий. *Eurycea*, *Necturus* и *Siren*, по-видимому, лишены нормальных рецепторов в ткани-мишени. Применением высоких концентраций тироксина можно индуцировать метаморфоз у *Eurycea*, но *Necturus* и *Siren* не реагируют ни на одну дозу. (По Frieden, 1981.)

зуется небольшими размерами и еще сохраняет перепонки между пальцами). Полагают, что у листовой саламандры половое созревание наступает по достижении меньших размеров, чем у предковых форм. Такой фенотип дает возможность вести древесный образ жизни.

Прямое развитие

Наряду с животными, удлинившими личиночный период своего развития, существуют формы (которые можно назвать «акселератами»), не имеющие «нормальных» личиночных стадий. Этот последний тип развития называют *прямым развитием*; его можно проиллюстрировать примерами лягушек, не проходящих стадии головастика, и морских ежей, не имеющих личинки плутеуса. Элинсон и др. (Elinson, 1987; del Pino, Elinson, 1983) изучили *Eleutherodactylus coqui* – небольшую листовую лягушку коки, обычную для Пуэрто-Рико. В отличие от *Rana* и *Xenopus* оплодотворение у *E. coqui* происходит в теле самки. Каждое яйцо имеет размеры около 3,5 мм в диаметре (примерно в 20 раз превышающие размеры яйца *Xenopus*). После откладки яиц самец осторожно усаживается на развивающиеся зародыши, защищая их таким образом от хищников и высыхания (Taigen et al., 1984). Раннее развитие коки не отличается от развития большинства других лягушек. Дробление голобластическое, гаструляция начинается в субэкваториальной зоне (рис. 19.14, *А*), а нервные валики приподнимаются на спинной стороне (рис. 19.14, *Б*). Однако вскоре после замыкания нервной трубки появляются почки конечностей (рис. 19.14, *В*). Их ранняя закладка служит первым признаком прямого развития, минуя лишенную конечностей стадию головастика. Более того, появление конечностей не зависит от тиреоидных гормонов (Lynn, Peadon, 1955). Из студенистой оболочки яйца через три недели вместо головастика выходит маленькая лягушка (рис. 19.14, *Г*). На первых порах она имеет хвост, который служит скорее для дыхания, чем для передвижения.

Рэфф (Raff, 1987) изучал прямое развитие морских ежей. У «типичного» морского ежа происходит выселение клеток первичной мезенхимы, которые секретируют известковый скелет личинки плутеуса. Такие личинки питаются и растут до образования целомических пузырей (также происходящих от первичной мезенхимы) по бокам кишки (Pehrson, Cohen, 1986). Разрастаясь, левый целом образует гидроцель; при этом он оказывает индуцирующее влияние на лежащую выше эктодерму, которая инвагинирует, образуя амнион. Гидроцель с амнионом формируют зачаток, продолжающий расти внутри личинки до тех пор, пока при метаморфозе не произойдет его высвобождение в виде ювенильного морского ежа (рис. 19.15).

Для нескольких видов морских ежей характерно подавление стадии плутеуса, сопровождаемое ускорением развития зачатка взрослого организма. Как и в упомянутом выше случае прямого развития лягушки, прямое развитие морского ежа также зависит от накопления большого количества желтка в яйце. Фактически Рэфф обнаружил корреляцию между объемом желтка и степенью выраженности прямого развития (табл. 19.2). Диаметр яиц североамериканских и европейских морских ежей находится в пределах от 60 до 200 мкм. Эти виды претерпевают непрямое развитие, проходя через стадию плутеуса. Из яиц диаметром от 300 до 350 мкм развиваются неполные плутеусы, обладающие личиночным скеле-

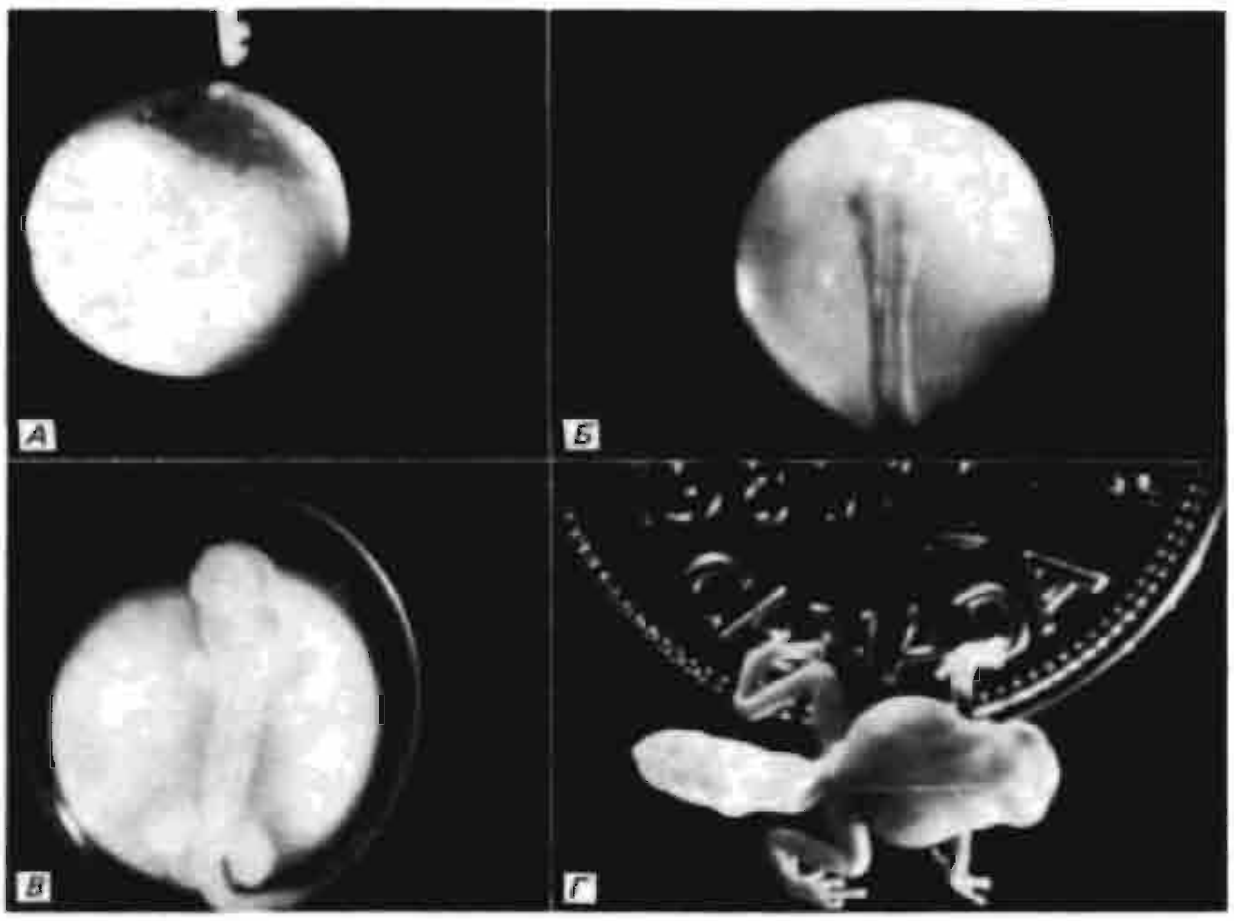


Рис. 19.14. Прямое развитие лягушки *Eleutherodactylus coqui*. *А*. Ранняя гаструла; видна губа бластопора. *Б*. Нейрула с дорсальной стороны; видны приподнимающиеся нервные валики. *В*. Через сутки после смыкания нервных валиков; заметны почки конечностей. *Г*. Три недели спустя после оплодотворения. Вылупилась крошечная лягушка (для сравнения она помещена рядом с канадским пенни; отсвет, напоминающий хвост, представляет собой артефакт, вызванный химическим фиксатором, который был использован для приготовления препарата). (Из Elinson, 1987; фотография с любезного разрешения R. P. Elinson.)

том, но лишенные кишки (и, следовательно, не способные питаться). Благодаря ускоренному росту зачатка взрослого организма у этих видов быстро формируется питающийся ювенильный еж. Некоторые богатые желтком яйца достигают в диаметре 2 мм (т. е. по объему они почти равны яйцу *Xenopus*). В этом случае зародыши развиваются прямо, минуя какую-либо стадию, напоминающую плутеус. В стадии активно питающейся личинки нет необходимости, поскольку зародыши снабжены желтком.

Таблица 19.2. Соотношение между способом развития и размерами яиц морского ежа

Число видов	Размеры яиц, мкм	Способ развития
83	60–345	Питающаяся личинка плутеус
1	280	Факультативный питающийся плутеус
2	300–350	Редуцированный плутеус, не питающийся
19	400–2000	Плутеус утрачен; прямое развитие

По Raff, 1987.

Природа предоставляет возможность иллюстрировать эту зависимость превосходным примером. У берегов Австралии обитают два вида морских ежей, относящихся к роду *Heliocidaris*,– *H. erithrogramma* и *H. tuberculata*. Это обычные виды, которые, судя по морфологии и данным секвенирования ДНК, находятся в близком родстве. Они занимают одну и ту же экологическую нишу и размножаются летом в одно и то же время. Однако диаметр яйца *H. erithrogramma* равен 425 мкм и для этого вида характерно прямое развитие, диаметр же яиц *H. tuberculata* составляет 95 мкм и у этого вида имеется личинка. При сравнении этих видов (табл. 19.3) выясняется, что у ежа с прямым развитием сразу начинают формироваться целомы. Назначение плутеуса – питание и передвижение (Strathmann, 1971, 1975) с помощью «рук», несущих ресничные шнуры, которые своим биением направляют в рот пищевые частицы. При прямом развитии не формируется ни функциональный личиночный кишечник, ни личиночный скелет. Организм обходится без пищеварительной системы, занимаясь созданием дефинитивных структур. У морских ежей с прямым развитием не наблюдается выселения потомков клеток-микромеров, дающих начало скелету личинки. Эти клетки немедленно вовлекаются в образование известковых игл молодого ежа.

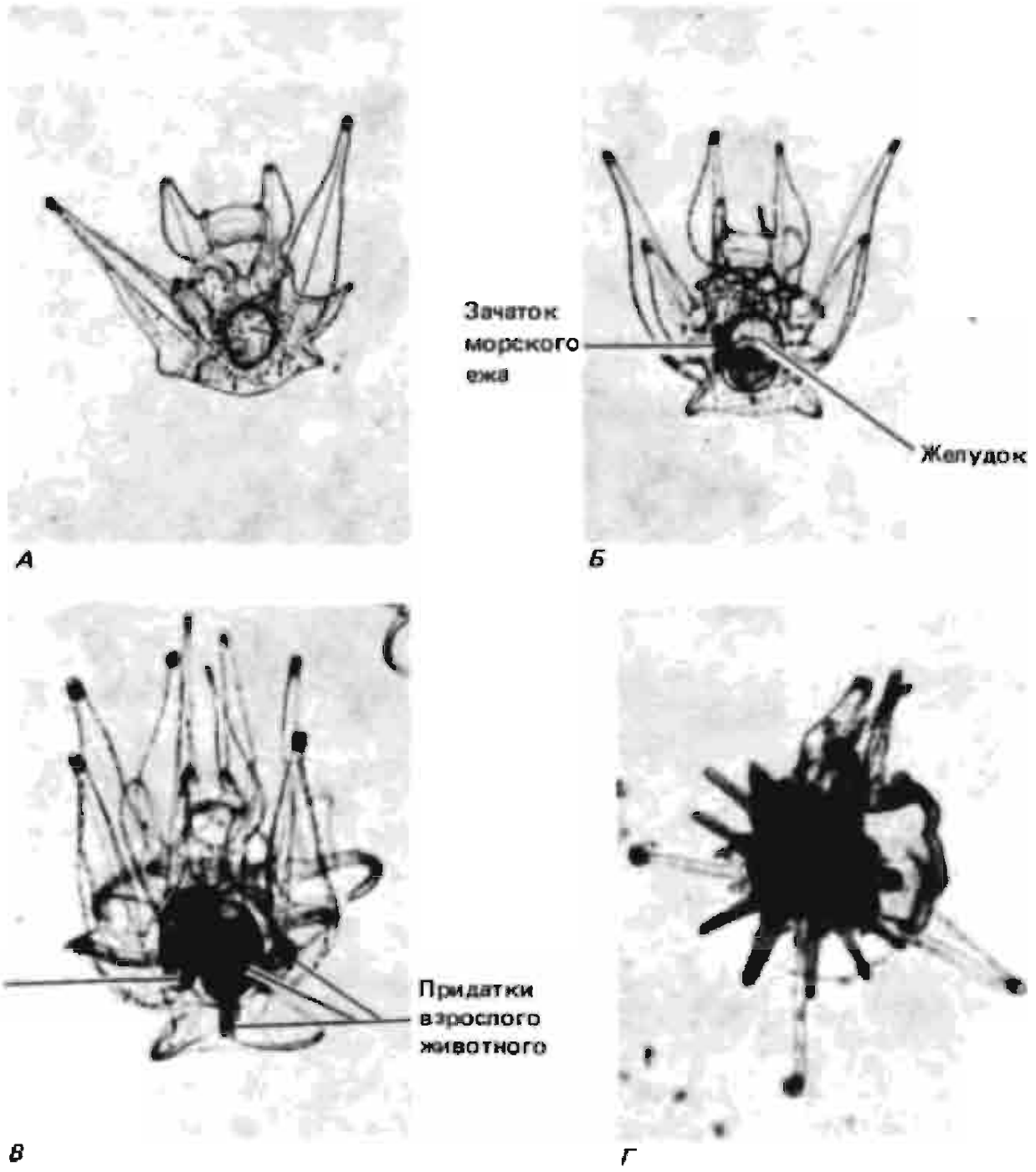


Рис. 19.15. Нормальный метаморфоз плутеуса во взрослого морского ежа *Lytechinus pictus*. *А*. Плутеус через 8 сут после оплодотворения. *Б*. 11-дневный плутеус с зачатком морского ежа на левом целомическом мешке. *В*. 19-дневный плутеус с развивающимся зачатком ежа. *Г*. Одиннадцать минут спустя после прикрепления к субстрату; руки личинки резорбируются. (Из Hinegardner, 1969; фотография с любезного разрешения R. T. Hinegardner.)

Таблица 19.3. Характерные признаки развивающихся морских ежей с типичным и прямым развитием

А. Признаки развития от оплодотворения до начала развития личинки			Б. Признаки личинки		
	Вид			Вид	
	типичный (*Heliocidaris tuberculata*)	с прямым развитием (*Heliocidaris erithrogramma*)		типичный (*Heliocidaris tuberculata*)	с прямым развитием (*Heliocidaris erithrogramma*)
Размеры яйца, мкм	60–345	ок. 450	Закладка личиночного скелета	Да	Нет
Оболочка оплодотворения	Есть	Есть	Морфогенез типичных рук плутеуса	Да	Нет (нет личиночного скелета)
Дробление радиальное	Да	Да			
Четвертое деление дробления	Отделение микромеров	Равномерное дробление	Формирование кишки	Да	Нет
Бластула	Равномерная	Неравномерная	Формирование целома	Да	Да
Активное вылупление	Да	Да	Формирование гидроцеля	Да	Да
Реснички	Есть	Есть			
Первичная мезенхима	32 клетки	Большое число клеток	Впячивание амниона	Да	Да
Инвагинация архентерона	Да	Да	Формирование взрослого ежа	Да	Да
Удлинение архентерона	Да	Нет			

Таким образом, мы встречаемся с любопытным парадоксом. Развитие личиночных стадий представляется в большой степени специализированным и ограниченным. В общем личинки типа плутеуса в разных классах иглокожих очень схожи, как и головастики разных групп лягушек. Тем не менее эта жесткость программы развития может быть преодолена, если нет нужды в стадии самостоятельно питающейся личинки. Увеличение количества желтка предоставляет зародышу эту возможность.

Пластичность личиночного развития открывает новые эволюционные перспективы. Лягушки с прямым развитием, например, могут осваивать регионы, где нет длительно существующих водоемов. Значение прямого развития в случае морского ежа не столь очевидно, хотя примерно 20% тропических видов характеризуется именно этим способом развития. Можно предположить, что прямое развитие служит механизмом, с помощью которого сокращается площадь расселения или уменьшается время, в течение которого свободноплавающие личинки оказываются уязвимы для хищников. Эта пластичность развития заставляет эмбриологов более критично отнестись к закону Бэра, так как раннее развитие может оказаться резко измененным таким фактором, как размеры яйца. Филогенетические связи, выявляемые на основе сходства стадий раннего развития, должны быть пересмотрены в свете этих новых данных о гибкости развития.

Метаморфоз у насекомых

Выворачивание и дифференцировка имагинальных дисков

Если метаморфоз у амфибий характеризуется перестройкой существующих тканей, то метаморфоз у насекомых часто связан с разрушением личиночных тканей и замещением их совершенно иной популяцией клеток. Как у амфибий, так и у насекомых метаморфоз предполагает установление определенного соотношения между гормоном, необходимым для продолжения личиночного роста, и гормоном, стимулирующим новые процессы развития.

Существуют три основных типа развития насекомых. Для незначительного числа видов, например для ногохвосток, характерно прямое развитие без личиночной стадии. Другие, в частности саранча и клопы, претерпевают постепенный **гемиметаболический** метаморфоз или метаморфоз с **неполным превращением** (рис. 19.16, *А*). В этом случае можно проследить преемственность между личиночными органами и органами взрослого насекомого. Зачатки крыльев, гениталий и других структур взрослого насекомого уже представлены при вылуплении и становятся все более зрелыми с каждой линькой. При последней линьке возникает крылатый половозрелый взрослый организм. Личиночная форма гемиметаболического насекомого называется **нимфой**.

Голометаболические насекомые, или насекомые **с полным превращением** (мухи, жуки и бабочки) характеризуются тем, что у них между личиночной и взрослой стадиями происходит внезапная и резкая трансформация (рис. 19.16, *Б*). Ювенильная личинка (гусеница, червовидная личинка) по мере роста претерпевает серию линек. Только что вылупившаяся личинка покрыта плотной **кутикулой.** Возможность роста обеспечивается сбрасыванием старой кутикулы и заменой ее новой большего размера. Постэмбриональное развитие таких насекомых представлено рядом последовательных линек. Число линек до стадии взрослого насекомого является видовым признаком, однако факторы внешней среды могут увеличить или сократить это число. Постэмбриональное развитие

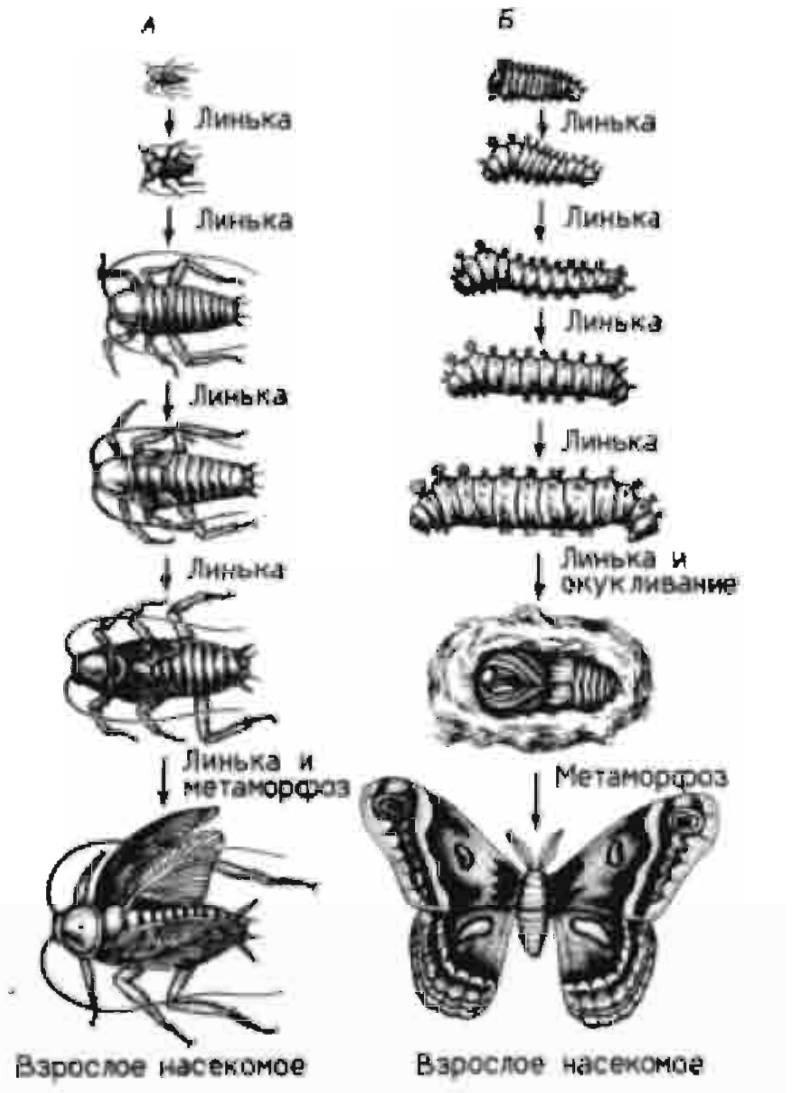


Рис. 19.16. *А*. Гемиметаболическое развитие (неполное превращение). *Б*. Голометаболическое развитие (полное превращение).

насекомых разделяется линьками на ряд стадий, называемых **возрастом.** Личинка последнего возраста приступает к **метаморфозной линьке** и становится **куколкой.** Куколка не питается, она живет за счет энергии пищи, потребленной личинкой.

Именно в куколке и происходит трансформация ювенильной стадии во взрослую. Старое тело личинки подвергается упорядоченной деструкции по мере того, как из скоплений недифференцированных клеток развиваются органы взрослого животного. Эти скопления недифференцированных клеток (гистиобластов) и называются **имагинальными дисками.** Когда взрослый организм (**имаго**) сформируется, происходит последняя **имагинальная линька** – куколка сбрасывает покровы и на свет появляется половозрелое насекомое. Таким образом, в голометаболических личинках имеются две популяции клеток: личиночные клетки, функционирующие на ювенильных стадиях, и имагинальные клетки, собранные в кластеры, ждущие сигнала, чтобы приступить к дифференцировке.

Ранее при обсуждении трансдетерминации и дифференциальной транскрипции генов мы упоминали об имагинальных дисках. У *Drosophila* различают десять основных пар имагинальных дисков, из которых образуются покровы взрослого насекомого (за исключением брюшка), и генитальный диск, формирующий репродуктивные структуры. Эпидермис брюшка образуется из небольшой группы имагинальных клеток, называемых гистиобластами, которые лежат в области личиночной кишки, а другие скопления гистиобластов, локализованные по всему телу личинки, формируют внутренние органы взрослого. Имагинальные диски можно видеть у только что вылупившейся личинки в виде локальных утолщений эпидермиса; в качестве примера на рис. 19.17 представлен диск второй грудной ноги. У *Drosophila* диски глаза – антенны, крыла, жужжальца, ноги и гениталий содержат соответственно 70, 38, 20, 36–45 и 64 клетки (Madhavan, Schneiderman, 1977). И если бóльшая часть клеток личинки обладает очень низкими митотическими возможностями, то клетки имагинальных дисков в соответствующее время быстро делятся (рис. 19.18). По мере пролиферации клетки формируют трубкообразный эпителий, который закручивается в компактную спираль (рис. 19.19). Наиболее крупный диск – диск крыла – содержит около 60 000 клеток, тогда как число клеток, составляющих диски ноги и жужжальца, равно примерно 10 000 (Fristrom, 1972). При метаморфозе эти клетки дифференцируются и **выворачиваются.** На рис. 19.20 представлена презумптивная карта и последовательность

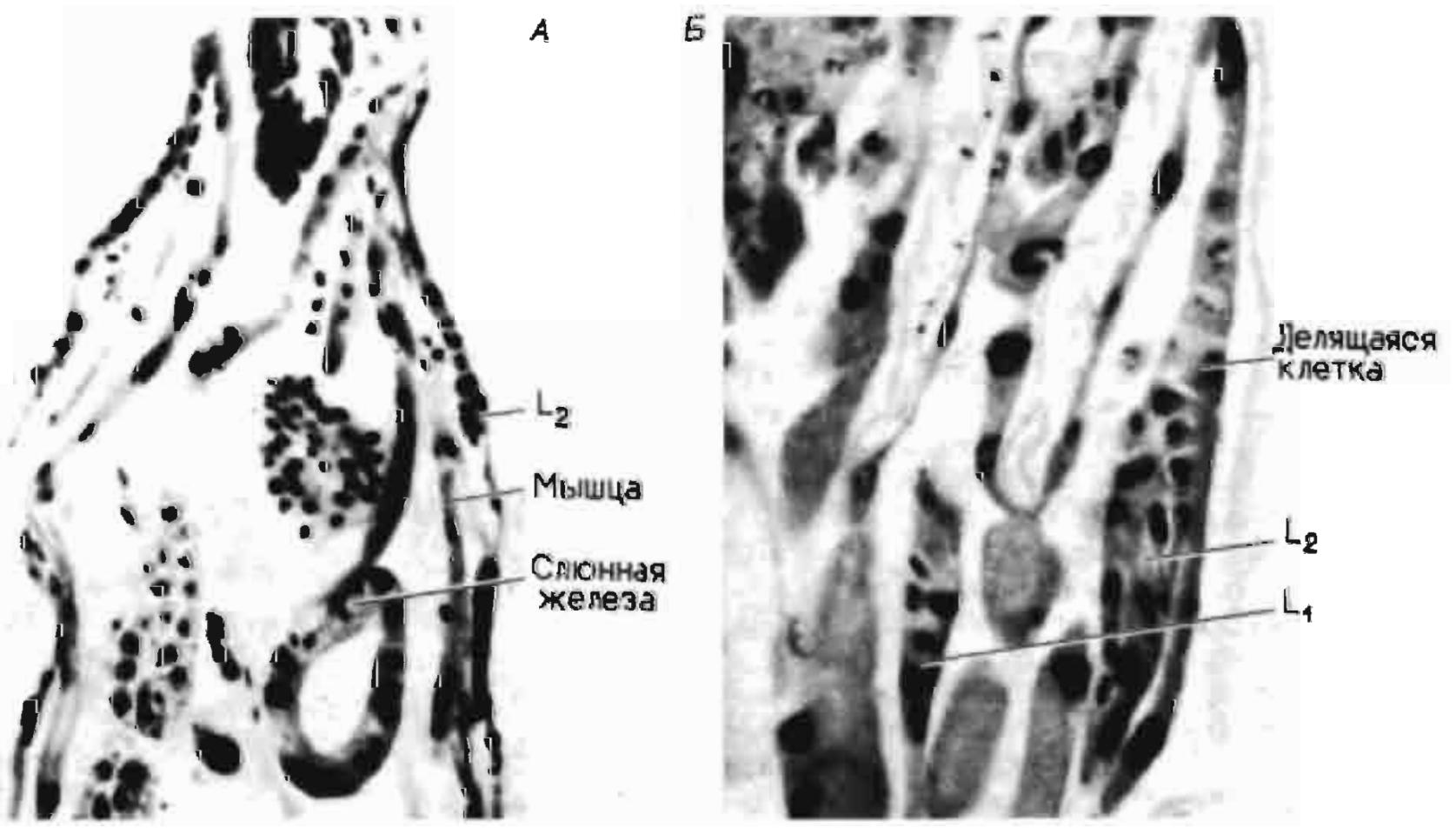


Рис. 19.17. Развитие имагинальных дисков. *А.* Поперечный срез 14-часовой личинки *Drosophila* с эпидермальным зачатком диска мезоторакальной ноги (L_2). *Б.* Аналогичный срез 30-часовой личинки после 3-часового воздействия колхицином для накапливания делящихся клеток. Клетки диска мезоторакальной ноги (L_2) пролиферируют, но одна из них прекратила делиться. На этом же срезе виден диск проторакальной ноги (L_1). (Из Madhavan, Schneiderman, 1977; фотографии с любезного разрешения M. M. Madhavan.)

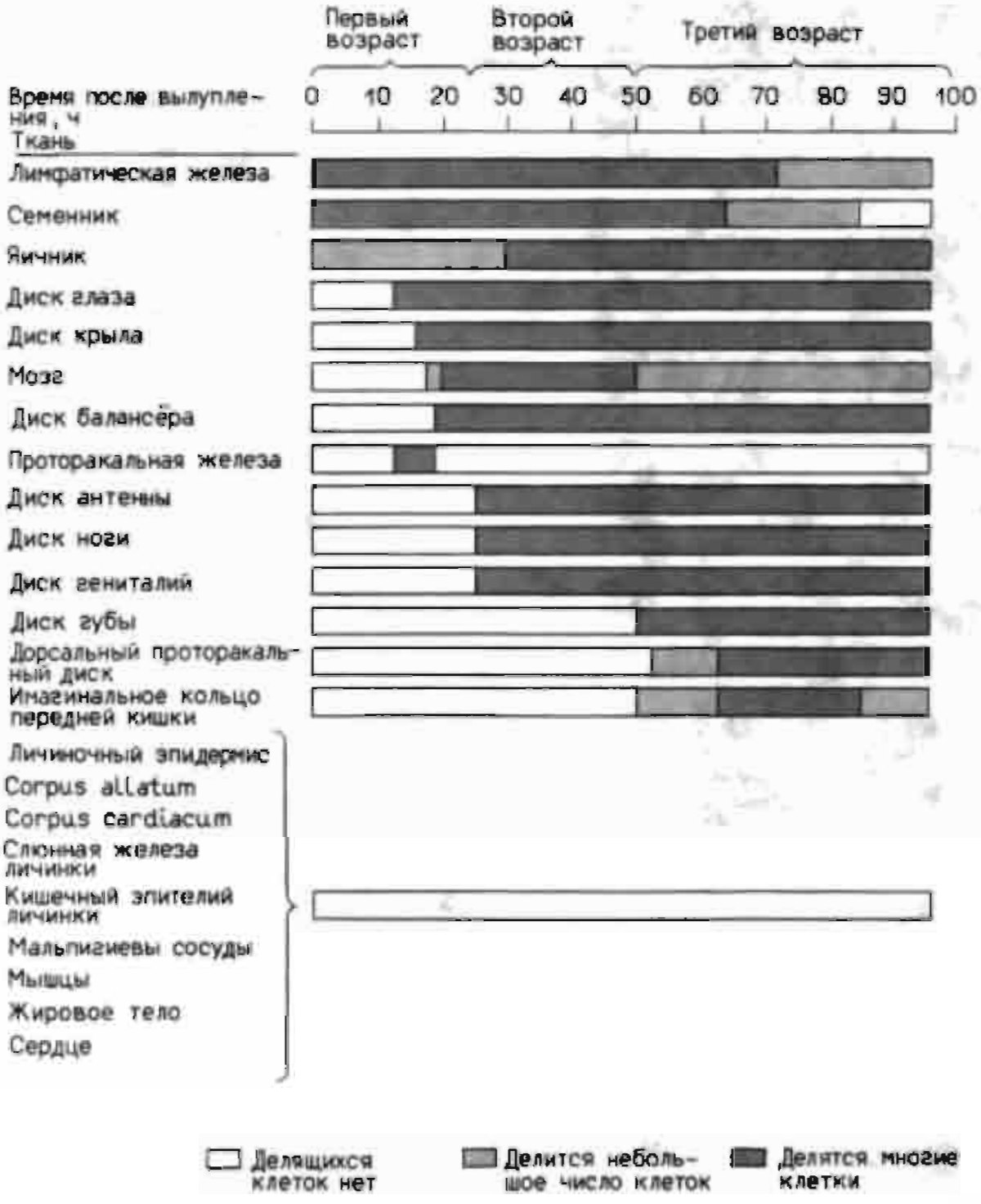


Рис. 19.18. Характер деления клеток в некоторых личиночных и имагинальных тканях в ходе развития личинки *Drosophila*. (По Madhavan, Schneiderman, 1977.)

выворачивания диска ноги. Клетки центральной части диска дают наиболее дистально расположенные части ноги – коготки и лапку, – а периферические клетки становятся проксимальными структурами, образуя тазик и прилежащий эпидермис. Дифференцированные клетки придатков и эпидермиса секретируют кутикулу, соответствующую данной области. Диски изначально представлены эпидермальными клетками, однако небольшое число **адэпителиальных клеток** мигрирует в диск в начале развития. В процессе трансформации куколки эти клетки дают начало мышечным и нервным элементам.

Процесс выворачивания может быть инициирован в культуре путем помещения имагинальных дисков в среду, содержащую гормон линьки экдистерон. Кроме того, выворачивание подавляется добавлением любого из трех наборов ингибиторов: 1) ингибиторов синтеза РНК и белка, если они вносятся в культуру имагинальных дисков в то же время, что и экдистерон; известно, что выворачиванию предшествует синтез РНК и белка (рис. 19.21) и некоторые из этих белков необходимы для осуществления этого процесса; 2) цитохалазина B, подавляющего функции микрофиламентов, что указывает на необходимость актиновых микрофиламентов при выворачивании; 3) конканавалина A – растительного лектина, связывающегося с поверхностными α-глюкозидными и α-маннозидными остатками сахаров, которые, как известно, снижают подвижность компонентов мембраны. Совокупность этих данных указывает на то, что процесс выворачивания имагинальных дисков требует синтеза новых белков, сформированной системы актиновых микрофиламентов и клеточной коммуникации путем взаимодействия клеточных поверхностей (Fristrom et al., 1977).



Рис. 19.19. Выворачивание имагинального диска. Микрофотографии диска ноги дрозофилы (личинка третьего возраста) до (*А*) и после (*Б*) выворачивания, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. (Из Fristrom et al., 1977; фотографии с любезного разрешения D. Fristrom.)

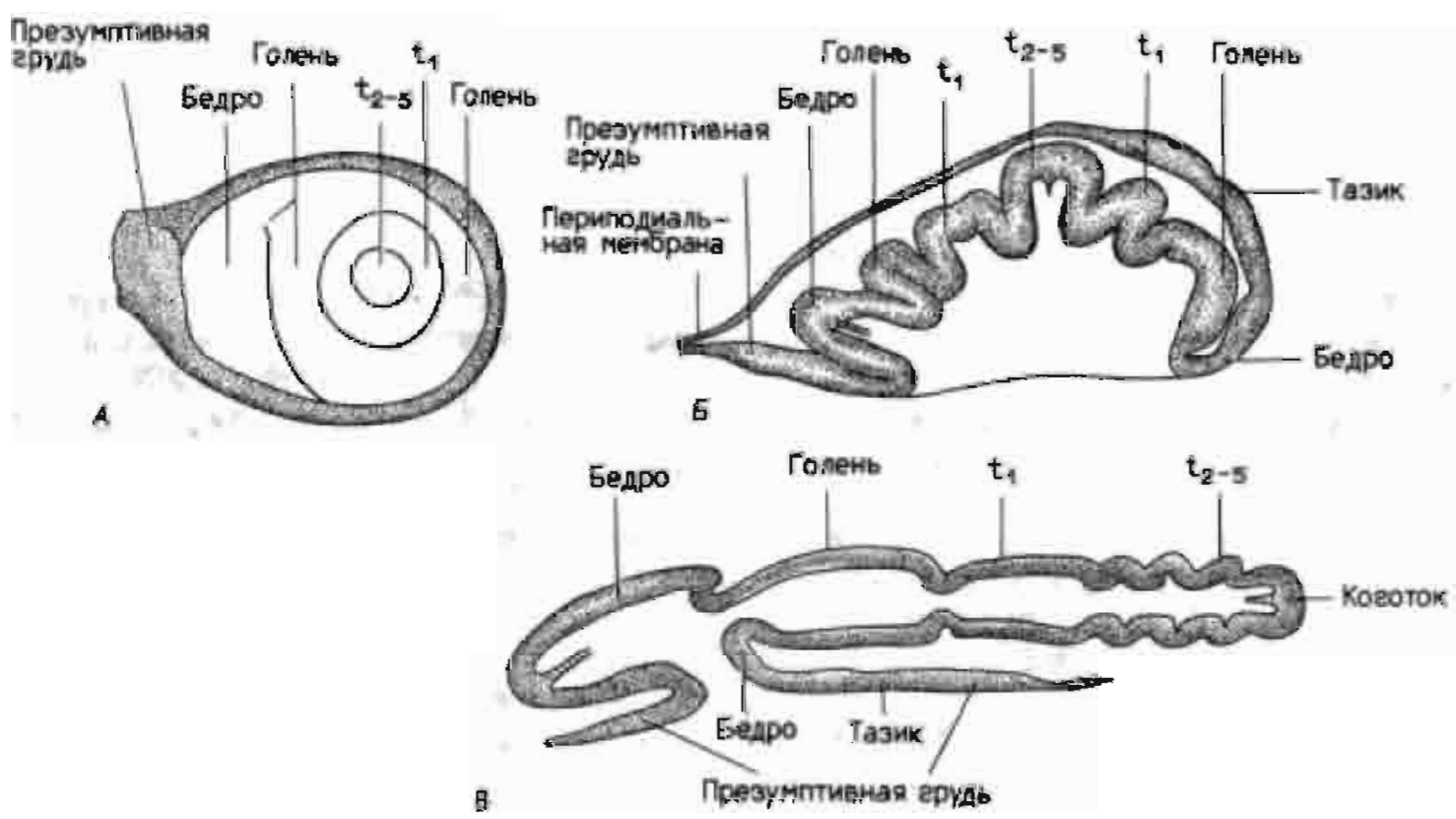


Рис. 19.20. Последовательность выворачивания диска ноги у дрозофилы. *А*. Вид поверхности диска до выворачивания. *Б, В*. Продольный срез через выворачивающийся и вывернутый диск ноги. t_1 – основание лапки; t_{2-5} – тарзальные сегменты 2–5. (Из Fristrom, Fristrom, 1975; с любезного разрешения D. Fristrom.)

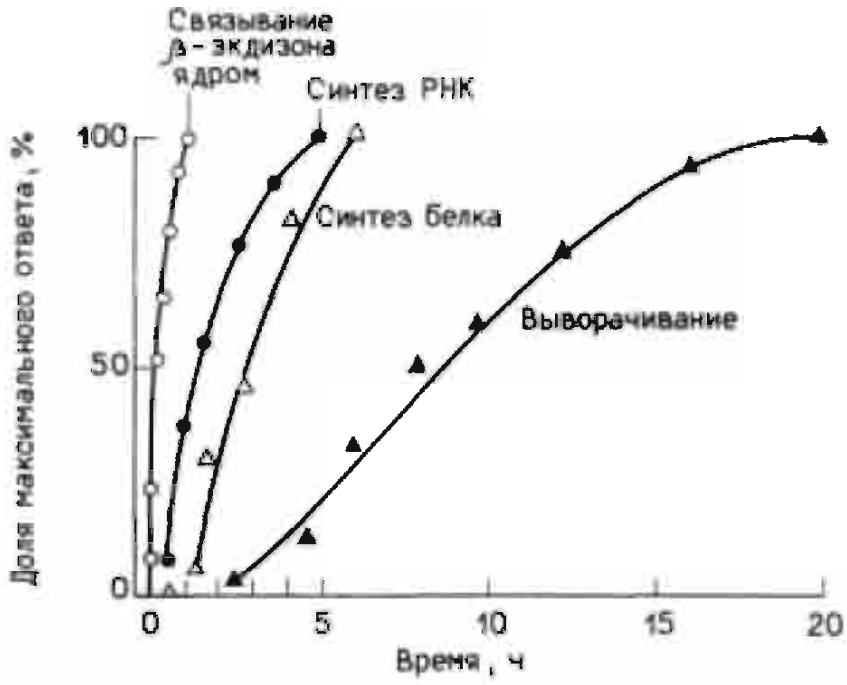


Рис. 19.21. Молекулярные и морфологические события после введения экдистерона в культуральную среду с имагинальными дисками ноги. (По Fristrom et al., 1977.)

Перестройка нервной системы

Как и у бесхвостых амфибий, метаморфоз у насекомых сопровождается значительной реконструкцией нервной системы организма. Некоторые нейроны гибнут, другие начинают выполнять новые функции. В гл. 15 мы рассмотрели развитие фоторецепторов из эпителиальных клеток глазного диска. В этом случае дифференцируется новый набор нейронов с новыми функциями. Нейроны, связанные с гибнущими тканями, либо гибнут, либо меняют свою специализацию. Нерв, иннервирующий мышцу ложной ножки гусеницы бражника *Manduca*, обладает независимой чувствительностью к экдистерону и гибнет одновременно со своей личиночной тканью-мишенью. Однако моторный нейрон, иннервирующий вторую косую мышцу личинки, переживает гибель своей мишени, чтобы иннервировать новообразованную взрослую мышцу (четвертую дорсальную наружную мышцу), которая дифференцируется в ходе метаморфоза (Truman et al., 1985).

В некоторых случаях личиночные функции начинают осуществляться другими областями взрослого организма. Так, у личинки светляка парный орган свечения располагается на восьмом (последнем) брюшном сегменте. Нейроны восьмого брюшного сегмента контролируют их люминесценцию. В процессе окукливания на шестом и седьмом сегментах также развиваются фотогенные клетки и нервы, контролирующие режим свечения. К концу окукливания только шестой и седьмой сегменты несут органы свечения. Более того, если у личинки удалить эти органы, то у взрослых они тем не менее образуются (Strause et al., 1979). Таким образом, функцию ганглиев восьмого сегмента начинают выполнять ганглии шестого и седьмого сегментов.

Гормональный контроль метаморфоза у насекомых

Как и у амфибий, метаморфоз у насекомых регулируется двумя эффекторными гормонами, которые находятся под контролем нейросекреторных гормонов мозга (см. обзор Granger, Bollenbacher, 1981; Gilbert, Goodman, 1981). Несмотря на то что отдельные детали метаморфоза различны у разных видов, все же для некоторых организмов можно составить его общую схему (рис. 19.22). Процесс линьки инициируется в мозге, нейросекреторные клетки которого в ответ на нервный, гормональный или средовой сигналы выделяют **проторакотропный гормон** (ПТТГ) – пептидный гормон с молекулярной массой 40 000 дальтон, стимулирующий образование **экдизона** клетками **проторакальной железы.** Экдизон, однако, не является активным гормоном, скорее он служит прогормоном, который должен перейти в активную форму. Этот переход осуществляется благодаря гемсодержащей оксидазе в митохондриях периферических тканей, например в жировом теле, где экдизон превращается в активную форму – **экдистерон** (рис. 19.23)[1].

Каждая линька происходит в результате двух импульсов секреции экдистерона. Первый импульс вызывает небольшое повышение концентрации экдизона в гемолимфе (крови) личинки и, по-видимому, имеет существенное значение только при метаморфозной линьке. Второй, высокий пик концентрации экдистерона инициирует события, связанные с линькой и не зависящие от гормонального статуса личинки во время первого импульса экдизона. Этот всплеск экдистерона побуждает эпидермальные клетки синтезировать ферменты, перевариваюшие и реутилизирующие компоненты кутикулы. В некоторых случаях, например у бабочки *Cecropia*, линька может находиться под контролем условий окружающей среды. Ее ПТТГ перестает выделяться после формирования куколки. В течение зимы куколка остается в состоянии покоя, называемом **диапаузой,** которая при определенных условиях может длиться очень долго. Однако, если после двухнедельного воздействия холодом перенести куколку в более теплое помещение, то она может приступить к линьке (Williams, 1952, 1956).

Второй главный эффекторный гормон, контроли-

[1] С тех пор как Бутенандт и Карлсон (Butenandt, Karlson, 1954) в 1954 г. выделили 25 мг гормона линьки из 500 кг куколок тутового шелкопряда, экдистерон называли по-разному, в частности β-экдизон, 20-гидроксиэкдизон и крустэкдизон.

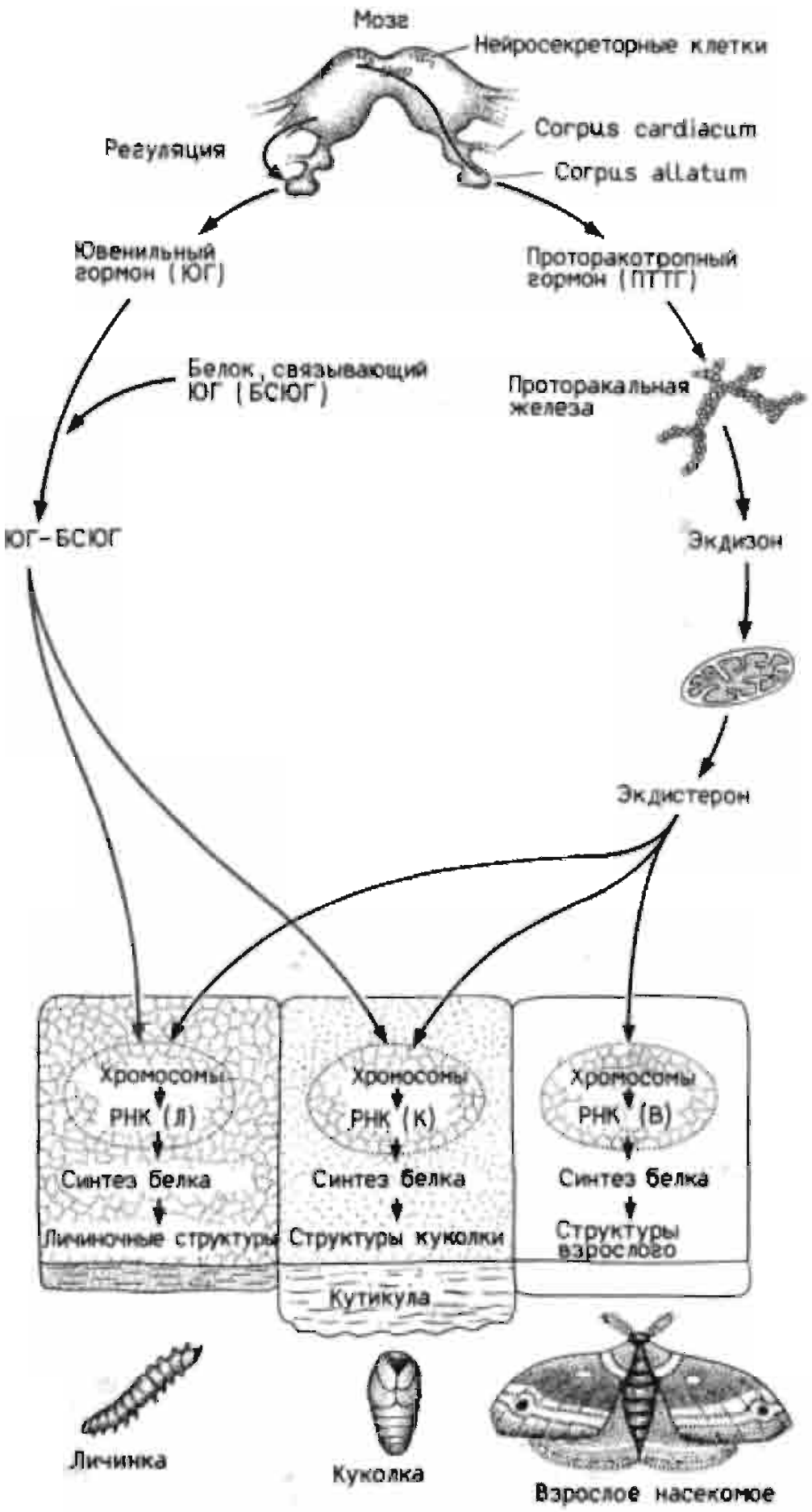


Рис. 19.22. Схема, иллюстрирующая контроль линьки и метаморфоза у табачного бражника. (По Gilbert, Goodman, 1981.)

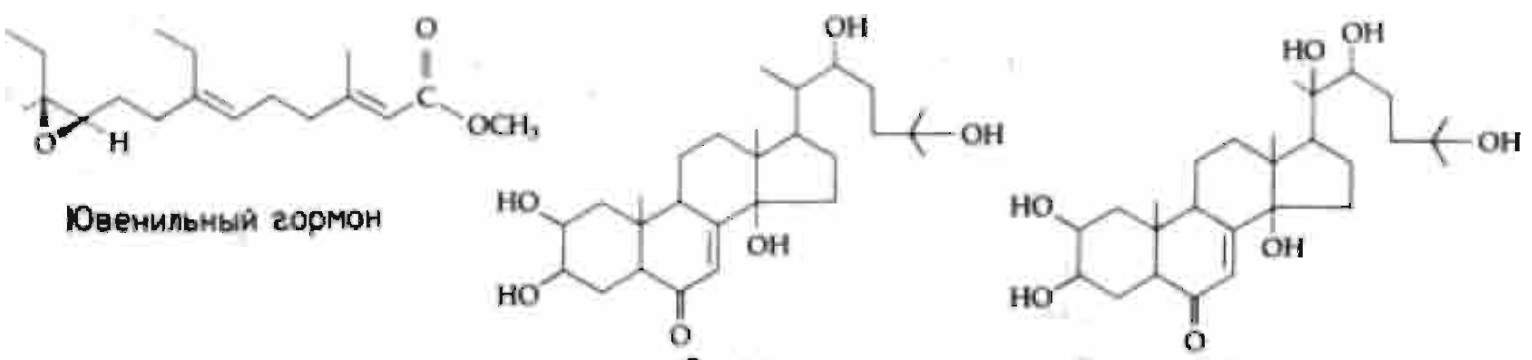


Рис. 19.23. Структурные формулы ювенильного гормона, экдизона и активного стероида экдистерона (20-гидроксиэкдизона).

рующий развитие насекомых,– это **ювенильный гормон** (ЮГ). Структурная формула обычного ювенильного гормона, активного у гусеницы *Cecropia*, представлена на рис. 19.23. Ювенильный гормон образуется в **corpora allata,** или прилежащих телах. Секреторные клетки corpora allata активны в течение личиночных линек, но прекращают функционировать при метаморфозной линьке. Этот гормон препятствует наступлению метаморфоза. В присутствии ювенильного гормона стимулированная экдизоном линька завершается переходом личинки в новый возраст. У личинки последнего возраста синтез ювенильного гормона постепенно снижается и, наконец, падает ниже критического, порогового значения. Это событие индуцирует выделение мозгом ПТТГ. ПТТГ в свою очередь стимулирует проторакальную железу к синтезу и секреции большого количества экдизона. Образовавшийся экдистерон на фоне относительно небольшого содержания ювенильного гормона переводит клетки на путь, ведущий к окукливанию. Последующая линька, которая происходит при сниженном количестве ювенильного гормона, продвигает развитие организма от личинки к куколке (Nijhout, Williams, 1974; Rountree, Bollenbacher, 1986). В процессе окукливания corpora allata не секретируют ювенильный гормон и стимулированная экдизоном куколка переходит к метаморфозу во взрослое насекомое. Удаление corpora allata у личинки вызывает ее преждевременный метаморфоз в недоразвитый взрослый организм (рис. 19.24), а воздействие экзогенным ювенильным гормоном на личинку последнего возраста может отсрочить линьку куколки. Таким образом, метаморфоз происходит в том случае,



Рис. 19.24. Преждевременный метаморфоз тутового шелкопряда, индуцируемый удалением corpora allata у личинки третьего возраста. Минуя линьку, ведущую к пятому возрасту, личинка переходит прямо к окукливанию.

если экдистерон воздействует на имагинальные диски в отсутствие ювенильного гормона. По-видимому, в отсутствие ювенильного гормона экдистерон индуцирует синтез белков, активируя образование поздних пуфов. Если же ювенильный гормон присутствует во время первого импульса экдистерона, то ранние пуфы образуются как обычно, но образование поздних пуффов подавлено (Richards, 1978).

Дополнительные сведения и гипотезы

Конец детства; сигнал к началу метаморфоза

В 1880 г. к Уильяму Кейту Бруксу, эмбриологу из Университета Джона Гопкинса (консультировавшему диссертации Т. Моргана, Э. Б. Вильсона, Р. Гаррисона и И. Г. Конклина), обратились с просьбой помочь промышленному разведению устриц в Чесапикском заливе, которое стало приходить в упадок. В течение десятилетий драгировка устриц из залива компенсировалась их воспроизводством. Однако в последнее время уловы стали уменьшаться с каждым годом. Требовалось установить и устранить причину. Экспериментируя с устрицами, Брукс обнаружил, что американские устрицы (в отличие от своих европейских сородичей) для метаморфоза нуждаются в твердом субстрате. В течение многих лет ловцы устриц выбрасывали раковины обратно в море, но в последние годы стали продавать их на цементные заводы. Решение Брукса было лаконичным: возвратить раковины в море. Популяция устриц отреагировала на это решение и в результате балтиморские причалы до сих пор торгуют их потомками.

Исследование Брукса привлекло внимание к очень важному обстоятельству. Личинки не могут приступить к метаморфозу в любых условиях. Почти всегда им требуется субстрат для оседания. Камерон и Хайнгардинер (Cameron, Hinegardner, 1974) обнаружили, что оседание плутеусов двух морских ежей, *Arbacia punctulata* и *Lytechinus pictus*, происходит только в сосудах, дно которых покрыто бактериальной пленкой. Бактерии служат источником фактора, индуцирующего оседание. Этот фактор способен проходить через мембрану, задерживающую вещества с молекулярной массой более 5 000 дальтон. В чис-

том аквариуме плутеусы могут плавать более двух месяцев, а затем погибают (Hinegardner, 1969). Для оседания личинок разных иглокожих требуются различные условия.

Взрослый морской еж *Dendraster excentricus* помогает своим личинкам приступать к метаморфозу, выделяя в песок какое-то вещество (возможно, пептид с молекулярной массой менее 10 000 дальтон). Это вещество привлекает личинок *D. excentricus* и индуцирует их метаморфоз. Поэтому личинки *Dendraster* имеют тенденцию скапливаться внутри или вблизи колонии этих морских ежей; в результате плотность их на некоторых участках морского дна достигает нескольких сотен особей на 1 м^2, тогда как соседние участки оказываются незаселенными. Была высказана гипотеза (Highsmith, 1982), что взрослые морские ежи в таких скоплениях способствуют выживанию отдельных особей, защищая метаморфизирующих личинок *Dendraster* от хищных ракообразных.

Естественно, что успешнее будут выживать те особи, метаморфоз которых индуцируется в условиях лучшей защиты от врагов или вблизи потенциального источника пищи. Для оседающей личинки будет крайне невыгодно осесть там, где для нее нет пищи, особенно если взрослая форма этого животного ведет практически сидячий образ жизни. Специфических условий для оседания требуют личинки различных моллюсков (табл. 19.4). У большинства голожаберных моллюсков сигналом для наступления метаморфоза служит пища взрослых особей (которая у разных видов различна). В некоторых случаях выделены и идентифицированы растворимые компоненты добычи, индуцирующие метаморфоз (Hadfield, 1977). Оседание личинки корабельного червя *Teredo navalis* индуцируют вещества, выделяемые древесиной; растворимый материал, вымываемый из раковин устриц, вызывает оседание их личинок.

У насекомых основную роль в инициации метаморфоза играют размеры личинки. Так, гусеница табачного бражника не приступит к метаморфозу до тех пор, пока ее масса не достигнет 3 г, в некоторых случаях ей понадобятся для этого дополнительные личиночные линьки (Safranek, Williams, 1984). Вероятно, по достижении нужной стадии мозг выделяет вещество, ингибирующее секрецию ювенильного гормона (Bhaskaran et al., 1980). У пчел размеры личинки-самки, приступающей к метаморфозной линьке, детерминируют судьбу организма, т. е. будет ли особь рабочей пчелой или маткой. У личинки, питающейся обогащенным питательными веществами «маточным молочком», сохраняется активность corpora allata в течение последней возрастной стадии. Ювенильный гормон, секретируемый этим органом, задерживает окукливание, создавая таким образом условия для дополнительного роста, а у некоторых видов – и большей анатомической специализации развивающейся пчелы (Plowright, Pendrel, 1977; Brian, 1980).

Таблица 19.4. Специфика субстратов для оседания личинок моллюсков

Виды моллюсков	Субстрат
GASTROPODA (УЛИТКИ, ГОЛОЖАБЕРНЫЕ)	
Nassarius obsoletus	Ил с места обитания взрослых
Philippia radiata	*Porites lobata* (кишечнополостное)
Adalaria proxima	*Electra pilosa* (мшанка)
Doridella obscura	*Electra crustulenta* (мшанка)
Phestilla sibogae	*Porites compressa* (кишечнополостное)
Rostanga pulchra	*Ophlitaspongia pennata* (губка)
Trinchesia aurantia	*Tubularia indivisa* (кишечнополостное)
Elysia chlorotica	Первичная пленка микроорганизмов с места обитания взрослых особей
Haminoea solitaria	Первичная пленка микроорганизмов с места обитания взрослых особей
Aplysia californica	*Laurencia pacifica* (красная водоросль)
Aplysia juliana	*Ulva* sp. (зеленая водоросль)
Aplysia parvula	*Chondrococcus hornemanni* (красная водоросль)
Stylocheilus longicauda	*Lyngbya majuscula* (цианобактерия)
AMPHINEURA (ХИТОНЫ)	
Tonicella lineata	*Lithophillum* sp., *Lithothamnion* sp. (красные водоросли)
LAMELLIBRANCHIA (ДВУСТВОРЧАТЫЕ)	
Teredo sp.	Дерево
Bankia gouldi	Дерево
Mercenaria mercenaria	Выделения двустворчатых моллюсков; песок
Placopecten magellanicus	Раковины взрослых; песок и т. п.
Mytilus edulis	Нитчатые водоросли; подобный небиологический шелковый материал
Crassostrea virginica	Экстракт из раковин и из самих моллюсков; «гликоген панцирных»
Ostrea edulis	Мышечный экстракт; мантийная жидкость взрослых особей

Из Hadfield, 1977.

Вещества, вызывающие преждевременное развитие

У многих насекомых личиночные формы специализированы для питания, а взрослые – для размножения и передвижения. Понятно, что сокращение длительности стадии прожорливой личинки должно быть благоприятно для растений. Из сложноцветных выделены два соединения, индуцирующие преждевременный метаморфоз личинок некоторых насеко-

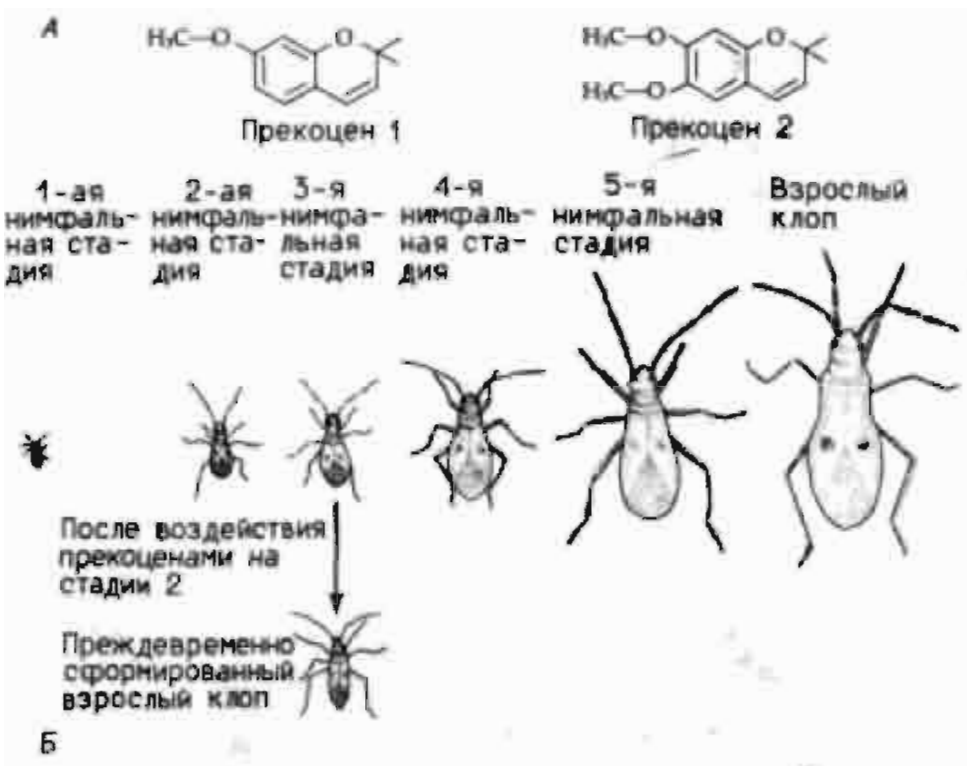


Рис. 19.25. Преждевременный метаморфоз у клопа *Dysdercus*, вызванный прекоценами. *А*. Структурные формулы двух активных прекоценов, выделенных из растений. *Б*. Приостановленное развитие *Dysdercus*. Воздействие прекоценами на вторую нимфальную стадию приводит к тому, что личинка прекращает последовательные линьки и раньше времени превращается во взрослое насекомое, остающееся, однако, стерильным. (По Bowers et al., 1976.)

мых в стерильный взрослый организм (Bowers et al., 1976). Эти соединения названы **прекоценами** и их химическое строение представлено на рис. 19.25, *А*. Личинки или нимфы этих насекомых, опыленные любым из упомянутых соединений, претерпевают еще одну линьку и приступают к метаморфозу во взрослую форму (рис. 19.25, *Б*). Механизм действия этих веществ заключается в том, что они вызывают избирательную гибель клеток corpora allata у незрелого насекомого (Schooneveld, 1979; Pratt et al., 1980). Клетки corpora allata, как известно, ответственны за синтез ювенильного гормона, поэтому, лишившись ювенильного гормона, личинка переходит к метаморфозной и имагинальной линькам. Кроме того, ювенильный гормон отвечает также за созревание яиц насекомого (гл. 21). В отсутствие этого гормона самки остаются стерильными. Таким образом, прекоцены способны защищать растения, вызывая преждевременный метаморфоз личинок некоторых насекомых в стерильных взрослых особей.

Животные и растения связали свои жизненные циклы во многих отношениях. Период цветения у растений, например, должен точно совпадать по времени с переходом его специального опылителя во взрослую стадию. Что толку цвести, когда опылитель существует в виде обитающей в почве личинки? Экологи обнаружили целый ряд примеров такого утонченного согласования во времени фаз развития. Например, у некоторых ос-опылителей самцы выходят из куколки за несколько недель до выхода самок. Некоторые дикие орхидеи используют эту разницу во времени, выпуская цветы, напоминающие брюшко осы-самки. Самцы пытаются спариваться с этими цветами, но их напрасные попытки приводят лишь к опылению орхидей (Meeuse, 1961; Procter, Yeo, 1972). Жизненные циклы животных, развивающихся с метаморфозом, всегда сплетены в сложную сеть взаимодействий, связывающих виды друг с другом.

Множественные гормональные взаимодействия при развитии молочной железы

Гормоны могут оказывать на развитие как конструктивное, так и деструктивное действие. При метаморфозе гормоны могут служить для одних клеток сигналами гибели, для других – сигналами дифференцировки новых органов. При развитии молочной железы различные гормоны сообщают рудиментарной ткани различную информацию. Развитие молочной железы можно подразделить на три стадии: эмбриональную, пубертатную и стадию лактации (беременности). Специфические продукты дифференцированных молочных желез – казеин и другие молочные белки – образуются только на последней стадии (Topper, Freeman, 1980).

Эмбриональная стадия

В ходе нормального развития у самки мыши на 11-й день по обеим сторонам брюшной средней линии появляются две полосы приподнятой эпидермальной ткани. Это образование называют **молочным гребнем.** В каждом гребне формируются центры концентрации клеток, называемые **молочными почками** (рис. 19.26). У мыши с каждой стороны образуется по пять таких почек, у человека – по одной,

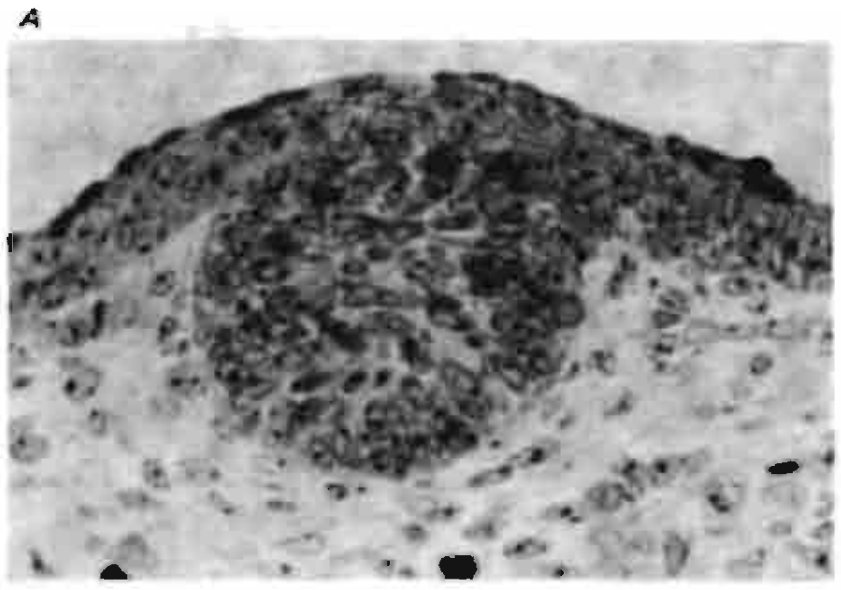


Рис. 19.26. Последовательность стадий раннего развития молочной железы у мыши-самки. *А*. Почка молочной железы 12-дневного зародыша. Эпителиальные клетки эктодермы внедряются в мезенхиму. *Б*. Млечный тяж 15-дневного зародыша. Небольшая щель на дне свидетельствует о начале ветвления. *В*. У 20-дневного зародыша просвет тяжа расширяется с образованием полости. (Из Hogg et al., 1983; фотографии с любезного разрешения C. Tickle.)

Незадолго до рождения эпителиальные клетки в месте этих узелков начинают активно пролиферировать, образуя тяж клеток – **первичный млечный проток.** Этот тяж клеток на одном конце открывается на коже, формируя сосок, на другом конце начинает ветвиться. На этом его развитие останавливается вплоть до полового созревания.

Развитие ткани молочной железы у самцов мыши происходит так же, как у самок до 13–15 дня беременности. В этот период мезенхимные клетки концентрируются вокруг центра млечной почки, и клетки первичного протока погибают. В результате небольшой тяж эпителиальных клеток отделяется от кожи (рис. 19.27) и зачаток молочной железы не достигает поверхности. Дальнейшего развития железы не происходит.

Гибель клеток млечного тяжа (первичного протока) у самцов изучалась путем культивирования клеточных зачатков (почек) in vitro. Такие почки, взятые от самок, как и в норме, формируют дольки, связанные с поверхностью (рис. 19.28). Однако при добавлении в культуральную среду тестостерона они подвергаются редукции. Мужские почки в отсутствие тестостерона также образуют дольки. Иначе говоря, тестостерон предотвращает развитие молочной железы у самцов. Тестостерон вызывает специфическую гибель клеток путем стимуляции мезенхимных клеток к разрушению эпителиального тяжа. Это было показано в серии экспериментов по рекомбинации. У мышей (как и у человека) существует мутация, обусловливающая возникновение **синдрома отсутствия чувствительности к андрогену,** при которой генетический самец (XY) лишен функциональных рецепторов к тестостерону. В таких случаях, несмотря на активную секрецию семенниками тестостерона, организм не может на него реагировать. Одним из последствий этой мутации является развитие у таких индивидуумов молочных желез (см. рис. 21.8). Были проведены эксперименты (Kratochwil, Schwartz, 1976), в которых из нормальных и мутантных молочных желез выделяли мезенхимные и эпителиальные клетки и культивировали их в различных комбинациях. В одни культуры вносился тестостерон, в другие – нет. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 19.29. Если и мезенхима, и эпителий принадлежали дикому типу, зачаток развивался в ткань молочной железы. При внесении тестостерона мезенхима собиралась вокруг почки и почка ее рассасывалась. Если нормальный эпителий культивировали с мутантной мезенхимой (не способной



Рис. 19.27. Зачаток молочной железы у мужского плода мыши. Зачаток отделен от эпидермиса. (Из Raynaud, 1961.)

реагировать на тестостерон), то нормальное развитие молочной железы шло и в присутствии тестостерона. Однако в случае нормальной мезенхимы и мутантного эпителия тестостерон мог вызывать дегенерацию клеток млечного тяжа. Таким образом, мишенью для тестостерона служит не эпителий, а мезенхима. Именно реакция мезенхимы обусловливает действие тестостерона. У самцов тестостерон побуждает мезенхимные клетки млечной почки разрушать прилежащий эпителий. Этот эффект является специфическим: мезенхима иного происхождения не способна вызвать гибель эпителиальных клеток молочной железы, другой эпителий не может быть разрушен млечной мезенхимой (Dürnberger, Kratochwil, 1980).

Пубертатная стадия

В пубертатный период (у мышей он длится с 4-й по 6-ю неделю) происходит интенсивная пролиферация клеток системы протока молочной железы. Деление клеток находится под контролем эстрогена и гормонов роста. Клетки секретирующих молоко альвеол на верхушках протоков еще не дифференцированы, молоко не образуется.

Беременность

В период между пубертатной стадией и беременностью клетки молочной железы мыши не делятся и не дифференцируются. Со второй половины беременности ситуация меняется. Под действием гормонов эстрогена и прогестерона (источником последнего служит плацента) формируются новые протоки, а их дистальные клетки приобретают признаки секреторных клеток.

В клетках культивируемых молочных желез, изолированных у животного на средних сроках беременности, гранулярный эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи развиты слабо и совсем не содержится казеиновых гранул. После добавления

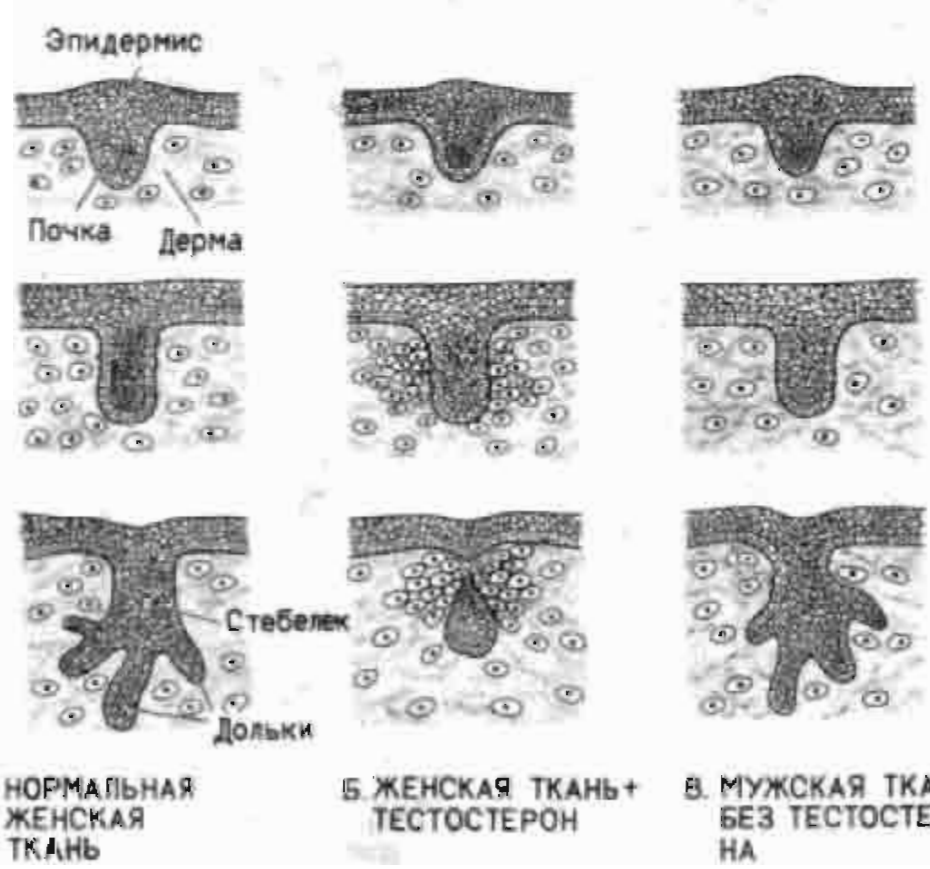


Рис. 19.28. Влияние тестостерона на отделение млечного тяжа. *А*. Млечная ткань самки мыши как in vivo, так и в культуре подрастает под эпидермис и ветвится. *Б*. Если млечная ткань самки мыши культивируется в присутствии тестостерона, то происходит удлинение почки, но вокруг ее формирующегося стебелька накапливаются мезенхимные клетки и его нижняя часть отделяется, как это происходит при нормальном развитии у самца. *В*. Если млечную ткань самца мыши культивировать без тестостерона, то раннее развитие зачатка молочной железы идет по женскому типу. (По Kratochwil, 1971.)

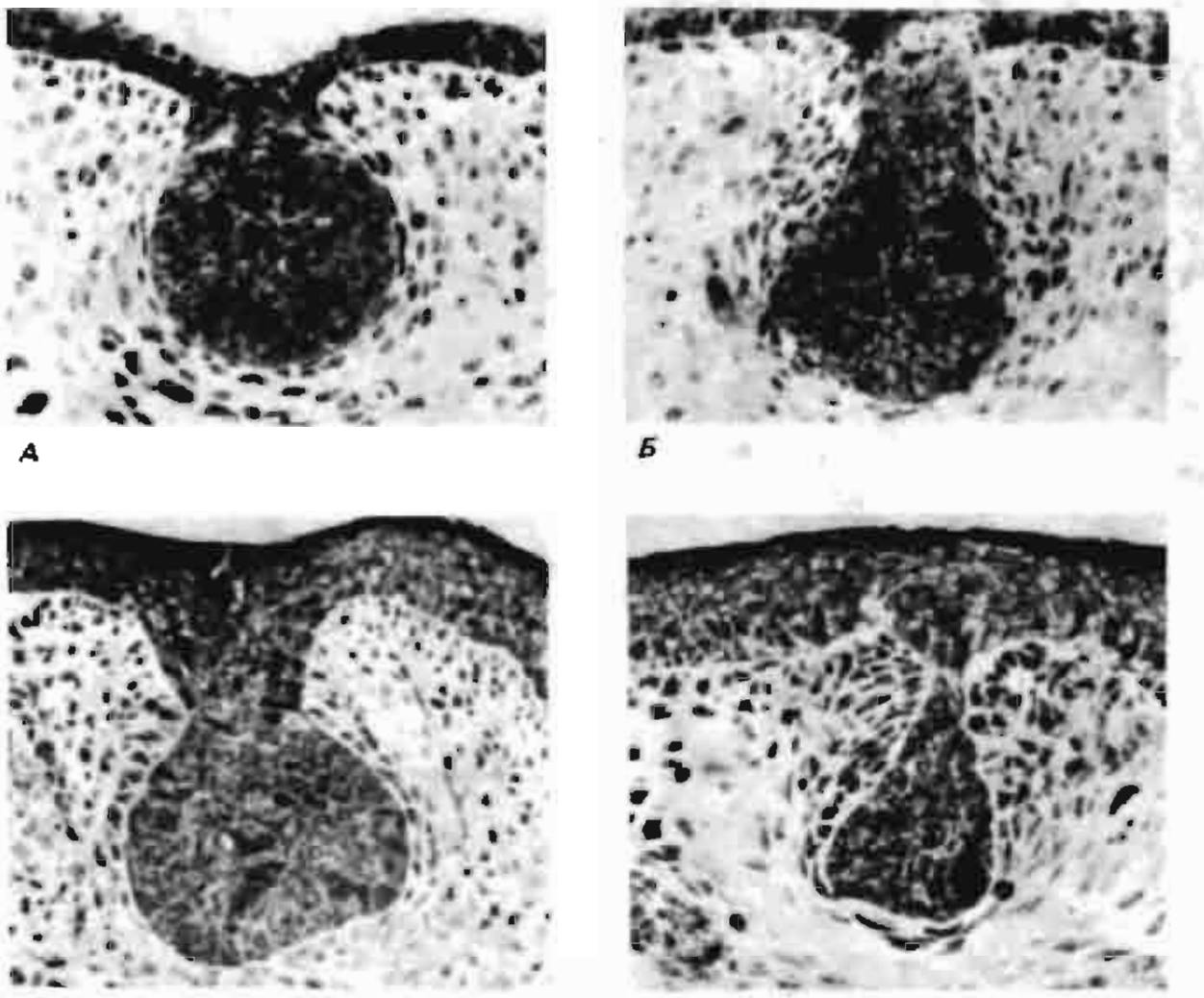


Рис. 19.29. Данные, свидетельствующие о том, что при остановке развития молочной железы мишенью для тестостерона служат мезенхимные клетки. *А*. Культивируемый зачаток молочной железы 14-дневного зародыша. *Б*. Зачаток молочной железы 14-дневного зародыша. *Б*. Зачаток молочной железы 14-дневного зародыша (самца), начавший реагировать на тестостерон. *В*. Рекомбинантная почка молочной железы, состоящая из эпителиальных клеток дикого типа и нечувствительной к андрогену мезенхимы после культивирования с тестостероном. Мезенхимные клетки собираются в области стебелька почки. (Из Kratochwil, Schwarz, 1976; фотографии с любезного разрешения К. Kratochwil.)

в среду инсулина или другого стимулятора синтеза ДНК эти клетки приобретают чувствительность к другим гормонам (Turkington et al., 1965). Глюкокортикоиды способны индуцировать формирование гранулярного эндоплазматического ретикулума, а пролактин стабилизирует казеиновую мРНК, что обеспечивает синтез соответствующего молочного белка (рис. 19.30).

Таким образом, развитие молочной железы включает сложное взаимодействие нескольких гормонов на протяжении трех периодов онтогенеза – эмбрионального, пубертатного и беременности. Молочная железа никогда не развивается у нормальных самцов и никогда не становится дифференцированным органом у взрослых самок до наступления второй половины беременности.

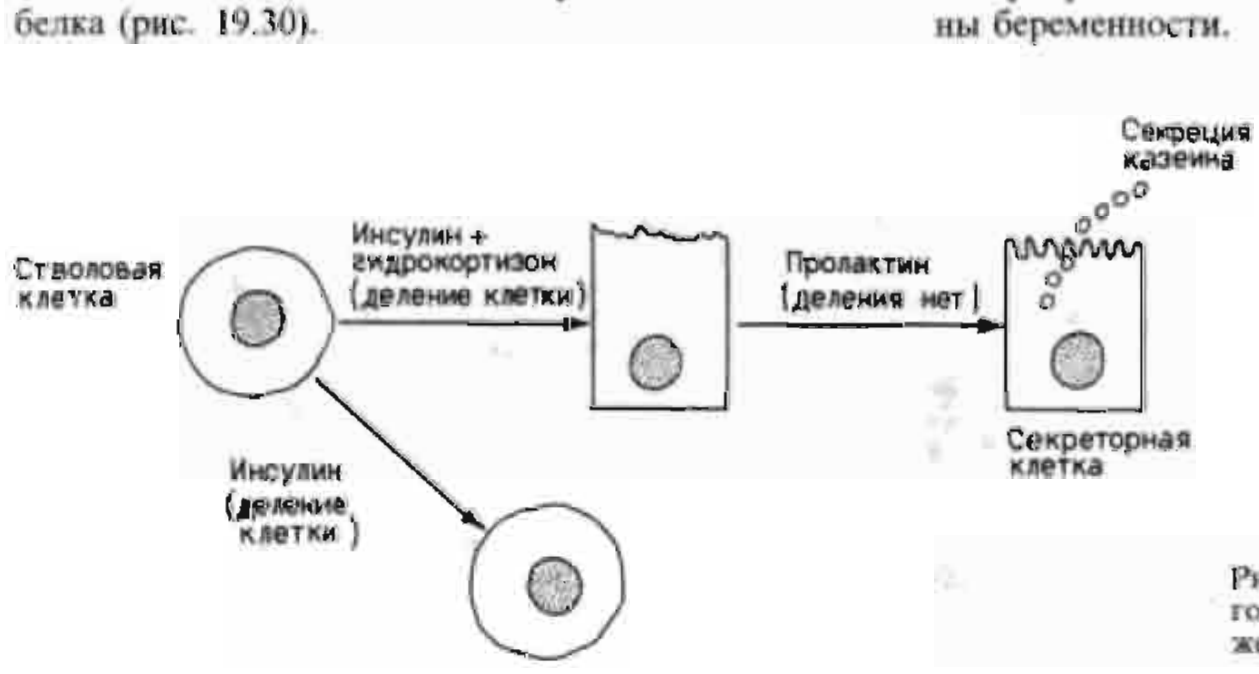


Рис. 19.30. Схема, представляющая гормонзависимое развитие молочной железы in vitro. (По Turkington, 1968.)

Дополнительные сведения и гипотезы

Половое созревание как вариация на тему метаморфоза

У млекопитающих одно из наиболее ярких проявлений гормонального контроля дифференцировки наблюдается при половом созревании человека. Если понимать метаморфоз как процесс драматических изменений, сопровождающих переход ювенильного организма к зрелости – как половой, так и биохимической, – то в таком случае половое созревание человека можно рассматривать как разновидность метаморфоза. Результаты последних исследований свидетельствуют о том, что метаморфоз и половое созревание действительно обладают достаточным сходством. Стайн и Грумбах (Styne, Grumbach, 1978) дали превосходное определение процесса полового созревания:

> «Половое созревание – период перехода от ювенильного состояния к взрослому; в течение этой стадии развития появляются и совершенствуются вторичные половые признаки, наблюдается вспышка роста, достигается половая зрелость, проявляются глубокие изменения в психике. Эти изменения прямо или косвенно являются результатом созревания гипоталамо-гипофизарной гонадотропной системы, стимулирующей половые органы и секрецию половых стероидов».

В самом деле, в это время происходят значительные изменения формы тела. В начале полового созревания мальчики и девочки характеризуются одинаковым соотношением мышечной массы, скелета и подкожного жира. К концу полового созревания скелетная и мышечная масса мужчин в 1,5 раза превосходит соответствующий показатель для женщин, тогда как у женщин накапливается почти вдвое больше жира (Forbes, 1975). Вторичные половые признаки [1] также развиваются в это время, означая переход от ювенильной формы к половозрелой. У женщин развитие молочных желез контролируется эстрогеном, секретируемым яичниками; у мужчин созревание пениса и семенников контролируется тестостероном, выделяемым семенниками. У обоих полов развитие волос на лобке и подмышками регулируется тестостероном, секретируемым семенниками у мужчин и надпочечниками у женщин. Мужчины также претерпевают тестостерон-зависимое увеличение гортани и связанных с ней мышц и хряща, делающее голос более низким. У обоих полов главные события полового созревания приходятся на пубертатный период. У женщин первое появление менструаций свидетельствует о новой интеграции гормональных циклов, обеспечивающих высвобождение развивающегося яйца из яичника. Мужчины достигают половой зрелости, когда мужские половые клетки вступают в мейоз и формируется семявыносящий проток, по которому спермии проходят из семенников в уретру.

Гормональная основа полового созревания оказывается очень сходной с гормональной основой метаморфоза. И у амфибий, и у насекомых метаморфоз начинается с гормональных изменений, индуцированных нейрогормонами мозга (РФ-ТТГ и ПТТГ соответственно). Половое созревание обоих полов у человека инициируется **рилизинг-фактором лютеинизирующего гормона** (РФ-ЛГ), который выделяется гипоталамусом мозга (рис. 19.31). Как и РФ-ТТГ, этот фактор поступает из нейронов гипоталамуса в воронку (infundibulum) гипофиза. Затем РФ-ЛГ транспортируется по кровеносным сосудам гипофиза в его переднюю долю. Оказавшись в передней доле гипофиза, рилизинг-фактор вызывает выделение тропного гормона. У человека РФ-ЛГ высвобождает **лютеинизирующий гормон** (ЛГ) и **фолликулостимулирующий гормон** (ФСГ). Оба этих гормона называются **гонадотропинами**, поскольку они стимулируют развитие семенников у самцов и яичников у самок. В результате этой стимуляции гонады начинают секретировать **половые гормоны** – тестостерон выделяется семенниками, эстроген яичниками. Разнообразные морфологические и поведенческие изменения, сопровождающие половое созревание, как раз и являются следствием действия этих гормонов на различные ткани-мишени. Как и в случае метаморфоза, при половом созревании предполагается наличие гормона, ингибирующего созревание и обусловливающего в результате снижения своей активности реактивацию развития. Вероятным кандидатом на роль такого гормона у человека является мелатонин, концентрация которого в сыворотке крови снижается при повышении концентрации ЛГ (Waldhauser, Dietzel, 1985).

Каким образом происходит инициация полового созревания, остается пока загадкой. Однако Грумбах и др. (Grumbach et al., 1974) предложили следующий механизм такой индукции (рис. 19.32). Перед созреванием у ребенка секретируется небольшое количество РФ-ЛГ, в результате чего уровень циркулирующих ЛГ и ФСГ также очень низок. Поэтому гонады остаются незрелыми и секретируют незначительное количество тестостерона или эстрогена. Кроме того, гипоталамус, в высшей степени чувствительный к по-

[1] Первичные половые признаки – это наличие яичников и семенников. Развитие первичных половых органов подробно обсуждается в гл. 21.

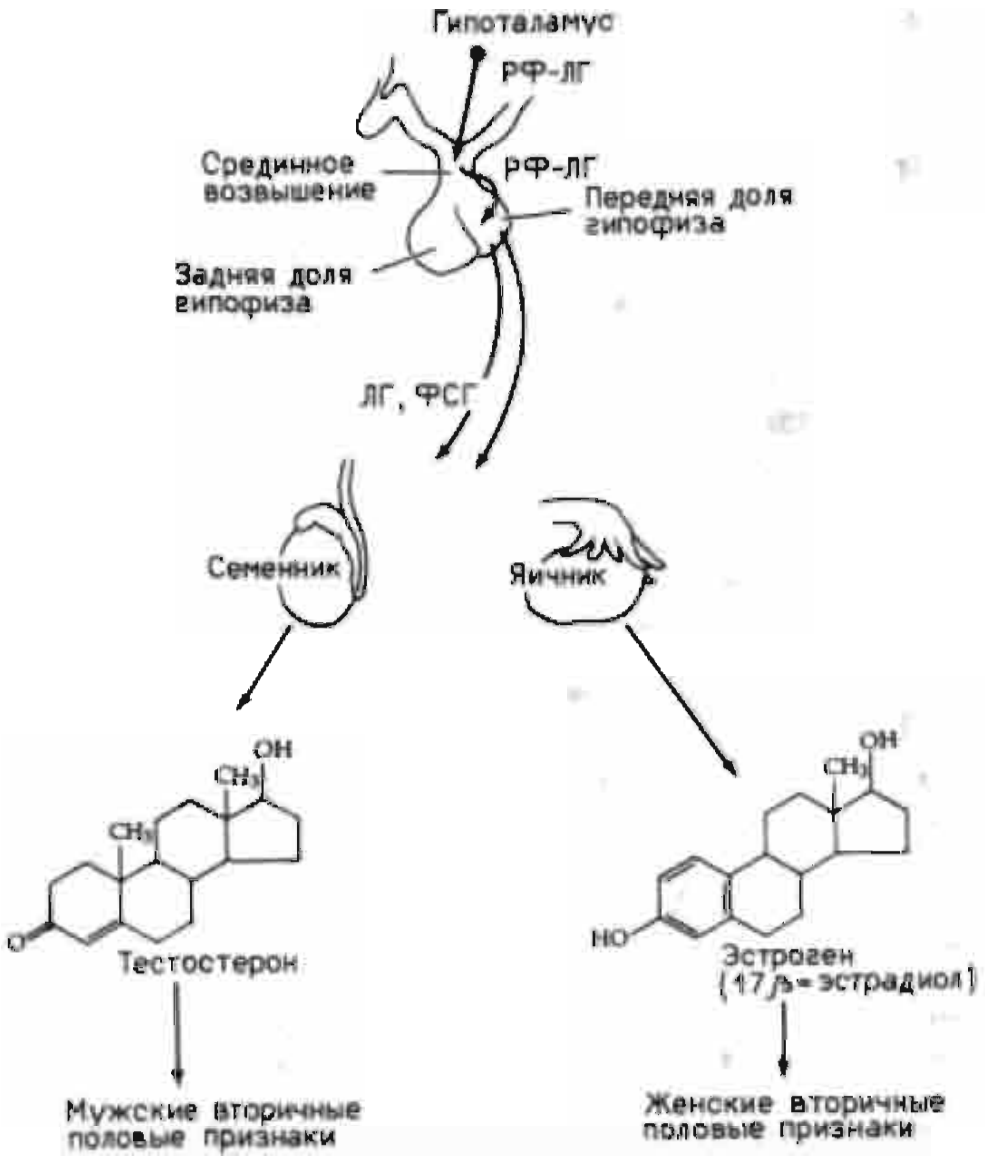


Рис. 19.31. Функционирование системы гипоталамус – гипофиз – гонады при развитии пола у млекопитающих. РФ-ЛГ – рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ФСГ – фолликулостимулирующий гормон.

Уровень половых стероидов	Низкий	Неизмененный	Как у взрослого
Обратная связь	Оперативна и чувствительна	Снижение чувствительности	Оперативна при уровне как у взрослого
Уровень гонадотропинов	Низкий	Повышается	Как у взрослого

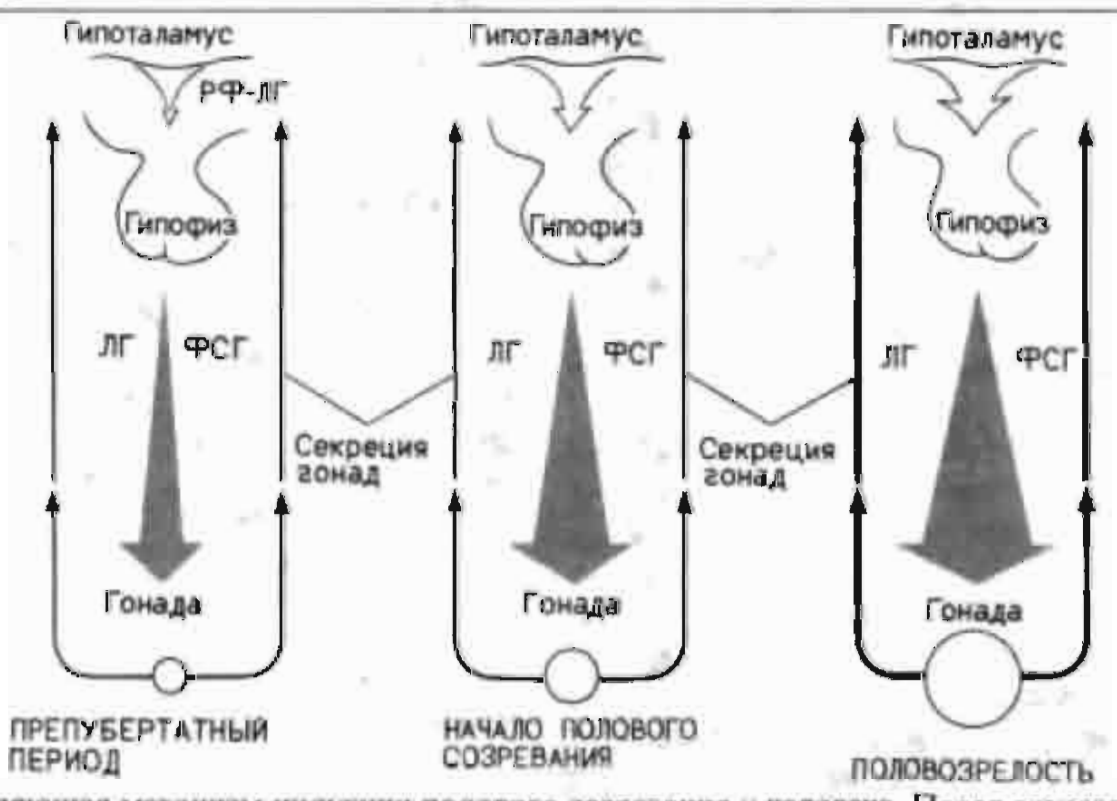


Рис. 19.32. Модель, объясняющая механизм индукции полового созревания у человека. Перед созреванием гипоталамус чувствителен к очень малым концентрациям половых стероидов и блокирует образование РФ-ЛГ, приостанавливая таким образом дальнейший синтез стероидных гормонов. Половые стероиды поддерживаются на низком уровне. По мере того как происходит половое созревание, чувствительность гипоталамуса к половым стероидам постепенно снижается, вследствие чего их синтез растет, пока не достигнет уровня взрослого организма. Относительная ширина стрелок указывает на уровень продукции гормона. (По Grumbach, 1974.)

ловым гормонам, выключает продукцию РФ-ЛГ как только циркулирующие половые гормоны где-либо превысят свой и без того низкий уровень. Полагают, что начало созревания связано с созреванием гипоталамуса. В этот период гипоталамус становится менее чувствительным к отрицательной обратной связи с тестостероном и эстрогеном. В результате для выключения секреции РФ-ЛГ потребуется больше этих гормонов. (Эта ситуация аналогична изменению настройки термостата.) Таким образом, гипоталамус выделяет больше РФ-ЛГ, а это влечет за собой дальнейшую дифференцировку гонад и высвобождение все больших количеств тестостерона и эстрогена. Это в свою очередь вызывает развитие вторичных половых признаков.

Итак, нетрудно убедиться в том, что половое созревание – гормонально контролируемая реактивация развития, приводящая к морфологическим и физиологическим изменениям организма. Как таковая, она имеет много общего с изменениями при метаморфозе, который широко распространен в животном царстве.

Таким образом, мы убедились в том, что диффундирующие вещества играют важную роль как в регуляции межклеточных взаимодействий, так и в регуляции развития. Изучая реактивацию развития в процессе метаморфоза, мы можем определить конкретную роль гормонов в становлении нового характера дифференцировки и морфогенеза. Помимо этого, мы можем проследить взаимодействия между развитием организма и экосистемы, частью которой он является. В следующей главе мы рассмотрим роль диффундирующих факторов в процессах, ответственных за интегрированный рост организма.

ЛИТЕРАТУРА

Alberch P., Alberch J. (1981). Heterochronic mechanisms of morphological diversification and evolutionary change in the neotropical salamander *Bolitoglossa occidentalis* (Amphibia: Plethodontidae), J. Morphol., **167,** 249–264.

Allen B.M. (1916). Extirpation experiments in *Rana pipiens* larva, Science, **44,** 755–757.

Alley K.E., Barnes M.D. (1983). Birthdates of trigeminal motor neurons and metamorphic reorganization of the jaw myoneural system in frogs, J. Comp. Neurol., **218,** 395–405.

Begon M., Harper J.L., Townsend C.R. (1986). Ecology: Individuals, Populations, and Communities, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Bern H.A., Nicoll C.S., Strohman R.C. (1967). Prolactin and tadpole growth, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **126,** 518–521.

Bhaskaran G., Jones G., Jones D. (1980). Neuroendocrine regulation of corpus allatum activity in *Manduca sexta*: Sequential neurohormonal and nervous inhibition in the last instar larva. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77,** 4407–4411.

Bowers W.S., Ohta T., Cleere J.S., Marsella P.A. (1976). Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants, Science, **193,** 542–547.

Brian M.V. (1980). Social control over sex and caste in bees, wasps and ants, Biol. Rev., **55,** 379–415.

Brooks W.K. (1880). The development of the American oyster, Studies Biol. Lab. Johns Hopkins Univ., **1,** 1–81.

Brown P.S., Frye B.E. (1969). Effect of prolactin and growth hormone on growth and metamorphosis of tadpoles of the frog, *Rana pipiens*, Gen. Comp. Endocrinol., **13,** 139–145.

Butenandt A., Karlson P. (1954). Über die Isolierung eines Metamorphosen-Hormons der Insekten in kristallisierter Form, Z. Naturforsch., Teil B **9,** 389–391.

Cameron R.A., Hinegardner R.I. (1974). Initiation of metamorphosis in laboratory-cultured sea urchins, Biol. Bull., **146,** 335–342.

Cohen P.P. (1970). Biochemical differentiation during amphibian metamorphosis, Science, **168,** 533–543.

Cohen P.P., Brucker R.F., Morris S.M. (1978). Cellular and molecular aspects of thyroid-hormone action during amphibian metamorphosis, Horm. Proteins Peptides, **6,** 273–381.

Grew M.D., Spindler S.R. (1986). Thyroid hormone regulation of transfected rat growth hormone promoter, J. Biol. Chem., **261,** 5018–5022.

Currie J., Cowan W.M. (1974). Evidence for the late development of the uncrossed retinothalamic projections in the frog *Rana pipiens*, Brain Res., **71,** 133–139.

De Beer G. (1940). Embryos and Ancestors, Clarendon Press, Oxford.

del Pino E.M., Elinson R.P. (1983). A novel development pattern for frogs: Gastrulation produces an embryonic disk, Nature, **306,** 589–591.

Dürnberger H., Kratochwil K. (1980). Specificity of tissue interaction and origin of mesenchymal cells in the androgen response of the embryonic mammary gland, Cell, **19,** 465–471.

Eberhardt M.K., Ring J.C., Johnson L.K., Latham K.R., Aprilett J.W., Kitsis R.N., Baxter J.D. (1979). Regulation of activity of chromatin receptors for thyroid hormone – possible involvement of histone-like proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76,** 5005–5009.

Elsen A.Z., Gross J. (1965). The role of epithelium and mesenchyme in the production of a collagenolytic enzyme and a hyaluronidase in the anuran tadpole, Dev. Biol., **12,** 408–418.

Elinson R.P. (1987). Change in developmental patterns: Embryos of amphibians with large eggs, In: R.A. Raff and E.C. Raff (eds.), Development as an Evolutionary Process, A.R. Liss, New York, pp. 1–21.

Etkin W. (1968). Hormonal control of amphibian metamorphosis. In: W. Etkin and L.I. Gilbert (eds.), Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology, Appleton-Century-Crofts, New York, pp. 313–348.

Etkin W., Gona A.G. (1967). Antagonism between prolactin and thyroid hormone in amphibian development, J. Exp. Zool., **165,** 249–258.

Fallon J.F., Simandl B.K. (1978). Evidence of a role for cell death in the disappearance of the embryonic human tail, Am. J. Anat., **152,** 111–130.

Forbes G.B. (1975). Puberty: Body composition. In: S.R. Berenson (ed.), Puberty, Stenfert-Kroese, Leiden, pp. 132–145.

Forehand C.J., Farel P.B. (1982). Spinal cord development in anuran larvae. I. Primary and secondary neurons, J. Comp. Neurol., **209,** 386–394.

Fox H. (1973). Ultrastructure of tail degeneration in *Rana temporaria* larva, Folia Morphol., **21,** 103–112.

Frieden E. (1981). The dual role of thyroid hormones in

vertebrate development and calorigenesis. In: L. I. Gilbert and E. Frieden (eds.), Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology, Plenum, New York, pp. 545–564.
Fristrom D., Fristrom J. W. (1975). The mechanisms of evagination of imaginal disks of *Drosophila melanogaster*. 1. General considerations, Dev. Biol., **43,** 1–23.
Fristrom J. W. (1972). The biochemistry of imaginal disc development. In: H. Ursprung and R. Nothiger (eds.), The Biology of Imaginal Discs, Springer-Verlag, Berlin, pp. 109–154.
Fristrom J. W., Fristrom D., Fekete E., Kuniyuki A. H. (1977). The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*, Am. Zool., **17,** 671–684.
Geigy R. (1941). Die metamorphose als Folge gewebsspezifischer determination, Rev. Suisse Zool., **48,** 483–494.
Gilbert L. I., Goodman W. (1981). Chemistry, metabolism, and transport of hormones controlling insect metamorphosis. In: L. I. Gilbert and E. Frieden (eds.), Metamorphosis: A Probleb in Developmental Biology, Plenum, New York, pp. 139–176.
Goos H. J. Th. (1978). Hypophysiotropic centers in the brain of amphibians and fish, Am. Zool., **18,** 401–410.
Gould S. J. (1977). Ontogeny and Phylogeny, Harvard University Press, Cambridge, MA, p. 283.
Graham C. F., Wareing P. F. (1976). The Developmental Biology of Plants and Animals, Saunders, Philadelphia.
Granger N. A., Bollenbacher W. E. (1981). Hormonal control of insect metamorphosis. In: L. I. Gilbert and E. Frieden (eds.), Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology, Plenum, New York, pp. 105–138.
Grant W. C., Jr., Cooper G. (1964). Endocrine control of metamorphic and skin changes in *Diemictylus viridescens*, Am. Zool., **4,** 413–414.
Grant W. C., Grant J. A. (1958). Water drive studies on hypophysectomized efts of *Diemictylus viridescens*, Part I. The role of the lactogenic hormone, Biol. Bull., **114,** 1–9.
Grobstein P. (1987). On beyond neuronal specificity: Problems in going from cells to networks and from networks to behavior. In: P. Shinkman (ed.), Advances in Neural and Behavioral Development, Vol. 3, Ablex, pp. 1–58.
Grumbach M. M., Roth J. C., Kaplan S. L., Kelch R. P. (1974). Hypothalamic-pituitary regulation of puberty in man: Evidence and concepts derived from clinical research. In: M. M. Grumbach, G. D. Grave and F. E. Meyer (eds.), Control of the Onset of Puberty, Wiley, New York, p. 115–166.
Gudernatsch J. F. (1912). Feeding experiments on tadpoles. I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. A contribution to the knowledge of organs with internal secretion, Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org., **35,** 457–483.
Hadfield M. G. (1977). Metamorphosis in marine molluscan larvae: An analysis of stimulus and response. In: R.-C. Chia and M. E. Rice (eds.), Settlement and Metamorphosis of Marine in Vertebrate Larvae, Elsevier, New York, pp. 165–175.
Highsmith R. C. (1982). Induced settlement and metamorphosis of sand dollar (*Dendraster excentricus*) larvae in predator-free sites: Adult sand dollar beds, Ecology, **63,** 329–337.
Hinegardner R. T. (1969). Growth and development of the laboratory cultured sea urchin, Biol. Bull., **137,** 465–475.
Hogg N. A. S., Harrison D. J., Tickle C. (1983). Lumen formation in the mammary gland, J. Embryol. Exp. Morphol., **73,** 39–57.
Hoskins E. R., Hoskins M. M. (1917). On thyroidectomy in amphibia, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **14,** 74–75.
Hoskins S. G., Grobstein P. (1984). Thyroxine induces the ipsilateral retinothalamic projection in *Xenopus laevis*, Nature, **307,** 730–733.
Hoskins S. G., Grobstein P. (1985a). Development of the ipsilateral retinothalamic projection in the frog *Xenopus laevis*. II. Ingrowth of optic nerve fibers and production of ipsilaterally cells, J. Neurosci., **5,** 920–929.
Hoskins S. G., Grobstein P. (1985b). Development of the ipsilateral retinothalamic projection in the frog *Xenopus laevis*. III. The role of thyroxine, J. Neurosci., **5,** 930–940.
Huxley J. (1920). Metamorphosis of axolotl caused by thyroid feeding, Nature, **104,** 436.
Kaltenbach J. C., Fry A. E., Leius V. K. (1979). Histochemical patterns in the tadpole tail during normal and thyroxine-induced metamorphosis. II. Succinic dehydrogenase, Mg- and Ca-adenosine triphosphatases, thiamine pyrophosphatase, and 5′ nucleotidase, Gen. Comp. Endocrinol., **38,** 111–126.
Karp G., Berrill N. J. (1981). Development, McGraw-Hill, New York.
Kistler A., Yoshizato K., Frieden E. (1977). Preferential binding of tri-substituted thyronine analogs by bullfrog tadpole tail fin cytosol, Endocrinology, **100,** 134–137.
Kollros J. J. (1961). Mechanisms of amphibian metamorphosis: Hormones, Am. Zool., **1,** 107–114.
Kratochwil K. (1971). In vitro analysis of the hormonal basis for sexual dimorphism in the embryonic development of the mouse mammary gland, J. Embryol. Exp. Morph., **25,** 141–153.
Kratochwil K., Schwartz P. (1976). Tissue interaction in androgen response of embryonic mammary rudiment of mouse: Identification of target tissue for testosterone, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73,** 4041–4044.
Little G., Atkinson B. G., Frieden E. (1973). Changes in the rates of protein synthesis and degradation in the tail of *Rana catesbeiana* tadpoles during normal metamorphosis, Dev. Biol., **30,** 366–373.
Lyman D. F., White B. A. (1987). Molecular cloning of hepatic mRNAs in *Rana catesbeiana* response to thyroid hormone during induced and spontaneous metamorphosis, J. Biol. Chem., **262,** 5233–5237.
Lynn W. G., Peadon A. M. (1955). The role of the thyroid gland in direct development of the anuran *Eleutherodactylus martinicensis*, Growth, **19,** 263–286.
Madhavan M. M., Schneiderman H. A. (1977). Histological analysis of the dynamics of growth of imaginal dics and histioblast nests during the larval development of *Drosophila melanogaster*, Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol., **183,** 269–305.
Malacinski G. M. (1978). The Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*: Its biology and developmental genetics, and its autonomous cell–lethal genes, Am. Zool., **18,** 195–206.
Martin F. D., Drewry G. E. (1978). Development of Fishes of the Mid-Atlantic Bight, Vol. 6, U. S. Department of the Interior, Washington, DC.
Mathison P. M., Miller L. (1987). Thyroid hormone induction of keratin genes: A two-step activation of gene expression during development, Genes Dev., **1,** 1107–1117.
McCutcheon F. H. (1936). Hemoglobin function during the life history of the bullfrog, J. Cell. Comp. Physiol., **8,** 63–81.
Meeuse B. J. D. (1961). The Story of Pollination, Ronald Press, New York, pp. 161–171.
Mori M., Morris S. M., Jr., Cohen P. P. (1979). Cell-free translation and thyroxine induction of carbamylphosphate synthetase I messenger RNA in tadpole liver, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76,** 3179–3183.
Nijhout H. F., Williams C. M. (1974). Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*: Cessation of juvenile hormone secretion as a trigger for pupation, J. Exp. Biol., **61,** 493–501.
Niki K., Namiki H., Kikuyama S., Yoshizato K. (1982). Epidermal tissue requirement for tadpole tail regression induced by thyroid hormone, Dev. Biol., **94,** 116–120.
Norris D. O., Jones R. E., Criley B. B. (1973). Pituitary prolactin levels in larval, neotenic, and metamorphosed salamanders

(*Ambystoma tigrinum*), Gen. Comp. Endocrinol., **20,** 437–442.
Pehrson J. R., Cohen L. H. (1986). The fate of the small micromeres in sea urchin development, Dev. Biol., **113,** 522–526.
Plowright R. C., Pendrel B. A. (1977). Larval growth in bumblebees, Can. Entomol., **109,** 967–973.
Prahlad K. V., Delanney L. E. (1965). A study of induced metamorphosis in the axolotl, J. Exp. Zool., **160,** 137–146.
Pratt G. E., Jennings R. C., Hammett A. F., Brooks G. T. (1980). Lethal metabolism of precocene-I to a reactive epoxide by locust corpora allata, Nature, **284,** 320–323.
Procter M., Yeo P. (1972). The Pollination of Flowers, Taplinger, New York, pp. 243–251.
Raff R. A. (1987). Constraint, flexibility, and phylogenetic history in the evolution of direct development in sea urchins, Dev. Biol., **119,** 6–19.
Raynaud A. (1961). Morphogenesis of the mammary gland. In: S. K. Kon and A. T. Cowrie (eds.), Milk: The Mammary Gland and Its Secretion, Vol. I, Academic, New York, pp. 3–46.
Richards G. (1978). Sequential gene activity in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. VI. Inhibition by juvenile hormones, Dev. Biol., **66,** 32–42.
Riggs A. F. (1951). The metamorphosis of hemoglobin in the bullfrog, J. Gen. Physiol., **35,** 23–40.
Robinson H., Chaffee S., Galton V. A. (1977). Sensitivity of *Xenopus laevis* tadpole tail tissue to the action of thyroid hormones, Gen. Comp. Endocrinol., **32,** 179–186.
Rountree D. B., Bollenbacher W. E. (1986). The release of the prothoracicotropic hormone in the tobacco hornwormn, *Manduca sexta*, is controlled intrinsically by juvenile hormone, J. Exp. Biol., **120,** 41–58.
Safranek L., Williams C. M. (1984). Critical weights for metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, Biol. Bull., **167,** 555–567.
Schooneveld H. (1979). Precocene-induced collapse and resorption of corpora allata in nymphs of *Locusta migratoria*, Experientia, **35,** 363–364.
Schwind J. L. (1933). Tissue specificity at the time of metamorphosis in frog larvae, J. Exp. Zool., **66,** 1–14.
Smith-Gill S. J., Carver V. (1981). Biochemical characterization of organ differentiation and maturation. In: L. I. Gilbert and E. Frieden (eds.), Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology, Plenum, New York, pp. 491–544.
Strathmann R. R. (1971). The feeding behavior of planktotrophic echinoderm larvae: Mechanisms, regulation and rates of suspension feeding, Exp. Mar. Biol. Ecol., **6,** 109–160.
Strathmann R. R. (1975). Larval feeding in echinodermata, Am. Zool., **15,** 717–730.
Strause L. G., DeLuca M., Case J. F. (1979). Biochemical and morphological change accompanying light organ development in the firefly, *Photuris pennsylvanica*, J. Insect Physiol., **125,** 339–347.
Styne D. M., Grumbach M. M. (1978). Puberty in the male and female: Its physiology and disorders. In: S. S. C. Yen and R. B. Jaffe (eds.). Reproductive Endocrinology, Saunders, Philadelphia, pp. 189–240.
Taigen T. L., Plough F. H., Stewart M. M. (1984). Water balance of terrestrial anuran (*Eleutherodactylus coqui*) eggs: Importance of paternal care, Ecology, **65,** 248–255.
Taurog A., Oliver C., Porter R. L., McKenzie J. C., McKenzie J. M. (1974). The role of TRH in the neoteny of the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*), Gen. Comp. Endocrinol., **24,** 267–279.
Topper Y. J., Freeman C. S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland, Physiol. Rev., **60,** 1049–1106.
Truman J. W., Weeks J., Levine R. B. (1985). Developmental plasticity during the metamorphosis of an insect nervous system. In: M. J. Cohen and F. Strumwasser (eds.), Comparative Neurobiology, Wiley, New York, pp. 25–44.
Turkington R. W. (1968). Hormone-dependent differentiation of mammary gland in vitro, Curr. Top. Dev. Biol., **3,** 199–218.
Turkington R. W., Juergens W. G., Topper Y. J. (1965). Hormone-dependent synthesis of case in vitro, Biochem. Biophys. Acta, **111,** 573–576.
Turner C. D., Bagnara J. T. (1976). General Endocrinology, 6th Ed., Saunders, Philadelphia.
Wald G. (1945). The chemical evolution of vision, Harvey Lect., **41,** 117–160.
Wald G. (1981). Metamorphosis: An overview. In: L. I. Gilbert and E. Frieden (eds.), Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology, Plenum, New York, pp. 1–39.
Waldhauser F., Dietzel M. (1985). Daily and annual rhythms in human melatonin secretion: Role in puberty control, Ann. N. Y. Acad. Sci., **453,** 205–214.
Weber R. (1965). Inhibitory effect of actinomycin D on tail atrophy in *Xenopus laevis* larvae at metamorphosis, Experientia, **21,** 665–666.
Weber R. (1967). Biochemistry of amphibian metamorphosis. In: R. Weber (ed.), The Biochemistry of Animal Development, Vol. 3, Academic, New York, pp. 227–301.
Weinberger C., Thompson C. C., Ong E. S., Lebo R., Gruol D. J., Evans R. M. (1986). The c-*erb*-A gene encodes a thyroid hormone receptor, Nature, **324,** 641–646.
White B. H., Nicoll C. S. (1981). Hormonal control of amphibian metamorphosis, In: L. I. Gilbert and E. Frieden (eds.), Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology, Plenum, New York, pp. 363–396.
Williams C. M. (1952). Physiology of insect diapause. IV. The brain and prothoracic glands as an endocrine system in the *Cecropia* silkworm, Biol. Bull., **103,** 120–138.
Williams C. M. (1956). The juvenile hormone of insects, Nature, **178,** 212–213.

Глава 20
Рост и онкогенез

Завиток папоротника
И пурпурная раковина в море;
Во всем этом звучит музыка.

КЕННЕТ РЕКСРОТ (1952)

Сочетание столь многих видов животных в некой общей схеме, основанной не только на строении их скелета, но также и на организации других частей, где все многообразие видов может быть задано удивительной простотой фундаментального плана – подавлением развития одной части и более детальной проработкой другой, удлинением в данный момент этой части при укорочении иной – дает по крайней мере проблеск надежды на то, что, поняв основы принципиального механизма, без которого невозможна никакая наука о природе, можно добиться каких-либо успехов.

ЭММАНУИЛ КАНТ (1790)

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ РОСТА

Проблемы роста: физические пределы роста

В отличие от новых машин, которые могут бездействовать до тех пор, пока не сойдут со сборочного конвейера, новые организмы обязаны функционировать в процессе своего развития. Клетки зародыша должны поглощать питательные вещества, метаболизировать их и выделять конечные продукты обмена в течение всего периода своего развития. Необходимость этих процессов накладывает строгие ограничения на характер роста животного. Увеличение размеров достигается не просто, поскольку рост может включать изменения, несовместимые с жизнью. Рост животных представляет собой некий компромисс между увеличивающимися размерами и потребностями всех клеток в кислороде и питательных веществах.

Одно из основных ограничений роста – это отношение поверхности к объему. Если животное становится крупнее, но при этом сохраняет старую форму, то площадь его поверхности (имеющая большое значение для поглощения кислорода и питательных веществ) уменьшается по отношению к его новому объему. Происходит это потому, что площадь изменяется пропорционально длине во второй степени (L^2), тогда как объем – пропорционально длине в третьей степени (L^3). Представим себе гипотетическое животное, радиус которого составляет 4 единицы; площадь поверхности этого животного будет равна 200 кв. ед. ($4\pi r^2$), а объем – 268 куб. ед. ($^4/_3\pi r^3$). Отношение поверхности к объему составит 0,74. Если длина этого животного удвоится и его радиус увеличится до 8 ед., то новая площадь поверхности будет равна 804 кв. ед., а объем – 2143 куб. ед. Новое отношение поверхности к объему будет равно 0,37, т. е. в два раза меньше прежнего. Еще одно удвоение размеров вновь уменьшит наполовину отношение поверхности к объему. Таким образом, перед нами фундаментальный закон, которому подчиняются все растущие организмы: если размеры животного увеличиваются в два раза, то отношение площади его поверхности к объему уменьшается тоже в два раза.

Иначе говоря, отношение площадь : объем означает, что при увеличении размеров тела и сохранении той же формы объем растет быстрее, чем площадь поверхности. Для любого организма (в

том числе и развивающегося зародыша) обеспечение пищей и кислородом зависит от диффузии через адсорбирующие поверхности. По закону диффузии Фика поток данного вещества в некую емкость (например, в клетку) прямо пропорционален площади контакта с этим веществом. Каким же образом происходит рост организма? Одно из стратегических решений заключается в том, чтобы стать более широким или плоским; это позволяет увеличить площадь контакта с кислородом и питательными веществами и сократить для поступающих веществ путь от поверхности в глубь тела. Такая стратегия используется плоскими червями, которые (в случае ленточных червей) могут вырастать в длину до 12 м, но высота которых не превышает нескольких миллиметров. Другое стратегическое решение сводится к формированию тела в виде полой трубки, что также позволяет клеткам контактировать с питательными веществами. Эта стратегия используется многими кишечнополостными, например коралловыми полипами.

Наиболее удачной стратегией, позволяющей обойти рассматриваемую нами проблему, оказалась инвагинация. Легкие и кишечник представляют собой инвагинировавшие области наружной поверхности, которые, впячиваясь, разветвляются или образуют изгибы, обеспечивающие большую площадь для поглощения кислорода и питательных веществ. Эта модификация формы организма часто сопровождается использованием другого стратегического подхода – внутренней циркуляции. В этом случае питательные вещества попадают внутрь тела, в результате чего диффузия в большей степени происходит изнутри организма, а не снаружи. Этот процесс сопровождается развитием кровеносной системы. Но и в развитии кровеносной системы возникают проблемы, связанные с размерами. В соответствии с законами движения жидкости наиболее эффективно осуществляется транспорт через трубки большого диаметра. По мере уменьшения радиуса кровеносного сосуда сопротивление току жидкости в нем возрастает как r^{-4} (закон Пуазейля). Иначе говоря, если один из двух сосудов имеет в два раза меньший диаметр, то сопротивление току жидкости в этом сосуде будет в 16 раз больше, чем в другом. И тут возникает парадоксальная ситуация. Если условием, благоприятствующим диффузии, является уменьшение диаметра сосудов, то законы гидравлики требуют их расширения. Живые организмы решают это противоречие путем развития системы кровообращения, характеризующейся иерархией кровеносных сосудов (LaBarbera, 1990). Эта иерархия возникает на ранних этапах эмбриогенеза, например у куриного зародыша она наблюдается в возрасте 3 сут. У собак в крупных сосудах (в аорте или полой вене) кровь течет в 100 раз быстрее, нежели в капиллярах. Благодаря наличию крупных сосудов, специализированных для транспорта, и мелких, специализированных для диффузии (где кровь задерживается на наиболее длительное время), питательные вещества и кислород достигают отдельных клеток растущего организма.

Но это еще не все. Если жидкость, находящаяся под давлением, из трубки большего диаметра попадает прямо в трубку меньшего диаметра (как в наконечнике брандспойта), то ее скорость резко возрастает. Решением этой проблемы стало возникновение многочисленных сосудов меньшего диаметра, на которые распадается больший сосуд, в результате чего общая площадь поперечного сечения мелких сосудов оказывается больше площади крупного. Это отношение (известное как закон Муррея) выражается в том, что третья степень радиуса исходного сосуда примерно равна сумме третьих степеней радиусов меньших сосудов. Приведенный пример свидетельствует о том, как физические свойства материи ограничивают пути эволюции животных. Если животное не имеет системы кровообращения, то оно должно стать либо плоским, либо трубчатым. В случае развития кровеносной системы ее строение определяется законами гидравлики, в соответствии с которыми сосуды различного диаметра распределяются в виде ответвлений. Вместе с тем невозможно представить себе существование цилиндра протоплазмы длиной 1,5 м и диаметром 10 см, в который постепенно сливались бы части тела человека или медведя. Это противоречило бы законам диффузии. Зародыши губок, кишечнополостных и плоских червей развиваются в организмы, жизнедеятельность которых обеспечивается только диффузией материала из окружающей среды. Более специализированные животные приобрели способы доставки пищи и кислорода внутрь тела, избежав тем самым ограничений в росте, которые накладывает простая диффузия.

При развитии животных возникают и другие препятствия, связанные с увеличением размеров тела. Способность кости служить опорой для тяжелой конструкции пропорциональна площади ее поперечного сечения (L^2). Вес, однако, возрастает пропорционально объему организма (L^3). Поэтому животное, выросшее в два раза по сравнению с первоначальными размерами, должно иметь конечности, способные выдержать вес, увеличившийся в 8 раз. Если же оно вырастет в 4 раза, то на его конечности будет приходиться вес, в 64 раза превышающий первоначальный, и если форма костей при этом не изменится, то их дефинитивный скелет не сможет служить опорой для растущего тела. Впервые на это обратил внимание Галилей в своих «Трактатах» (которые он писал во время домашнего ареста в 1638 г.). Он усомнился в том, что кости крупных

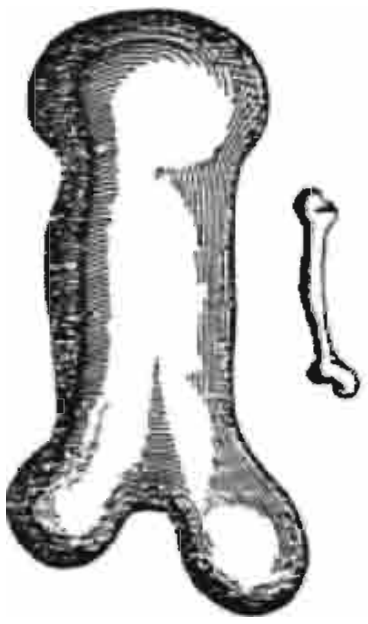


Рис. 20.1. Рисунок Галилея, изображающий одну и ту же кость (бедро) от животных различных размеров. При том, что длина костей различается примерно в 2,5 раза, их ширина различается примерно в 10 раз.

животных должны утолщаться относительно своей длины так же, как кости более мелких животных (рис. 20.1). Если бы кости крупных животных формировались в соответствии с тем же самым отношением высоты к их диаметру, что и кости мелких животных (**изометрический рост**), то они не смогли бы выдержать увеличивающегося веса. Поэтому по мере роста организма это отношение должно уменьшаться. Такой рост, характеризующийся дифференциальной скоростью (т. е. когда площадь поперечного сечения кости растет быстрее, чем высота животного), называется **аллометрическим ростом.**

В процессе роста все структуры животного – всасывающие поверхности, кровеносная система и скелет – подвергаются интенсивной перестройке. Дж. Б. Холдейн был совершенно прав, когда писал, что «сравнительная анатомия – это в большой степени история борьбы за увеличение поверхности по отношению к объему».

Изометрический рост

Закон линейного роста Брукса

Рост большинства организмов происходит путем включения нового материала в существующие ткани тела. При этом организм увеличивает свой объем, сохраняя те же пропорции. Основываясь на рассуждениях, изложенных выше, можно заключить, что теоретически животное, увеличившее свой вес вдвое, увеличит длину всего лишь в 1,26 раза (поскольку $1{,}26^3 = 2$). Рост с подобной скоростью часто наблюдается в природе. Брукс отмечал (Brooks, 1886), что длина некоторых глубоководных членистоногих, собранных экспедицией «Челленджера», увеличивалась между двумя последующими линьками примерно в 1,25 раза. В 1904 г. Пржибрам (Przibram, 1904) и его коллеги провели исследование на богомолах. Вылупляющихся в лаборатории богомолов взвешивали после каждой линьки. Было обнаружено, что вес каждой особи в промежутке между двумя линьками удваивался. Сброшенный экзоскелет также собирали. При сравнении длины определенного сегмента (например, голени) оказалось, что коэффициент увеличения размеров между линьками равен 1,26. Даже гексагональные фасетки глаза насекомых (которые увеличиваются без размножения клеток) изменяют свой диаметр между линьками в 1,26 раза. Другие линяющие членистоногие, например крабы, омары, сверчки и вши, также подчиняются этому правилу (известному под названием закона Брукса), согласно которому увеличение веса в два раза сопровождается возрастанием длины в 1,26 раза.

Следовательно, если длина растущего организма увеличивается в два раза при сохранении его формы неизменной, то объем организма (вес) увеличивается в восемь раз. Эти расчеты применимы не только к кубам, но и к любым другим фигурам. В соответствии с указанным отношением зародыш (или любой растущий организм) удваивает свой вес, вырастая от 10 до 12,5 см. Наблюдения, проведенные над растущими организмами, подтверждаются математическим анализом роста.

Логарифмическая спираль

Рост животного в ограниченном пространстве, например в раковине, в простейшем случае представляет собой расширение и удлинение в одном и том же отношении в течение всей жизни этого животного. В результате такого роста формируется либо конус, либо логарифмическая спираль. По определению Томпсона (Thompson, 1942), такой спиралью является «любая кривая, исходящая из фиксированной точки ... таким образом, что отрезки ее дуги, расположенные между двумя любыми радиусами под данным углом друг к другу, всегда подобны». Иллюстрацией служат рис. 20.2 и 20.3. Логарифмическая спираль может увеличиваться сколь угодно долго, но при этом она никогда не изменит своей формы. Небольшая логарифмическая спираль имеет те же пропорции, что и большая, если сохраняется первоначальный угол. Уравнение для такой спирали имеет вид $r = a^{\theta}$.

Подобный тип роста характерен для животных, способных расти лишь с одного конца. Примером могут служить раковины, рога и когти. (Ногти у человека загибаются, если вырастут слишком длинными; передние зубы грызунов могли бы задушить животное, заворачиваясь назад, если бы не

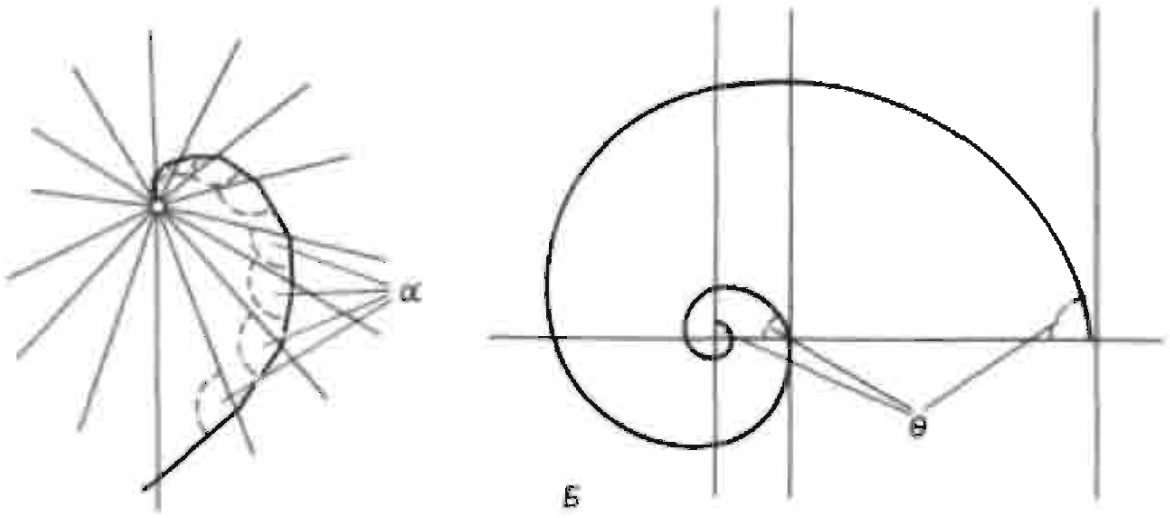


Рис. 20.2. Логарифмическая спираль. *А*. Логарифмическая спираль, образованная линией, пересекающей равномерно расположенные радиусы под одним и тем же углом α. *Б*. Декартов анализ логарифмической спирали, показывающий, что если растущая кривая пересекает радиус-вектор под одинаковым углом θ, то эта кривая может расти постоянно, не меняя своей формы. (По Thompson, 1942.)

снашивались от постоянного жевания.) По выражению Томпсона, «эта удивительная способность увеличения размеров путем *терминального* роста при сохранении формы всей фигуры неизменной характеризует только логарифмическую спираль и больше ни одну математическую кривую». Логарифмическая спираль чаще всего встречается в форме уплощенных раковин наутилоидных моллюсков, например у многокамерного наутилуса, поперечный срез раковины которого представлен на рис. 20.3. По мере роста наутилус строит у устья раковины новую камеру, куда затем перемещается. Эта последняя камера служит моллюску жилищем, а старые, наполненные газом, обеспечивают плавучесть и подвижность животного. Остатки старых камер можно выявить по наличию септ (перегородок); эти септы отличают раковины наутилусов от раковин других моллюсков.



Рис. 20.3. Характер роста логарифмической спирали. Раковина наутилуса и бараний рог иллюстрируют рост логарифмической спирали. Раковина наутилуса (*вверху*) представлена в виде поперечного среза. Рост спирали бараньего рога происходит в двух плоскостях. Основание этих объектов представляет собой треугольник, ни одна из трех сторон которого не растет с одинаковой скоростью. В результате рог растет одновременно назад и наружу, при этом каждое его кольцо отражает продолжительность роста.

Многие раковины имеют форму не спиралей, а просто куполов, или колпачков. Томпсон показал, что на самом деле эти раковины представляют собой части логарифмических спиралей, у которых углы претерпели поворот на 360°. В раковинах, подобных раковине наутилуса, можно измерить угол, под которым кривая роста пересекает радиусы. У большинства наутилоидов и брюхоногих этот угол составляет 80–85°. (Угол в 90° даст круг, и животное не сможет расти.) Угол многокамерных наутилусов обычно равен 80°. Томпсон вывел формулу для расчета отношения ширины одного витка раковины к ширине другого [1]. Некоторые величины, вычисленные по этой формуле, представлены в табл. 20.1. Воспользовавшись этой таблицей, можно, например, установить, что при ширине витка 2,54 см в данной точке радиуса и при угле 80° ширина следующего витка на этом же радиусе будет составлять 7,62 см. А если бы указанный угол составил 60°, то следующий виток на том же радиусе должен быть шириной 91,44 см, и соответственно при угле 17° расстояние, на котором произошел бы следующий виток, должно быть равно 24135 км. Подобного рода кривые, образованные при низких углах и соответствующие отрезкам логарифмических спиралей, характеризуют некоторые раковины (преимущественно раковины двустворчатых моллюсков) и весьма обычны в случае зубов и когтей.

[1] Формула имеет вид: $r = e^{2\pi \cot \theta}$ (Thompson, 1942).

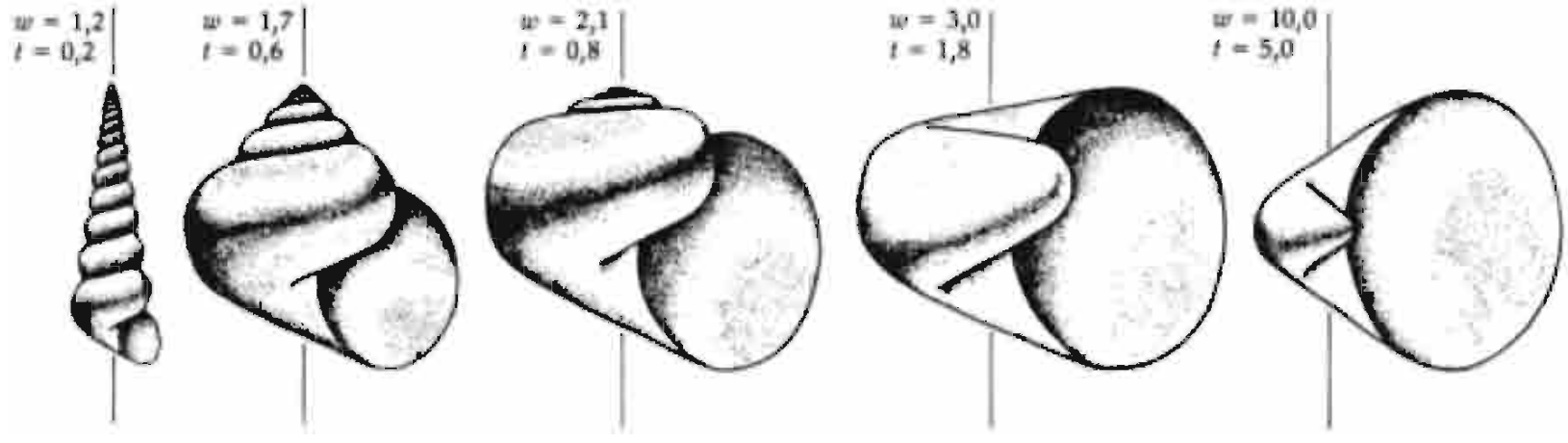


Рис. 20.4. Модели раковин гипотетических моллюсков, полученные с помощью компьютера. В этом ряду форм варьируют только два из четырех параметров – степень увеличения кривой (w) и степень ее смещения (t). (Из Raup, 1962.)

Таблица 20.1. Постоянный угол логарифмической спирали определяет отношение ширины соседних витков

Постоянный угол	Отношение ширины витков[1]
90°	1,0
89°8′	1,1
86°18′	1,5
83°42′	2,0
80°5′	3,0
75°38′	5,0
69°53′	10,0
64°31′	20
58°5′	50
53°46′	10^2
42°17′	10^3
34°19′	10^4
28°37′	10^5
24°28′	10^6

Из Thompson, 1942.

[1] Отношение ширины есть результат деления ширины одного витка на ширину следующего, более широкого витка.

Анализ компьютерных кривых (Raup, 1962, 1966) показал, что рост более сложно устроенных раковин, встречающихся среди гастропод и пелеципод, может быть описан с помощью четырех параметров:

- w – степень расширения витков, описанная выше;
- t – степень продвижения витков вдоль оси y; этот параметр служит показателем роста раковины в высоту по мере того, как кривая совершает спиралеобразные обороты;
- s – форма растущей кривой; этот параметр отражает контур растущего края раковины и представляет поперечное сечение полой трубки;
- d – положение кривой относительно ее оси; этот показатель в большой степени является функцией угла, при котором происходит рост кривой.

В целом форма спирали определяется параметрами[1] w и t. На рис. 20.4 представлены пять гипотетических раковин, полученных на основе компьютерных поперечных сечений. Изменялись только параметры w и t. Этот пример ясно свидетельствует о том, что путем изменения всего лишь одного параметра из упомянутых двух можно получить совершенно различные формы раковины моллюсков. На этом основании может быть установлено родство между различными типами раковин. На рис. 20.5 показано, каким образом от раковины гипотетической улитки можно вывести типы раковин, характеризующие различные группы моллюсков. В качестве исходной формы здесь взята раковина, встречающаяся в разнообразных таксономических группах. Если идти по пути смещения ее витка (от $t = 0$ до $t = 3$), то можно получить формы, характерные для обычных улиток. Вместе с тем, изменяя степень расширения витка от $w = 3{,}5$ до $w = 10^4$, можно сделать переход от однораковинных брюхоногих моллюсков к двустворчатым формам, обычным для гребешков и песчаных ракушек, а увеличив расстояние от оси закручивания до кривой (от $d = 0$ до $d = 0{,}3$), можно получить раковины более вытянутой формы.

В приведенных выше рассуждениях подразумевалось, что рост раковины остается постоянным в течение всей жизни животного. Однако это не так. У некоторых моллюсков происходят внезапные изменения скорости роста, часто коррелированные с изменением образа жизни животного (например, с переходом от планктонного, свободноплавающего

[1] Если r^0 – первоначальное расстояние точки A от оси, то r_θ – расстояние после θ оборотов – можно вычислить по формуле $r_\theta = r_0 w^{\theta/2\pi}$. Очевидно, что это значение зависит как от угла, под которым происходит расширение витка (w), так и от отношения расширения витка по оси x к его смещению по оси $y(t)$. В раковинах наутилоидов $t = 0$, тогда как в случае раковин гастропод и пелеципод в этом уравнении приобретает важное значение и параметр t. Отсюда $y_\theta = y_0 w^{\theta/2\pi} + rt(w^{\theta/2\pi} - 1)$.

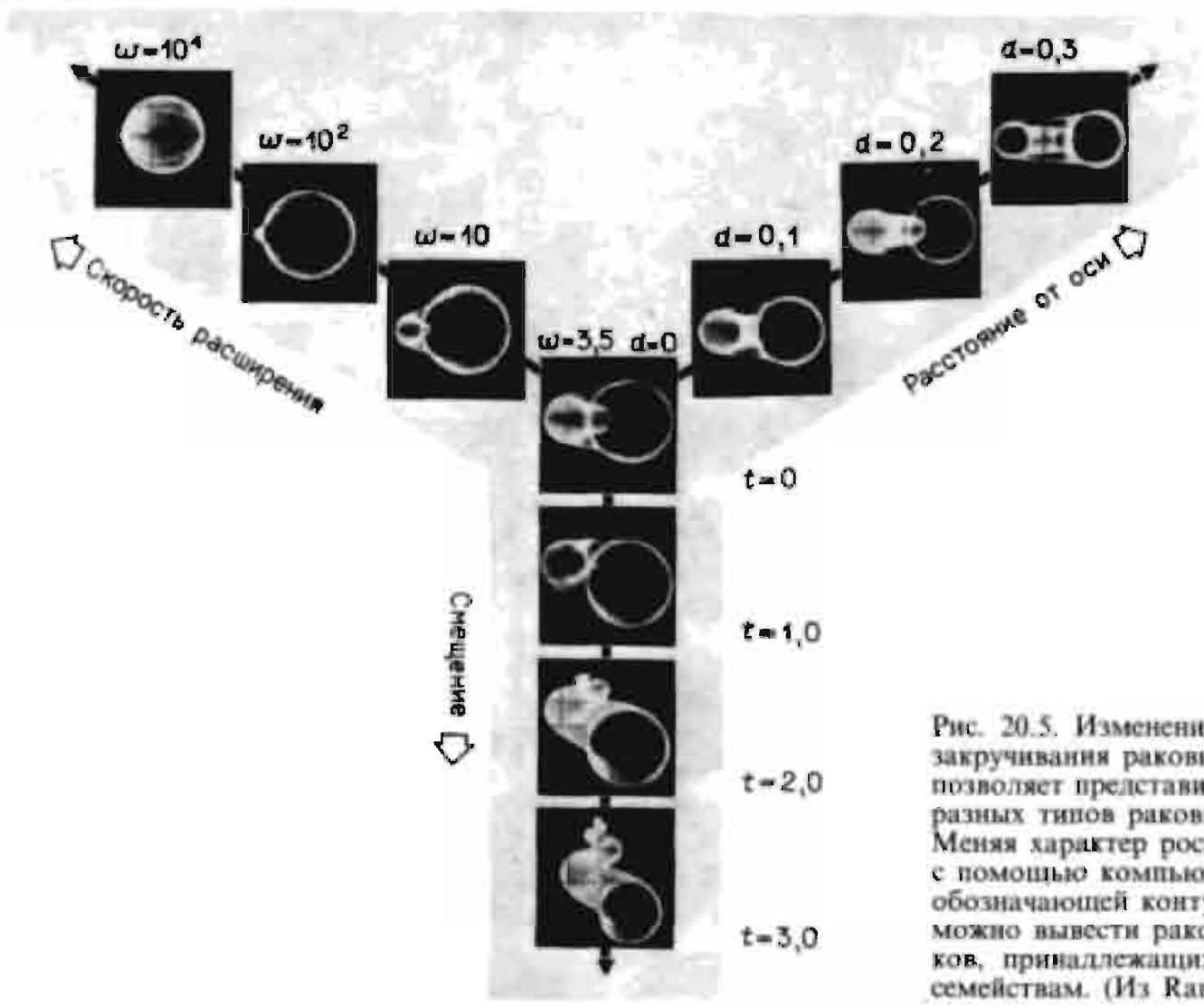


Рис. 20.5. Изменение параметров закручивания раковины у улитки позволяет представить образование разных типов раковин моллюсков. Меняя характер роста полученной с помощью компьютера кривой, обозначающей контур раковины, можно вывести раковины моллюсков, принадлежащих к разным семействам. (Из Raup, 1966.)

существования к донному, роющему образу жизни). В других случаях эти изменения более постепенны и позволяют улитке по мере развития изменить свое строение. Примером может служить червеобразная улитка, изображенная на рис. 20.6. Дифференциальная скорость роста, по-видимому, имеет адаптивное значение, поскольку по мере роста организм может оказаться в иных условиях обитания (Randall, 1964).

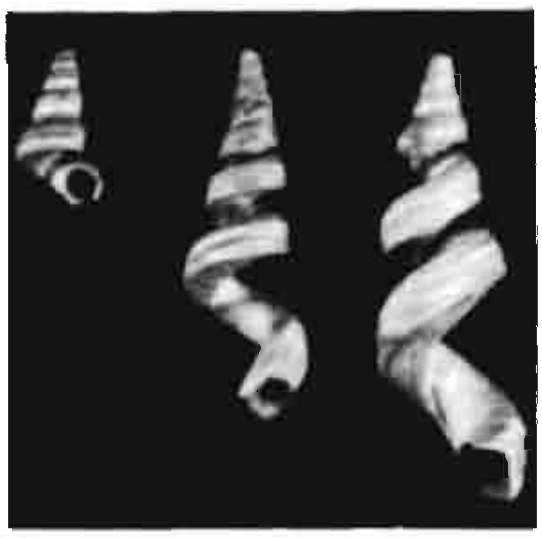


Рис. 20.6. Изменение параметров роста в течение жизни организма. В раковинах этих червеобразных брюхоногих моллюсков смещение витка раковины относительно его оси изменяется по мере развития животного.

Вариабельность параметров роста дает возможность моллюскам приспосабливаться к широкому разнообразию условий. В самом деле, близкородственные группы могут иметь раковины, поразительно различающиеся по своей морфологии. Эта пластичность затрудняет попытки классифицировать моллюсков, но она же свидетельствует о том, какую важную роль играет характер роста для эволюционных изменений.

Аллометрический рост

Росту многих организмов однообразие не свойственно. Так, очевидно, что в определенные периоды жизни скорость роста увеличивается по сравнению с другими периодами. У человека скорость роста в течение первых десяти лет жизни значительно выше, чем за десять лет после окончания колледжа. Кроме того, не все части организма растут с одинаковой скоростью. Явление дифференциального роста частей организма называется **аллометрией.** Аллометрический рост у человека представлен на рис. 20.7. Руки и ноги растут у нас с большей скоростью, чем голова и туловище, вследствие чего пропорции тела взрослого очень отличаются от пропорций тела ребенка.

Джулиан Хаксли (Huxley, 1932) сравнивал ал-

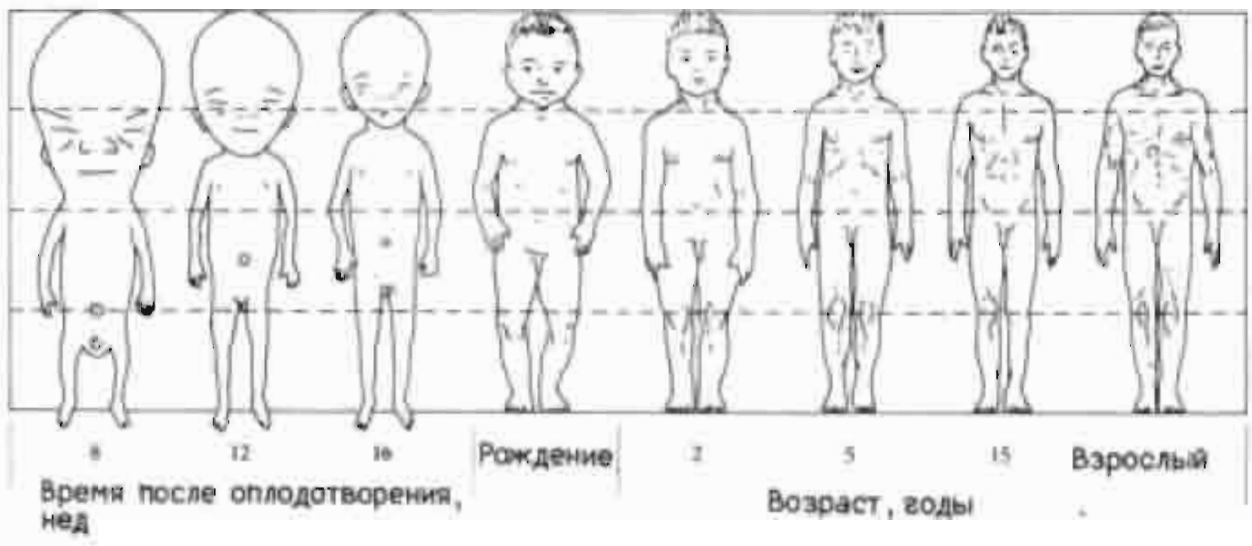


Рис. 20.7. Аллометрия у человека. У эмбриона формируется необыкновенно крупная по сравнению с телом голова. Когда эмбриональный период закончится, голова начинает расти значительно медленнее, чем туловище, руки и ноги. Аллометрия у человека впервые была отражена в западном искусстве эпохи Возрождения. До тех пор детей изображали в виде маленьких взрослых. (По Moore, 1983, а также Purves, Orians, 1985.)

лометрию с помещением в банк денег под различные проценты. Формула аллометрического роста (или для денежных сумм, помещенных в банк на разных условиях) может быть представлена так: $y = bx^{a/c}$, где a и c – скорости роста двух частей тела, а b служит значением для y при $x = 1$. Если $a/c > 1$, то часть тела, представленная a, растет быстрее, чем часть тела, представленная c. Пользуясь логарифмами (что проще представить графически), то же самое уравнение можно изобразить так: $\log y = \log b + (a/c) \log x$.

Один из самых ярких примеров аллометрического роста демонстрирует самец манящего краба *Uca pugnax*. У маленького краба-самца первая пара ног снабжена небольшими коготками-клешнями, каждая из которых составляет около 8% от общей массы краба. По мере роста краба одна клешня начинает увеличиваться с большей скоростью, чем остальное тело, и в конце концов достигает 38% его массы (рис. 20.8, табл. 20.2). Если эти данные отложить в логарифмическом масштабе (массу тела на оси x, массу клешни на оси y), то получается прямая линия, наклон которой будет выражать отношение $a:c$. У самца *Uca pugnax* (получившего свое имя – «воинственный» – из-за громадной клешни) это отношение равно 6:1. Оно означает, что масса клешни возрастает в шесть раз быстрее, чем масса остального тела. У самок этого вида масса клешни продолжает составлять 8% массы тела в течение всего периода роста. Аллометрический рост свойствен лишь самцам, у которых клешня служит для защиты и угрозы.

Еще один важный пример аллометрического роста дают нам общественные насекомые. В колониях муравьев (как и в колониях пчел и ос) сообщество состоит почти исключительно из самок, и его структура основана на морфологических различиях между членами-самками. Сложные сообщества муравьев включают несколько морфологически различающихся типов стерильных рабочих самок и фертильную «матку», выполняющую репродуктивную функцию. Крупные рабочие муравьи («солдаты») отличаются большими размерами, широкой головой и большими нижними челюстями. Рабочие муравьи меньших размеров характеризуются хорошо развитыми ногами. Особей любого вида, относящихся к рабочим группам и различающихся по форме и размерам, можно расположить на одной аллометрической кривой (Huxley, 1932; Wilson, 1953). Это соотношение представлено на рис. 20.9.

Регулятором роста (а следовательно, и фактором детерминации социальной касты) служит юве-

Таблица 20.2. Относительная сухая масса большой клешни и тела у манящего краба (*Uca pugnax*)

Масса тела без клешни, мг	Масса клешни, мг	Отношение массы клешни к общей массе тела, %
58	5	8,6
80	9	11,2
200	38	19,0
300	78	26,0
420	135	32,1
536	196	36,6
618	243	39,3
743	319	42,9
872	418	47,9
1080	537	49,7
1212	617	50,9
1363	699	51,3
1449	773	53,7
1808	1009	55,8
2233	1380	61,7

Из Huxley, 1932.



Рис. 20.8. Экземпляры манящего краба *Uca pugnax*. Аллометрический рост претерпевает лишь одна из клешней самца. У самок (не показано) обе клешни характеризуются изометрическим ростом.

нильный гормон. Известно, что именно ювенильный гормон играет важную роль в определении самки, которая в колониях муравьев и пчел станет маткой. Показано также (Wheeler, Nijhout, 1981), что тот же самый гормон определит, разовьется ли из личинки «солдат» или малая рабочая особь. Личинка рабочего муравья *Pheidole bicarinata* от вылупления до метаморфоза претерпевает три личиночные линьки. Последняя третья линька наступает у личинок, достигающих в длину 0,6 мм. У большинства таких личинок линька, после которой наступает окукливание, происходит по достижении ими длины 1,3 мм. Их метаморфоз завершается образованием малых рабочих особей. Однако небольшая часть личинок третьего возраста находится на более питательной диете. Эти личинки в течение 15 сут после своей последней линьки не приступают к метаморфозу, увеличиваясь в размерах до 1,8 мм. Им предстоит стать солдатами. Воздействуя на личинок аналогами ювенильного гормона прежде, чем они достигнут в длину 1,3 мм, удалось искусственно увеличить продолжительность третьей возрастной стадии. После воздействия гормоном личинки продолжали расти, а затем превращались в солдат. Из этого был сделан вывод, что диета, богатая питательными веществами, повышает у личинок солдат уровень ювенильного гормона, и линька, ведущая к куколке, не происходит, пока ювенильный гормон не будет выведен из личиночной кровеносной системы. У личинок, получающих усиленное питание, для этого потребуется более 6 сут, в течение которых личинки будут продолжать расти. При метаморфозе таких личинок в результате аллометрического роста формируются мощные челюсти, характерные для рабочих особей-солдат.

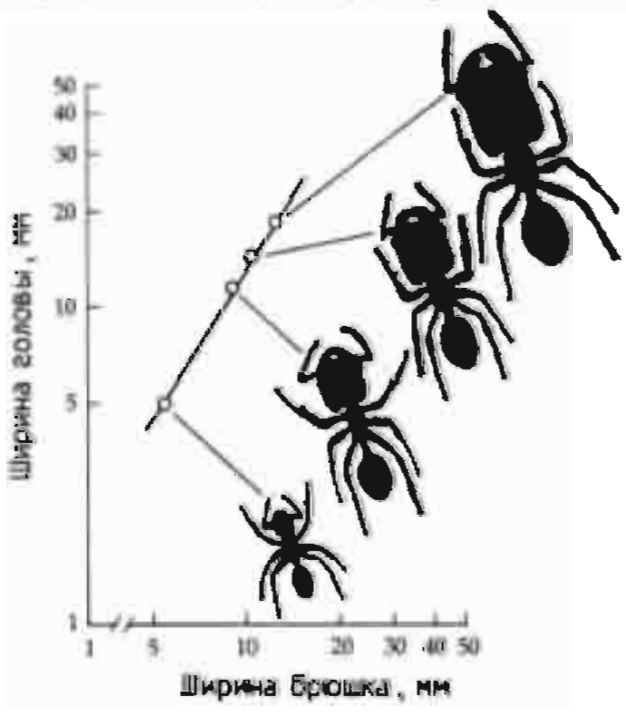


Рис. 20.9. Аллометрическое соотношение между размерами головы и туловища у муравья *Pheidole instabilis*. Обратите внимание, что величины по осям графика отложены в логарифмическом масштабе. (По Raff, Kaufman, 1983.)

Аллометрический рост наблюдается также у высших животных. У павианов скорость роста челюстей и других лицевых структур почти в 4,25 раза превышает скорость роста черепа (рис. 20.10). Более выступающее вперед лицо павиана-самца – это просто следствие того, что он крупнее самки. Сход-



Рис. 20.10. Аллометрический рост головы павиана. Черепа особей разного возраста свидетельствуют о необычайном увеличении лицевых структур по сравнению с мозговой коробкой. (По Huxley, 1932.)



Рис. 20.11. Положительная аллометрия рогов по отношению к черепу у *Megalocerus giganteus*. Скелет «ирландского оленя» (рядом для сравнения стоит человек). Гоулд считает, что, судя по положению этих рогов, они выполняли скорее декоративную функцию, а не служили для защиты или нападения. (Из Gould, 1974.)

ный пример аллометрии демонстрируют ископаемые остатки самого величественного из оленей, *Megalocerus giganteus*, так называемого ирландского оленя. Этот гигантский олень имел в высоту более 3 м (рис. 20.11); он обитал в Европе до похолодания климата, около 11 000 лет тому назад. Гоулд (Gould, 1974), проанализировав 74 ископаемых черепа и рогов (простиравшихся почти на 3,5 м) этого вида, выявил положительную аллометрию для рогов, которые росли в 2,5 раза быстрее, чем череп.

Дополнительные сведения и гипотезы

Эволюция и аллометрия

Аллометрия внутри вида служит источником изменений, которые могут быть отвергнуты или приняты эволюцией. Дифференциальный рост у муравьев позволил некоторым видам приобрести высокоспециализированные касты рабочих особей. Положительная аллометрия челюстей у *Cataglyphis bombyana* дала начало касте напоминающих солдат рабочих, чьи огромные челюсти могут переносить крупные песчинки при строительстве гнезда. Муравьи некоторых видов используют солдат с их огромными головами для закупоривания входа в муравейник при нападении на колонию (Wilson, 1953).

Кроме аллометрии, проявляющейся в процессе развития особей данного вида, существует также аллометрия среди взрослых представителей близкородственных видов (Gould, 1966; Alberch et al., 1979). На рис. 20.12 представлены аллометрические соотношения массы мозга и массы тела у пяти родственных видов мадагаскарских насекомоядных. Можно убедиться в том, что межвидовая аллометрия выражена в значительно большей степени, чем аллометрия в пределах отдельных видов. Действительно, отношение $a:c$ у всех видов одинаково. Различия касаются члена b упомянутого уравнения. Если межвидовое отношение $a:c$ равно 1,0, то это означает, что виды, характеризующиеся большими размерами, являются увеличенными вариантами своих более мелких родичей (или предков). Иными словами, крупные потомки более мелких предковых

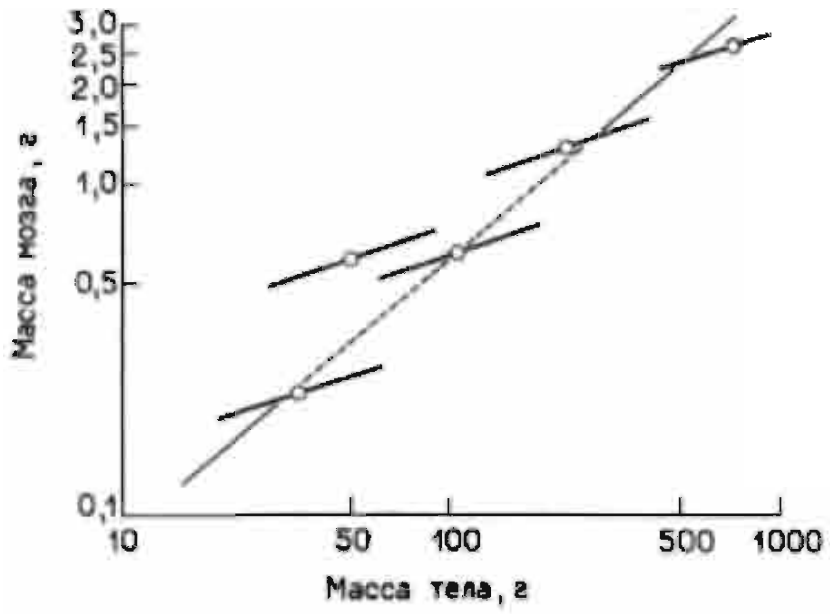


Рис. 20.12. Меж- и внутривидовая аллометрия массы тела и мозга у насекомоядных млекопитающих Мадагаскара. Онтогенетические аллометрии (в пределах развития единичного организма) показаны сплошными линиями. Филогенетическая аллометрия (между родственными видами) обозначена прерывистыми линиями. (По Gould, 1971.)

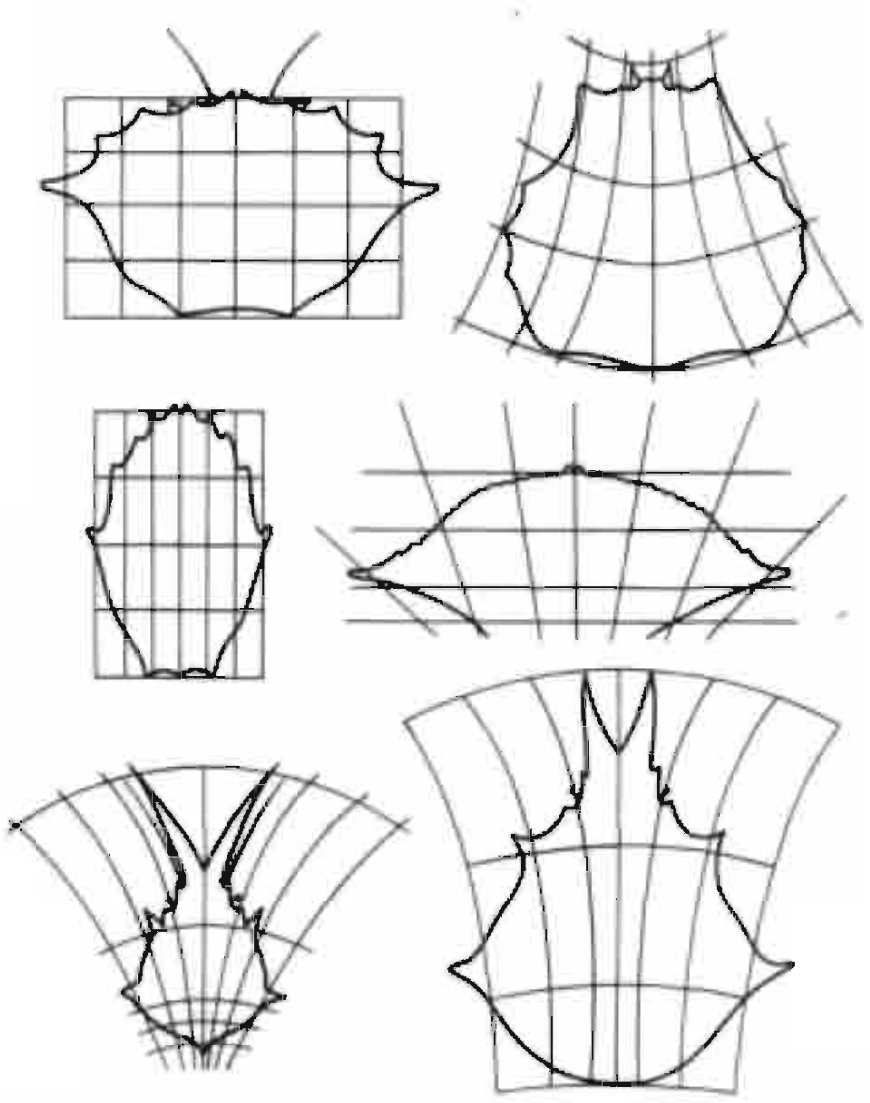


Рис. 20.13. Трансформация формы карапаксов краба путем изменения системы координат, на которой они изображены. Представлены карапаксы различных видов крабов; все эти формы могут быть получены путем изменения декартовой системы координат. (Из Thompson, 1942.)

форм могли возникнуть путем перехода к аллометрическому росту более крупного зачатка (Gould, 1971).

Из приведенного выше обсуждения аллометрии у павианов можно заключить, что «нормальное» человеческое лицо представляет собой результат замедленного роста лица приматов при сохранении формы, свойственной плоду человекообразных обезьян. Через несколько лет после того как Джулиан Хаксли опубликовал свои «Проблемы относительного роста», его младший брат Олдос выпустил книгу под названием "After Many a Summer Dies the Swan". Эта книга заканчивается описанием встречи одного из ее персонажей – ученого, которому было поручено изобрести эликсир бессмертия – с неким английским дворянином, начавшим такие же опыты 200 лет назад. Старый джентльмен был все еще жив и щеголял своими наградами, однако наружность его несколько изменилась. Фактически он превратился в гориллу: «...«плод антропоида получил возможность перейти к зрелости». Это была лучшая из шуток, которую мне довелось слышать когда-либо».

Вид может эволюировать также путем изменения относительной скорости роста отдельных органов или частей тела. Д'Арси Томпсон утверждал, что не только различные области тела могут расти с разной скоростью, но что существуют еще градиенты роста, приводящие к изменению геометрии форм. Он обосновал это графически, начертив поверх изображения органа сеть прямоугольных координат и математически ею манипулируя. В результате этих манипуляций трансформировалась форма биологической структуры – одни ее части удлинялись, другие укорачивались. (Это можно проиллюстрировать на примере географических карт: на полярной шкале координат глобуса Гренландия выглядит относительно узкой, тогда как на стандартных равноугольных проекционных картах Меркатора она представлена относительно широкой.) На рис. 20.13 показано, каким образом в результате простой трансформации системы прямоугольных координат могут быть получены формы карапакса крабов, относящихся к разным видам. Клеточные процессы, лежащие в основе этих изменений, пока не известны.

ФИЗИОЛОГИЯ РОСТА ОРГАНОВ

Гормоны роста и митоз

Увеличение размеров органа может быть достигнуто двумя способами. Первый способ заключается в увеличении размеров клеток при сохранении их постоянного числа. Этот способ роста называется **гипертрофией.** Второй способ заключается в увеличении числа клеток (каждая из которых может сохранять те же размеры). Этот способ называется **гиперплазией** (Goss, 1978). Гипертрофия часто наблюдается в тканях, утративших способность к митотическим делениям. К этой категории тканей относятся жировая ткань, в которой цитоплазма адипоцитов перегружена жировыми включениями, и скелетная мышечная ткань, многоядерные клетки которой подчинены строго упорядоченной организации актина и миозина. Таковыми представляются и личиночные клетки насекомых, которые увеличиваются путем гипертрофии, тогда как соседние имагинальные диски растут в результате гиперплазии. У человека предшественники адипоцитов делятся в течение первого года жизни (Brook, 1972; Adebonojo, 1975). Затем их число остается постоянным, хотя есть данные о некотором увеличении числа жировых клеток в молодости. Рост жировой ткани может быть индуцирован жирной пищей, которая вызывает увеличение размеров индивидуальных адипоцитов, не изменяя их числа (Stern, Greenwood, 1974), или путем продления времени, в течение которого предшественники жировых клеток могут делиться. По-видимому, это дополнительное время деления ответственно за наследственную тучность, наблюдаемую в некоторых инбредных линиях животных (Johnson et al., 1971). На рис. 20.14 показан ритм гипертрофии адипоцитов у желтобрюхого сурка *Marmota flaviventris*. У этих животных образуется огромный запас жира, позволяющий им переживать зиму. Весной после пробуждения адипоциты лишены жировых включений, из норы вылезает тощий сурок (Ward, Armitage, 1981). Гипертрофию скелетной мускулатуры (и кровеносных сосудов) человека иллюстрирует рис. 20.15. Подобный рост определенного набора мышц часто наблюдается у толкателей ядра и у плотников.

Рост большинства тканей у животных происходит путем митотических делений. Число функциональных единиц почки и легкого, соответственно нефронов и альвеол, закладывается в раннем детстве. Их рост происходит за счет добавления клеток к существующим структурам. Сходным образом рост ткани кожи идет путем добавления новых клеток, а не увеличения объема существующих. Некоторые ткани, такие, как печень, сохраняют популяцию клеток, способных не только делиться, но и формировать новые структуры, например дольки (Goss, 1966). На рис. 20.16 показано время, в течение которого к растущим структурам тела человека могут добавляться функциональные единицы.

Что же контролирует скорость клеточных делений? Некоторые клетки (такие, как нейроны, жировые клетки и клетки скелетной мускулатуры) во время роста едва ли делятся вообще. Другие (например, фибробласты, костные клетки, клетки почек) обладают ограниченным и точно регулируемым характером делений. Вместе с тем некоторые

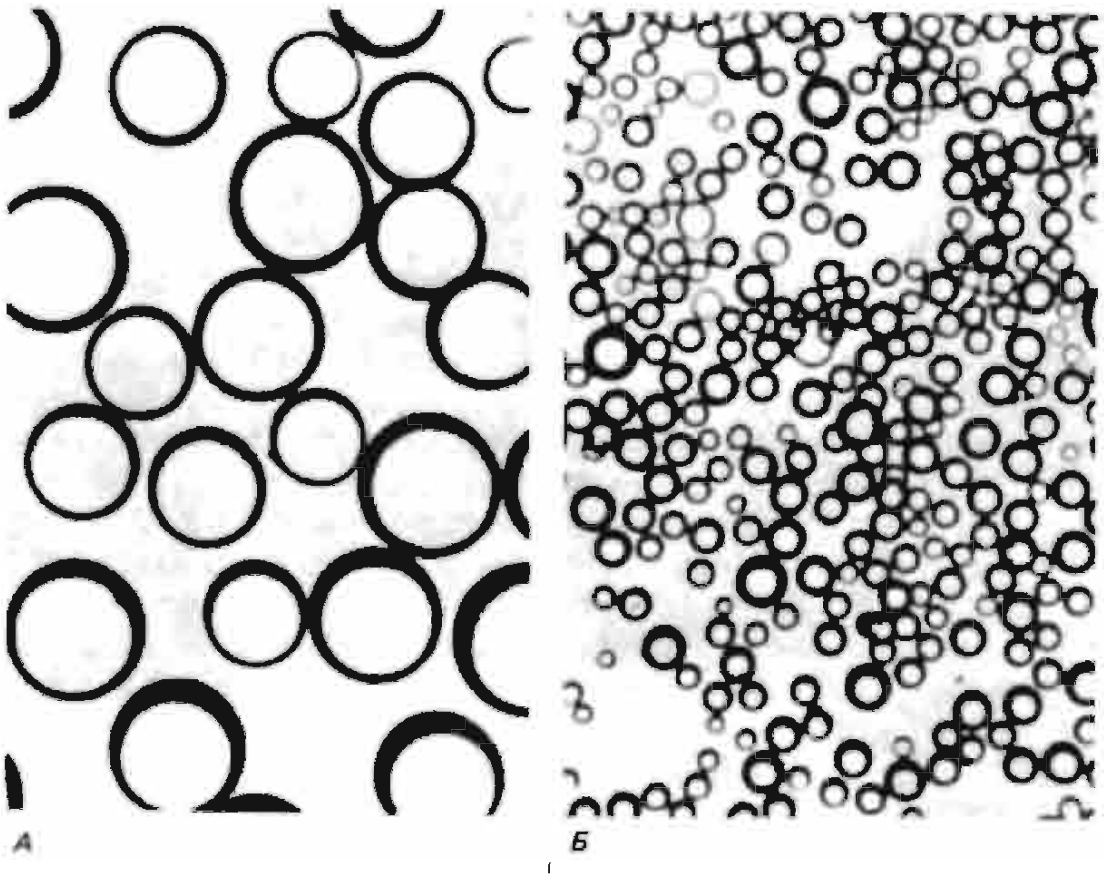


Рис. 20.14. Гипертрофия жировых клеток у сурка. Диспергированные адипоциты (жировые клетки) у желтобрюхого сурка перед (*А*) и после (*Б*) зимней спячки. (Фотография с любезного разрешения G. Florant.)



Рис. 20.15. Гипертрофия мышц человека на примере дельтовидной и двуглавой мышц у профессионального культуриста. Рост этих мышц продолжается в течение длительного времени после того, как мышечные клетки утратили способность к делению. Обратите внимание также на кровеносные сосуды, обслуживающие эти мышцы. (Фотография Jan Watson.)



Рис. 20.16. Продолжительность митотической фазы роста для разных тканей человека. (По Goss, 1966.)

клетки (такие, как стволовые клетки крови и сперматогенные клетки) делятся постоянно в течение всей жизни организма. Полагают, что существуют два основных уровня контроля клеточных делений. Первый – это *внешний* контроль, когда рост органа зависит от фактора, источником которого служат другие ткани, и второй – *внутренний* контроль, при котором сама ткань или орган регулируют свой собственный рост.

Внешний контроль роста наблюдается в случаях, когда один орган влияет на рост другого. У большинства позвоночных рост всего тела регулируется синтезом **соматотропина,** или **гормона роста** (ГР). Наиболее очевидный эффект действия этого гормона наблюдается в процессе роста длинных костей конечности (гл. 6); отсутствие этого гормона вызывает у человека пропорциональную карликовость. Для координации роста всего тела гормон роста должен влиять на увеличение размеров и других органов; чувствительностью к этому гормону должны обладать печень, почки, костный мозг, поджелудочная железа, молочные железы, гонады, тимус, жировая ткань и гипоталамус. Ткани плода, по-видимому, более чувствительны к соматотропину, чем взрослые ткани; соматотропин начинает синтезироваться плодом уже через 70 дней после оплодотворения (Martin, 1985).

Способность гормона роста координировать рост всего тела впервые была продемонстрирована в очень эффектном эксперименте с использованием рекомбинантных плазмид. В 1982 г. Домер и др. (Doehmer et al., 1982) создали «библиотеку» хромосомной ДНК крысы путем разрезания ее генома низкими концентрациями ферментов рестрикции, таких, как *Eco*RI и клонирования этих фрагментов ДНК в плазмидном векторе pBR322. Использование низких концентраций фермента позволяет получить много отрезков ДНК, включающих нерасщепленный сайт *Eco*RI. Этот метод повышает вероятность выделения относительно длинных фрагментов, содержащих весь ген. Радиоактивный зонд кДНК был получен из мРНК гормона роста крысы с помощью обратной транскриптазы (гл. 10). Такой зонд использовался для идентификации клонов рекомбинантной ДНК, которые содержат ген гормона роста крысы. Один из клонов содержал отрезок ДНК длиной 7600 пар оснований, предположительно включавший весь ген гормона роста крысы. Этот ген, трансфицированный в ДНК культивируемых фибробластов мыши, оказался способным кодировать крысиный гормон роста.

Затем из рекомбинантной плазмиды был выделен ген длиной 7600 пар оснований и у крысиного гена гормона роста была удалена лидирующая последовательность (Palmiter, 1982). В ее состав входит *cis*-регуляторная последовательность, обусловливающая нормальную транскрипцию. На ее место была помещена *cis*-регуляторная последовательность другого гена – мышиного гена металлотионеина I (*MT-I*), кодирующего небольшой белок, регулирующий уровень цинка в сыворотке. Полученный гибридный ген представлен на рис. 20.17. Ген *MT-I* можно индуцировать ионами тяжелых металлов, таких, как цинк или кадмий, а последовательности, отвечающие за эту индукцию, располагаются в 5′-фланкирующей области гена. Слияние этой металлотионеиновой промоторной области с геном гормона роста крысы (*rGH*) помещает ген кры-

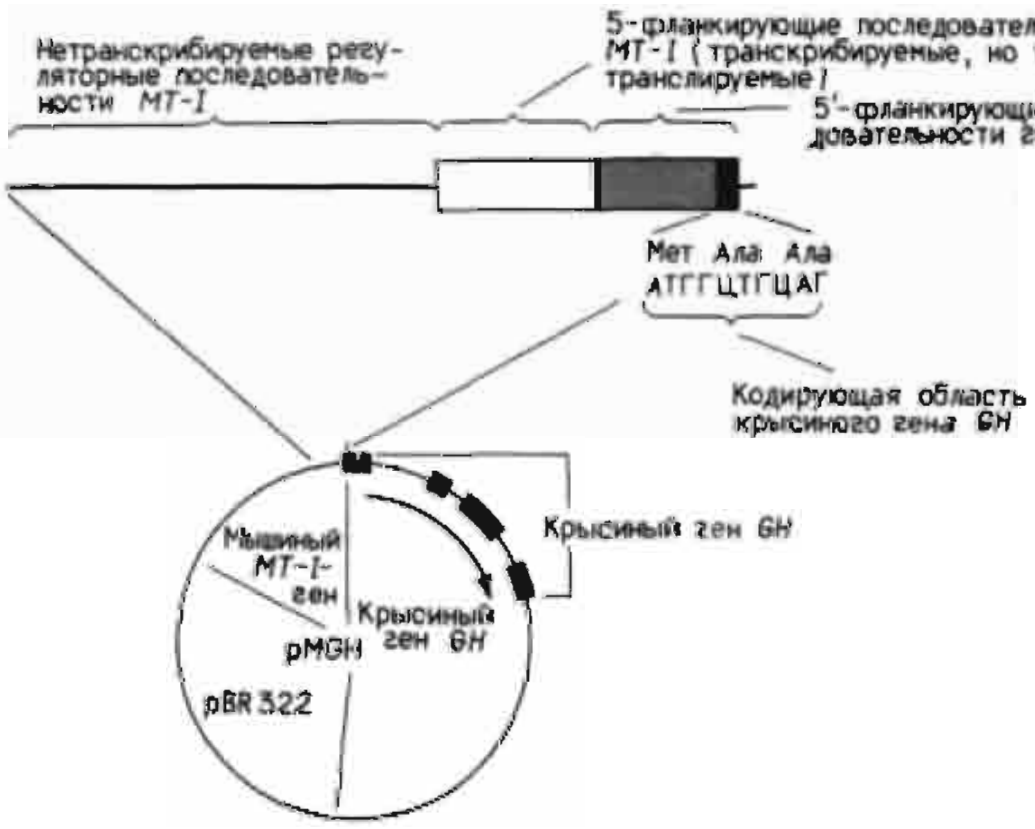


Рис. 20.17. Рекомбинантная плазмида, содержащая структурный ген гормона роста крысы, металлотионеиновую регуляторную область мыши и бактериальную плазмиду pBR322. Плазмида pMGH была введена в ооцит мыши. Темные боксы в этой плазмиде соответствуют экзонам гена *GH* (гена гормона роста). Направление транскрипции указано стрелкой. Над замкнутой плазмидой представлено в увеличенном виде место соединения металлотионеиновой регуляторной области с геном *GH*. (По Palmiter et al., 1982.)

синого гормона роста под контроль металлотионеинового промотора. В результате активации промотора присутствием цинка или кадмия должен синтезироваться гормон роста крысы.

Тройная рекомбинантная плазмида (бактериальная плазмида pBR322–мышиный металлотионеиновый промотор–ген крысиного гормона роста) культивировалась в бактериях, после чего был изолирован ее фрагмент, представленный *MT-1–rGH*. Около 600 копий этого фрагмента инъецировали в пронуклеусы недавно оплодотворенных яиц мыши. Из 170 таких зигот, которые затем были имплантированы в матки псевдобеременных мышей, 21 продолжала развитие до конца беременности. В хромосомах полученных мышей с помощью метода гибридизации ДНК выявили включения многочисленных копий гена гормона роста. Полученных **трансгенных** мышей (т. е. мышей, содержащих ген другого вида, в данном случае ген крысиного гормона роста) кормили пищей с повышенным содержанием цинка. Цинк индуцировал в печени мышей синтез больших количеств крысиного гормона роста. (Печень служит обычным местом синтеза металлотионеина. Гормон роста обычно секретируется гипофизом.) Количество секретируемого гормона роста коррелировало с размерами этих мышей. Трансгенные мыши оказались огромными по сравнению со своими нормальными собратьями из того же самого помета – почти на 80% крупнее (рис. 20.18). Все «супермыши» характеризовались нормальными пропорциями тела, поскольку каждый орган увеличивался соответствующим образом.



Рис. 20.18. Мышь, развившаяся из яйца, в которое была инъецирована pMGH (*слева*), и нормальная мышь из того же помета (*справа*). (Из Palmiter et al., 1982; фотография с любезного разрешения R. L. Brinster.)

Единственно, чем отличались крупные мыши от своих нормальных молочных братьев и сестер, так это наличием генов крысиного гормона роста; отсюда можно заключить, что именно гормон роста несет ответственность за координированную регуляцию роста млекопитающих [1].

Гормон роста, по-видимому, на одни клетки действует непосредственно, а на другие – косвенно. Было показано (Isaksson et al., 1982), что на рост костей он оказывает прямое влияние. Например, если удалить гипофизы у молодых крыс и затем ввести гормон роста прямо в формирующиеся конечности на одной стороне тела (конечности другой стороны служат контролем), то конечности, на которые подействовали гормоном, будут расти, а контрольные – нет. Гормон роста активно связывается с хрящевыми клетками и стимулирует синтез ДНК в культуре хондроцитов (Eden et al., 1983; Madsen et al., 1983). Полагают, что непрямое действие гормона роста осуществляется посредством веществ, называемых **соматомединами.** Эти пептиды секретируются печенью в ответ на гормон роста; их уровень низок у людей, страдающих недостаточностью гормона роста, но после введения этого гормона он повышается. Возрастание уровня соматомединов наблюдается также во время «вспышки роста» у подростков и у больных с опухолями, секретирующими гормон роста (Vassilopoulou-Sellin, Phillips, 1982; Luna et al., 1983). В группу соматомединов входят **инсулиноподобный фактор роста I** (ИФР-1, соматомедин С) и **инсулиноподобный фактор роста II** (ИФР-2, соматомедин А).

Эти факторы работают на определенных фазах клеточного цикла. Как уже упоминалось ранее, цикл соматических клеток подразделяется на фазу М (митоз), фазу G_1 (от англ. gap – промежуток) между митозом и следующей фазой S (синтез ДНК) и фазу G_2 между S и М. Клетки, которые прекращают делиться, находятся в фазе покоя – G_0. Клетку в фазе G_0 от той же самой клетки в фазе G_1 отличает набор синтезируемых ею белков (Baserga, 1985). Клетки, выходящие из фазы G_0, стимулированы фактором роста к переходу в состояние «компетентности» к вступлению в клеточный цикл. Иначе говоря, они должны быть эквивалентны клеткам, которые только что закончили митоз. Примерно на полпути периода G_1 они достигают пункта,

[1] Описанный эксперимент наводит нас на размышления определенного рода. Во-первых, перед нами открывается потенциальная возможность устранять генетические дефекты путем введения нормального гена в пронуклеус яйца, оплодотворенного вне тела матери. Такие яйца, продолжающие развитие, могут быть возвращены в матку женщины. Во-вторых, нельзя не считаться с чувством ответственности, обычно возрастающим пропорционально нашим возможностям, – хотим мы этого или нет.

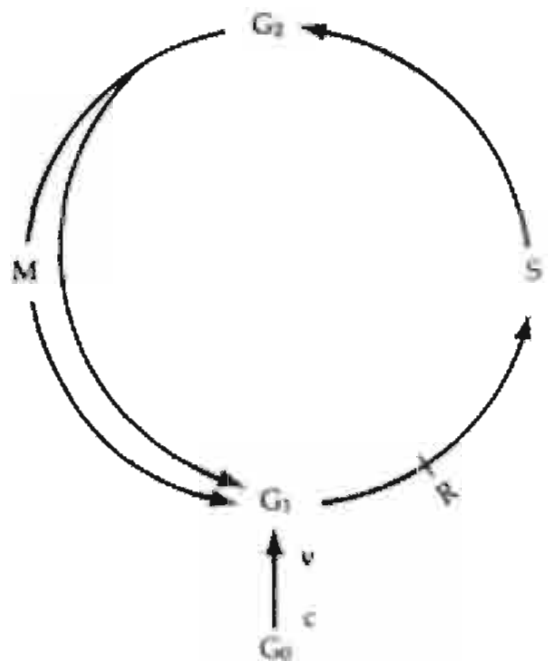


Рис. 20.19. Схема клеточного цикла нормальных клеток млекопитающих. Указаны точки, в которых клетки, находящиеся в фазе G_0, могут войти в клеточный цикл (C), и где клетки, находящиеся в фазе G_1, коммитируются к синтезу ДНК (R). c – точка компетенции; M – фаза митоза; S – фаза синтеза; v – точка входа в фазу G_1.

где должно быть принято решение о том, приступать или не приступать к делению. До этой точки митоз может быть блокирован ингибиторами транскрипции или трансляции. После прохождения клеткой этой точки она вступит в фазы S, G_2 и M независимо от стимуляции извне (рис. 20.19) (Yang, Pardee, 1986).

ИФР-I разрешает переход клеток из фазы G_1 к фазе S (Leof et al., 1982). Нильсоном и др. (Nilsson et al., 1986) недавно было показано, что этот белок играет существенную роль при росте конечности, регулируемом гормоном роста. Если подействовать гормоном роста на зачаток большой берцовой кости молодых гипофизэктомированных крыс (как в вышеупомянутом эксперименте), то он стимулирует образование ИФР-I хондроцитами пролиферативной зоны (рис. 20.20). Сочетание гормона роста с ИФР-I может обеспечить исключительно сильный митотический сигнал. Гормон роста может стимулировать деление стволовых клеток, ведущее к образованию клеток, способных отвечать на ИФР-I. Эти новые клетки под действием соматомедина будут вновь реплицироваться (Zezulac, Green, 1986). Пигмеи, живущие в Заире, имеют нормальный уровень гормона роста и ИФР-I до полового созревания, после чего уровень ИФР-I у них снижается почти на треть по сравнению с таковым у нормальных подростков. Представляется вероятным, что именно ИФР-I ответствен за вспышку роста при нормальном половом созревании (Merimee et al., 1987).

Как следует из их названий-синонимов, соматомедины имеют почти ту же аминокислотную последовательность, что и инсулин, который также служит стимулирующим рост пептидом (например, в случае развития молочных желез мыши; гл. 19). Сам гормон роста тоже гомологичен инсулину, как и лактоген плаценты – гормон, выделяемый трофобластом и, вероятно, влияющий на рост плода путем изменения метаболизма глюкозы у матери, – и фактор роста нервов, функции которого были подробно описаны в гл. 5. Таким образом, инсулин, гормон роста, соматомедины, лактоген плаценты, фактор роста нервов объединяются в семейство родственных факторов роста.

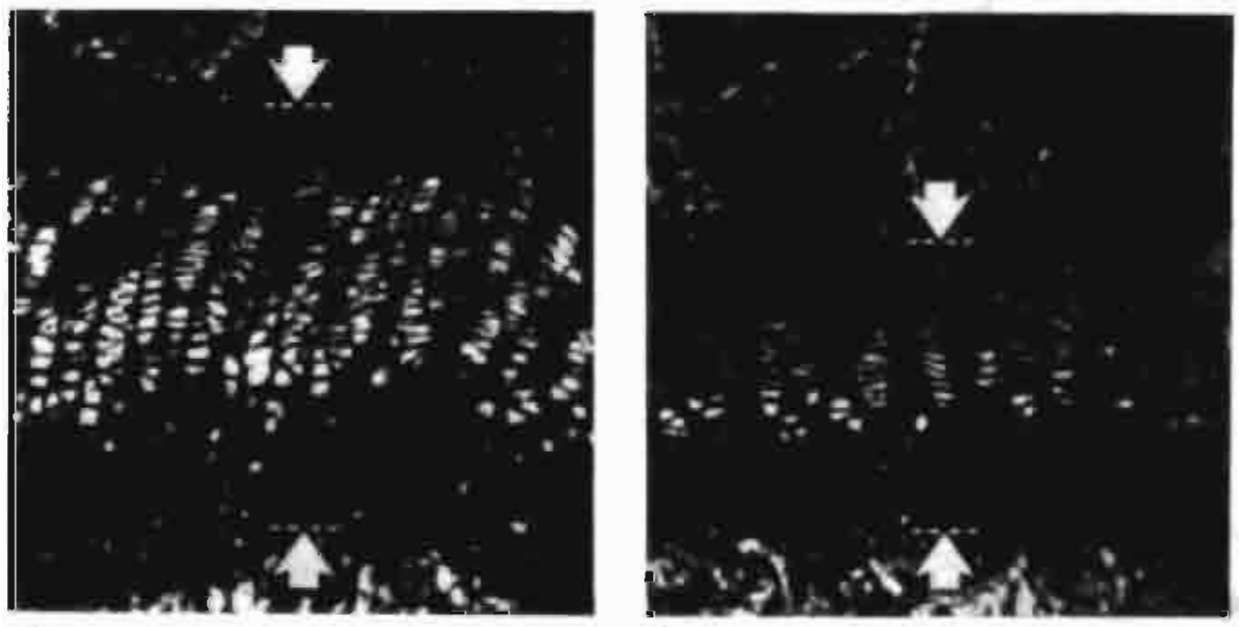


Рис. 20.20. Действие гормона роста (ГР) на рост хряща и синтез инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-I). Гормон роста был инъецирован в ростовую пластинку большой берцовой кости с одной стороны гипофизэктомированной крысы (*А*); другая сторона (*Б*) служила контролем. Микроскопические срезы окрашены антителом, узнающим ИФР-I. Стрелки обозначают ширину эпифизной ростовой пластинки. Микрофотография свидетельствует о том, что ГР индуцирует рост и синтез ИФР-I. (Из Nilsson et al., 1986; фотографии с любезного разрешения O. Isaksson.)

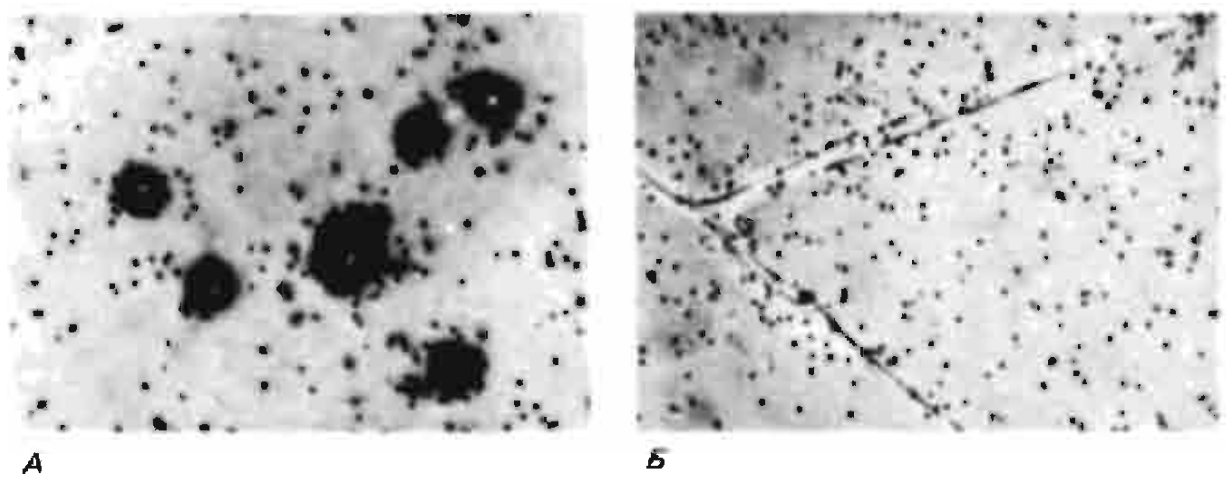


Рис. 20.21. Связывание фактора роста фибробластов (ФРФ) в развивающейся мышце. *А*. Связывание радиоактивного ФРФ делящимися фибробластами указывает на присутствие мембранных рецепторов ФРФ. *Б*. Эти рецепторы утрачиваются, когда клетки прекращают деление и формируют мышечные трубочки. (Из Olwin, Hauschka, в печати; фотографии с любезного разрешения S. Hauschka.)

Идентифицированы и другие внешние факторы роста. **Фактор роста, полученный из тромбоцитов** (ФРТ), стимулирует деление гладкомышечных клеток, фибробластов и глиальных клеток (Ross, Vogel, 1978). Он служит триггером, обусловливающим выход неделящихся клеток из G_0 и вступление их в фазу G_1 клеточного цикла (Stiles et al., 1979). По-видимому, этот фактор ответствен за заживление разрывов кровеносных сосудов, поскольку содержание его увеличивается в клетках, находящихся у края раны. ФРТ связывается с рецепторами на поверхности этих клеток, индуцируя тем самым ядро к синтезу белка (Olashaw, Pledger, 1982). Другой важный гормон роста – это **эпидермальный фактор роста** (ЭФР), который стимулирует клеточные деления во многих тканях, в том числе в эпителии молочных желез и эпидермисе. Он необходим для формирования твердого нёба, эпителиальной выстилки глотки и ротовой полости, а также для образования роговицы. ЭФР служит не только фактором роста, но и гормоном, стимулирующим дифференцировку. Инъецированный новорожденным мышам, он ускоряет прорезывание глаз и появление зубов (Savage, Cohen, 1972). Если ФРТ дает возможность неделящимся клеткам вступить в клеточный цикл (G_0- и G_1-компетентность), то ЭФР способен перевести клетки из фазы G_1 в фазу S (Pledger et al., 1984).

Появление способности реагировать на тот или иной фактор роста может играть исключительно важную роль в развитии. В гл. 6 мы говорили о том, как различные типы предшественников клеток крови приобретают способность дифференциально реагировать на гематопоэтические факторы роста, а в гл. 16 обсуждалось, каким образом В-клетки приобретают рецепторы для факторов роста, продуцируемых Т-клетками. Скелетные миобласты делятся в присутствии либо ЭФР, либо **фактора роста фибробластов.** Сливаясь при формировании мышечных трубочек, они утрачивают рецепторы к стимулирующим митоз белкам (рис. 20.21) (Lim, Hauschka, 1984; Olwin, Hauschka, 1988). Существуют многочисленные другие гормоны роста, причем некоторые из них могут стимулировать деления самых разных клеток, тогда как активность других требует высокоспецифических мишеней.

В основе действия факторов роста, подобных инсулину, включающих в свое семейство ФРТ, ЭФР и по крайней мере один гематопоэтический фактор роста – колониестимулирующий фактор 1 (КСФ-1), – лежит, по-видимому, один и тот же общий механизм. В каждом случае рецептор для этих гормонов представлен белком, пронизывающим клеточную мембрану, который может быть разделен на три части: 1) наружный домен, узнающий и связывающий специфический фактор роста; 2) домен гидрофобных остатков, проходящий через мембрану; и 3) домен в цитоплазме, который может быть активирован с образованием **АТФ-тирозинфосфокиназы.** Эта ферментативная активность (чаще называемая просто тирозинкиназной активностью) не реализуется до тех пор, пока рецептор не свяжется со своим фактором роста. Если это произойдет, то конформационные изменения белка дадут возможность внутреннему домену осуществить каталитический перенос терминального фосфата АТФ к тирозиновым остаткам соседних белков (Cohen et al., 1980; Ullrich et al., 1985; Ebina et al., 1985). Это фосфорилирование тирозиновых остатков имеет важнейшее значение для последующих событий. Почти все реакции фосфорилирования белков (более 99,9%) осуществляются на сериновых и треониновых остатках. Фосфорилирование тирозиновых остатков, по-видимому, служит главным сигналом к началу синтеза ДНК в клетке и ее делению (рис. 20.22).

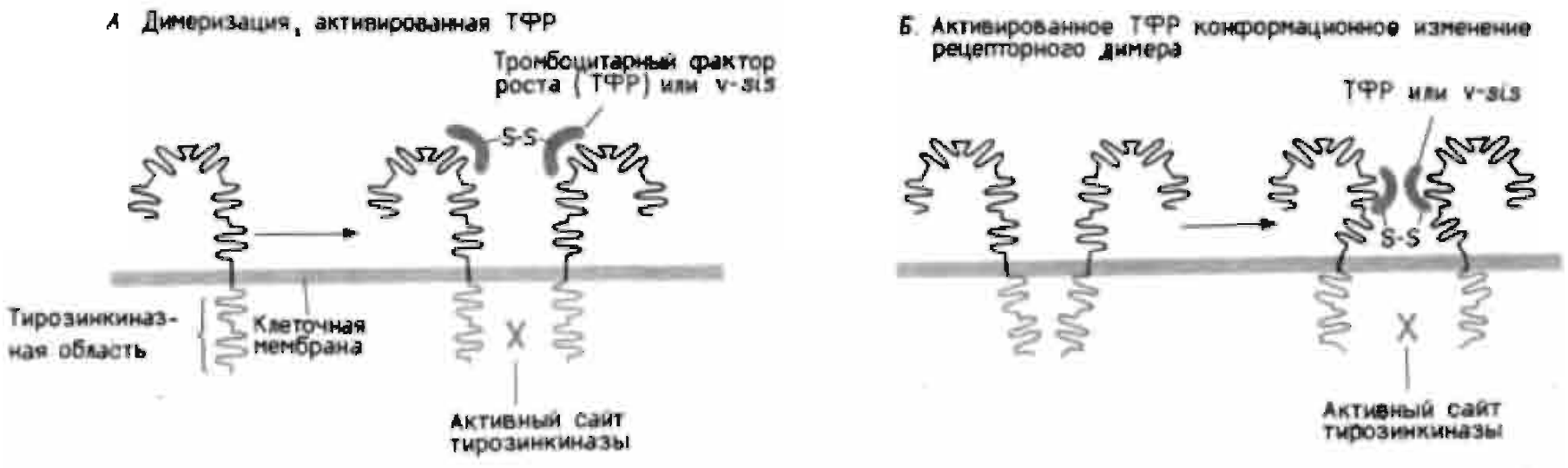


Рис. 20.22. Взаимодействие фактора роста тромбоцитов, или тромбоцитарного фактора роста (ФРТ) с его рецептором. Рецептор ФРТ пронизывает клеточную мембрану. Его внешний домен содержит пять иммуноглобулиноподобных доменов, способных связывать ФРТ. В цитоплазме находятся две области, вместе составляющие тирозинкиназу. Ограничения, накладываемые на строение белков, позволяют предположить, что активная тирозинкиназа в сущности представляет собой димер двух рецепторов. На схеме *А* активность белка ФРТ приводит к образованию таких димеров. На схеме *Б* ФРТ взаимодействует с предсуществующими димерами, в результате чего конформационное изменение создает активную тирозинкиназу. (По Williams, 1989.)

Факторы, ингибирующие рост

Кроме факторов, стимулирующих клеточный рост, существуют белки, которые его подавляют. Недавно были идентифицированы два таких белка: β-интерферон (β-ИНФ) и трансформирующий фактор роста-β (ТФР-β). Действие ТФР-β на клетки зависит от типа клетки-мишени и присутствия в среде других факторов роста. И в самом деле, в его названии отражается двойственный характер его действия. В одной лаборатории удалось выделить этот фактор, использовав его способность трансформировать нормальные клетки в опухолевые (Roberts et al., 1981, 1982). Нормальным клеткам для роста необходим твердый субстрат. Что касается опухолевых клеток, то они способны расти и на такой полужидкой среде, как агароза. После воздействия ТФР-β рост некоторых нормальных клеток приобретает черты злокачественного роста. В другой лаборатории (Holley et al., 1980) те же молекулы были выделены на основе их способности ингибировать деление культивируемых клеток почки. Было обнаружено, что даже в концентрации 10 нг/мл этот белок подавляет клеточные деления на 80%. В настоящее время известно, что основной эффект ТФР-β состоит в ингибировании клеточного роста (Proper et al., 1982; Lawrence et al., 1984; Roberts et al., 1985) и что этот эффект может быть изменен добавлением других факторов. Некоторые опухоли (в том числе карцинома легких, карцинома молочной железы и линии клеток меланомы) ингибируются ТФР-β, и это ингибирование может быть усилено добавлением ЭФР. Однако в случае других опухолевых линий ЭФР может снизить ингибиторную активность ТФР-β (Roberts et al., 1985). ТФР-β ингибирует рост многих типов эпителиальных клеток, лимфоцитов и эпидермальных клеток. Нормальные клетки сетчатки весьма чувствительны к ТФР-β, но клетки ретинобластомы утрачивают рецепторы этого белка и становятся устойчивыми к нему (Kimchi et al., 1988). Вместе с тем ТФР-β служит фактором роста фибробластов и эмбриональных эндотелиальных клеток капилляров (Hsu, Wang, 1986; Heine et al., 1987). У зародышей мыши в возрасте 11–18 сут ТФР-β обнаруживается преимущественно в мезенхиме, где происходит интенсивный ангиогенез.

β-Интерферон также ингибирует клеточную пролиферацию и блокирует переход клеток из фазы G_0 в фазу G_1 (Einat et al., 1985). Хантер (Hunter, 1986) и Резницки с коллегами (Resnitzky et al., 1986) сообщили о синтезе β-ИНФ под действием некоторых факторов роста (например, ЭФР, КСФ-1, ФРТ). Эти данные свидетельствуют об обратной связи, способной регулировать неконтролируемую клеточную пролиферацию (рис. 20.23). Появились данные о том, что клетка, лишенная способности отвечать на ТФР-β, становится предрасположенной к злокачественному росту. Мозес с коллегами (по Marx, 1986) выделил линию опухолевых клеток, не имеющих рецептора к ТФР-β; выделены также и другие линии опухолевых клеток, дефектных в отношении синтеза этого внутреннего ингибитора.

β-Интерферон проявляет свое ингибирующее пролиферацию действие, задерживая клетки перед вступлением в фазу S (Sokawa et al., 1977). В этот же период клеточного цикла проявляется действие ФРТ; сравнительно недавние данные (Lin et al., 1986) свидетельствуют о том, что β-интерферон блокирует активность ФРТ. Если внести ФРТ в популяцию мышиных фибробластов, задержанных в фазе G_0 в результате контактного ингибирования, то

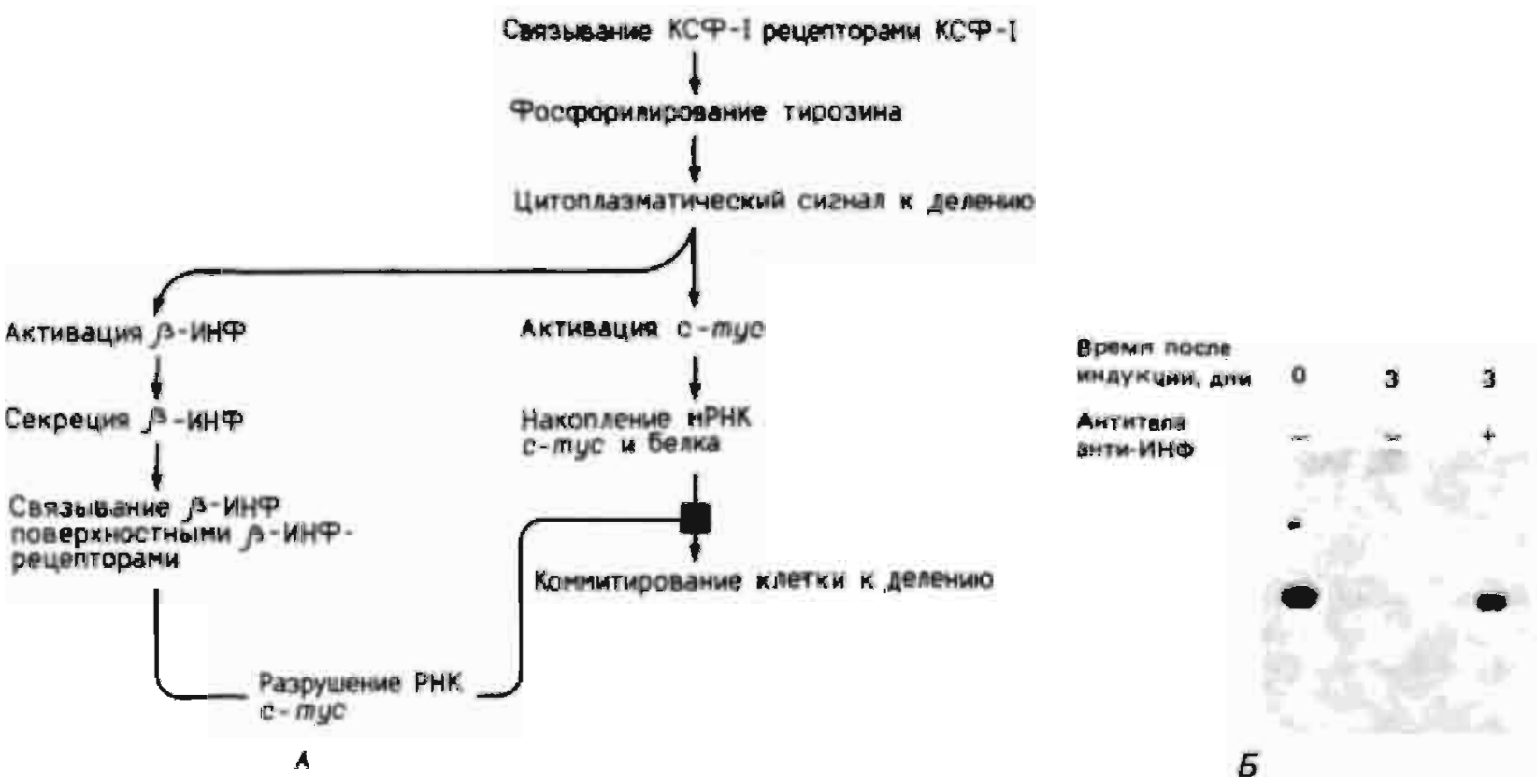


Рис. 20.23. Контроль роста по принципу обратной связи в процессе дифференцировки клеток крови. *А*. Модель аутокринной регуляции роста. Фактор роста (в данном случае – это колониестимулирующий фактор I – КСФ-I) запускает клеточные деления и одновременно инициирует синтез и секрецию β-интерферона (β-ИНФ). Рецептор β-ИНФ на клеточной поверхности (той же клетки) связывает β-ИНФ и вызывает (пока еще не известным способом) деградацию РНК *c-myc*. *Б*. Экспрессия генов *c-myc* в процессе терминальной дифференцировки миелоидных клеток мыши, выявленная с помощью Нозерн-гибридизации клеточной РНК. РНК *c-myc* обнаруживается при пролиферации клеток (день 0). Когда деления прекращаются и клетки полностью дифференцируются (день 3), транскрипты *c-myc* исчезают. Однако если собственный β-ИНФ клетки инактивировать добавлением в среду антител анти-ИНФ, то деления возобновятся и обнаружится РНК *c-myc*. (Из Resnitzky et al., 1986.)

фактор роста заставит клетки перейти в фазу S. Но если одновременно добавить β-ИНФ, то клетки не будут реагировать на ФРТ. Кроме того, под действием β-ИНФ ингибируется синтез специфических белков, связанный со стимуляцией ФРТ. Таким образом, можно полагать, что β-ИНФ нейтрализует действие ФРТ, препятствуя клеткам вступать в фазу S клеточного цикла.

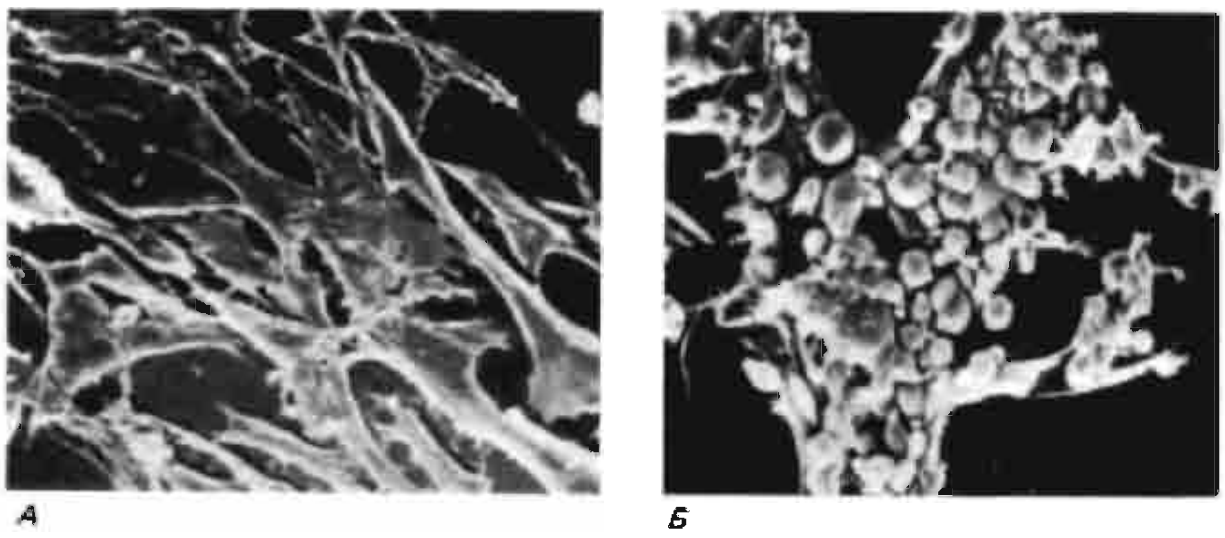
Деление клеток, по-видимому, контролируется взаимодействием стимулирующих рост гормонов и гормонов, подавляющих рост. Кроме того, ансамбль этих факторов регулирует клеточный рост таким образом, что митоз может не только осуществиться, но и быть остановлен, прежде чем клетки перейдут границы дифференцировки, определенные для них генетически.

Онкогены и клеточный рост

Вирусные онкогены

В течение последних пятнадцати лет исследования в области физиологии клеточного роста объединились с исследованиями, касающимися, казалось бы, совершенно иного направления – вирусологии. Механизм, лежащий в основе превращения нормальных клеток в злокачественные и называемый **онкогенезом**, столетиями был объектом научных спекуляций и догадок. В конце прошлого века Теодор Бовери предположил, что причиной возникновения злокачественных опухолей служат дефекты в строении хроматина, но он не располагал методами, позволявшими обосновать эту идею. Примерно в то же время Пейтон Раус, молодой исследователь из Рокфеллеровского института, заявил, что вирусы могут вызывать образование злокачественных опухолей. Однако до последнего времени ни одно из подобных утверждений не могло быть проверено должным образом. Только в восьмидесятых годах нашего века с разработкой методов клонирования генов и получения моноклональных антител оказалось возможным анализировать механизмы онкогенеза как на уровне ядра, так и на уровне клеточной поверхности. Результаты этих исследований в значительной мере стимулировали объединение вирусной и клеточной теорий онкогенеза. По современным представлениям, злокачественная опухоль возникает в результате дефектов клеточного роста, а вирусные гены, вызывающие злокачественную трансформацию, на самом деле представляют собой потомство генов, когда-то попавших в клетку предшествующего поколения.

Раус (Rous, 1910) выделил вирус, способный вызывать образование опухолей соединительной ткани (**сарком**) у цыплят. В 1958 г. Темину и Рубину



А *Б*

Рис. 20.24. Тест на злокачественность. *А*. Нормальные клетки при контакте друг с другом перестают мигрировать, и в них прекращается синтез ДНК. В результате на поверхности чашки Петри образуется один слой клеток. *Б*. Злокачественным клеткам не свойственно контактное ингибирование, поэтому они наползают друг на друга. (Фотография с любезного разрешения G.S. Martin.)

(Temin, Rubin, 1958) удалось показать, что вирус саркомы Рауса может инфицировать растущие в культуре клетки цыпленка и трансформировать их. Для нормальных клеток характерно контактное ингибирование движения и клеточного деления. После соприкосновения они начинают двигаться в противоположные стороны. Клетка, окруженная со всех сторон своими соседями, не будет ни двигаться, ни делиться. В результате нормальные клетки в культуре всегда располагаются в один слой. Злокачественные же клетки утрачивают эту способность к ингибированию. Они могут продолжать рост даже в условиях окружения другими клетками со всех сторон. Таким образом, клетки, превратившиеся в злокачественные в культуре, можно отличить по формированию ими характерных холмиков делящихся клеток (**фокусы трансформированных клеток**), возвышающихся над плоским слоем нормальных клеток (рис. 20.24). Поскольку некоторые вирусы способны трансформировать нормальные клетки, была предложена гипотеза о наличии у вируса гена, ответственного за эту трансформацию. Эти гипотетические гены были названы **онкогенами** (от греч. onkos – нарост, опухоль), но только в 1979 г. Коупленд и др. (Copeland et al., 1979) смогли трансформировать фибробласты цыпленка посредством фрагмента ДНК вируса саркомы Рауса, содержащего единственный ген. Этот ген, названный *src*, не только обусловливает возникновение трансформированного фенотипа при включении в культивируемые клетки, но и будучи введен здоровым цыплятам, приводит к образованию опухолей. Было обнаружено, что ген *src* кодирует белок с молекулярной массой 60 000 дальтон (Brugge, Erikson, 1977; Beemon, Hunter, 1978).

По мере того как выделяли все больше опухолеродных вирусов и их онкогенов, складывалась странная картина: онкогены не связаны с другими генами вируса и совершенно безразличны для его функционирования. Они используют вирус просто как транспортное средство (см. Duesberg, 1983). Темин (Temin, 1971) предположил, что вирусные онкогены – это нормальные клеточные гены, которые мутировали и затем были упакованы в вирусные частицы. Наиболее убедительные данные, свидетельствующие о конверсии нормальных клеточных генов в вирусные онкогены, были получены в работе Ханафузы и др. (Hanafusa et al., 1977), которые показали, что вирус, инфицировавший клетку, может захватывать онкоген. Они использовали мутантный вирус саркомы Рауса, не содержащий гена *src* и, следовательно, не способный трансформировать нормальные клетки в опухолевые. Этот дефект вируса не препятствовал его инфекции клетки и репликации в ней. Через несколько раундов инфекции некоторые вирусные частицы вновь приобретали способность после заражения цыплят вызывать у них образование опухолей. Проанализировав эти новые онкогенные вирусы, Ханафуза и его коллеги обнаружили, что они включают полный новый ген *src*. Таким образом, вирус оказался способным получить ген *src* от нормальной клетки.

Создание радиоактивных кДНК к вирусным онкогенам дало возможность продемонстрировать существование подобных генов в клеточном геноме. Геномную ДНК разрезали ферментами рестрикции, разделяли путем электрофореза и переносами на нитроцеллюлозный фильтр. После разделения на отдельные цепи действием щелочи ее инкубировали с радиоактивной ДНК из опухолевого вируса (рис. 20.25). Если последовательность клеточной ДНК гомологична таковой вирусного онкогена, то она должна связаться с радиоактивной кДНК, после чего ее можно выявить посредством радиоавто-



Рис. 20.25. Присутствие клеточного гомолога онкогена v-*abl* мышиного опухолеродного вируса Абельсона. ДНК двух групп культивируемых клеток человека разрушали ферментом рестрикции *Hind* III и разделяли электрофоретически. После переноса ДНК на нитроцеллюлозный фильтр этот последний был инкубирован с радиоактивной ДНК, полученной из онкогена v-*abl*. Присутствие человеческого протоонкогена c-*abl* выявляется с помощью радиоавтографии. (Из Kozbor et al., 1986; фотография с любезного разрешения C. Croce.)

графии. Действительно такие последовательности были идентифицированы; некоторые из них перечислены в табл. 20.3. Эти клеточные гены называются **протоонкогенами, или клеточными онкогенами.**

Онкогены и клеточный рост

Допустив существование протоонкогенов в нормальных клетках, мы сталкиваемся с тремя связанными между собой вопросами: Каков нормальный продукт активности этих генов? Как они функционируют во время нормальной жизни клетки? Каким образом эти онкогены дают начало опухолевым клеткам? Данные, полученные около 10 лет назад, свидетельствуют о том, что протоонкогены – это гены, контролирующие синтез ДНК и клеточные деления (Heldin, Westermark, 1984).

Варианты фактора роста

Развитие злокачественной опухоли может быть вызвано нарушением регуляции генов, функционирование которых обеспечивает процесс клеточного деления. Гипотетический путь, ведущий к делению клетки, представлен на рис. 20.26. Пептидный фактор роста из окружения клетки связывается рецептором фактора роста ее плазматической мембраны. В результате рецептор фактора роста претерпевает конформационные изменения, и его цитоплазматическая область сама приобретает тирозинкиназную активность или способность индуцировать тирозинкиназную активность у других молекул мембраны. Тирозинкиназная активность стимулирует активность какого-то компонента фосфатидилинозитольного пути. Следствием этих процессов является индукция некоторых ядерных белков, ведущая к изменению транскрипционной активности клетки и началу синтеза ДНК.

Нарушения регуляции, ведущие к образованию злокачественной опухоли, могут произойти на любом этапе этого пути. Не исключено, что в некоторых случаях вирусный онкоген был геном, кодирующим фактор роста. Примером может быть онкоген v-*sis* вируса обезьяньей саркомы. [Буква «v» в названии онкогена означает «вирусный», тогда как «c» (от англ. cell – клетка) говорит о том, что речь идет о его клеточном двойнике.] Одной из наиболее важных вех в истории исследования злокачественных опухолей служит открытие кодирования онкогеном v-*sis* одной из субъединиц фактора роста, выделенного из тромбоцитов (Doolittle et al., 1983; Waterfield et al., 1983). Вирус обезьяньей саркомы вызывает опухоли соединительной ткани у обезьян, и эти опухоли обнаружены только в клетках тех типов (фибробластах, клетках глии и миобластах), которые имеют рецепторы к ФРТ. При инфицировании этих клеток вирусом происходит транскрипция гена v-*sis*, а затем трансляция с образованием субъединиц ФРТ. Эта субъединица распознается собственными рецепторами клетки к ФРТ и служит сигналом к делению (Kelly et al., 1985). Описанный процесс называется **аутокринной стимуляцией,** поскольку клетки производят свой собственный гормон роста и на него же отвечают (рис. 20.27). Исследования Бетшольца и др. (Betscholtz et al., 1984) дают основания полагать, что взаимодействия между фактором роста v-*sis* и его рецептором даже опережают их появление на поверхности клетки. Скорее всего это взаимодействие и последующая стимуляция митоза происходят в то время, когда и фактор, и его рецептор подвергаются процессингу в эндоплазматическом ретикулуме. Аутокринная стимуляция не является обычной для развивающегося организма. Однако известен случай, когда аутокринная стимуляция посредством ФРТ может иметь очень важное значение. Речь идет о цитотрофобласте млекопитающих. Клетки этого отдела плаценты способны не только синтезировать ФРТ, но и связывать его (Goustin et al., 1985). Таким образом, гигантская экспансия плацентарной ткани является, по-видимому, результатом аутокринной стимуляции, поскольку клетки цитотрофобласта способны и производить ФРТ, и реагировать на него.

Варианты рецепторов фактора роста

Известны и другие онкогены, кодирующие белки, которые имитируют рецепторы факторов роста. Онкоген v-*erb*-B вируса эритробластоза птиц кодирует белок, почти идентичный остаткам 551–1154 человеческого рецептора для эпидермального фактора роста (рис. 20.28) (Yamamoto et al., 1983; Downward et al., 1984). Этот белок представляет

Таблица 20.3. Вирусные и клеточные онкогены и их возможные функции в клетке

Вирусный онкоген	Источник ретровируса	Клеточный протоонкоген	Идентичность, гомология или размеры белка	Локализация в клетке и распространение	Активность	Возможные функции
I. ВАРИАНТ ФАКТОРА РОСТА						
v-*sis*	Вирус обезьяньей саркомы	c-*sis*	B-цепь ФРТ 14K	Секретируемый белок	Гомо- или гетеродимер, связывается с рецептором ФРТ	Митогенез Заживление ран Фактор раннего эмбрионального роста (?)
II. ТИРОЗИНКИНАЗЫ И РОДСТВЕННЫЕ С-*ONC*						
v-*erb*-B	Вирус птичьего эритробластоза	c-*erb*-B	Рецептор ЭФР 170K	Плазматическая мембрана мезодермальных, эктодермальных и энтодермальных клеток	Связывание ЭФР Связывание ТФР Тирозинкиназа	Сигнал трансдукции для митогенеза и дифференцировки Стимуляция прорезания зубов, открывания глаз, развития легких
v-*fms*	Вирус кошачьей саркомы Мак-Доноу	c-*fms*	Рецептор КСФ-1 140K	Плазматическая мембрана макрофагов и внезародышевых клеток	Связывание КСФ-1 Тирозинкиназа	Сигнал трансдукции для митогенеза и дифференцировки
v-*ros*	Вирус птичьей саркомы UR2	c-*ros*	Рецептор инсулина	Плазматическая мембрана	Связывание инсулина (?)	Сигнал клеточного деления (?)
v-*src*	Вирус саркомы Рауса	c-*src*	60K	Цитоплазматическая поверхность мембраны Адгезионные фокальные контакты	Тирозинкиназа Фосфорилирует многие клеточные белки, например винкулин, виментин	Развитие нейронов и мышц
v-*mos*	Вирус мышиной саркомы Молони	c-*mos*	37K	Цитоплазма Эмбриональные семенники и яичники	Серин : треонинкиназа	
v-*abl*	Вирус мышиной лейкемии Абельсона	c-*abl*	150K	Плазматическая мембрана	Тирозинкиназа Фосфорилирует винкулин	Дифференцировка B-клеток (?)
v-*fes*	Вирус кошачьей саркомы	c-*fes*	92K	Цитоплазма Плазматическая мембрана	Тирозинкиназа	Развитие макрофагов
v-*fps*	Вирус саркомы Фуджинами	c-*fps*	98K	Цитоплазма Плазматическая мембрана	Тирозинкиназа	Развитие макрофагов

III. ГТФАЗЫ						
v-*ras*^{Ki}	Вирус мышиной саркомы Кирстена	c-Ki-*ras*-2 c-H-*ras*-1	21K	Цитоплазматическая поверхность мембраны разнообразных клеток	ГТФаза, связывающая ГТФ + ГДФ	Аденилатциклазная регуляция (?)
v-*ras*^{Ha}	Вирус мышиной саркомы Гарвея	N-*ras*				
IV. ЯДЕРНЫЕ ПРОДУКТЫ						
v-*fos*	Вирус остеосаркомы FBJ	c-*fos*	55K	Ядра внезародышевых тканей, кроветворные клетки и макрофаги. Все остальные клетки на более низком уровне	Связывание ДНК с дополнительным белком	Переход от G_0 к G_1 Дифференцировка
v-*myc*	Вирус птичьего миелоцитоматоза	c-*myc* N-*myc* L-*myc*	62–66K	Ядерный матрикс большинства клеток; в некоторых опухолевых и эмбриональных тканях	Связывание ДНК	Пролиферация Регуляция синтеза ДНК
v-*myb*	Вирус птичьего микобластоза	c-*myb*	75K	Ядра кроветворных клеток	Связывание ДНК	Дифференцировка кроветворных клеток
v-*jun*	Вирус-17 птичьей саркомы	c-*jun*	47K; гомологичен фактору транскрипции AP-1	Ядра большинства клеток	Связывание ДНК	Активация генной экспрессии (?)
V. ДРУГИЕ						
v-*erb*-A	Вирус птичьего эритробластоза	c-*erb*-A	Рецептор T_3; гомологичен рецептору глюкокортикоидов	Цитоплазма и ядро	Связывает тироксин	Регуляция метаболизма (?)

Из Adamson, 1987.

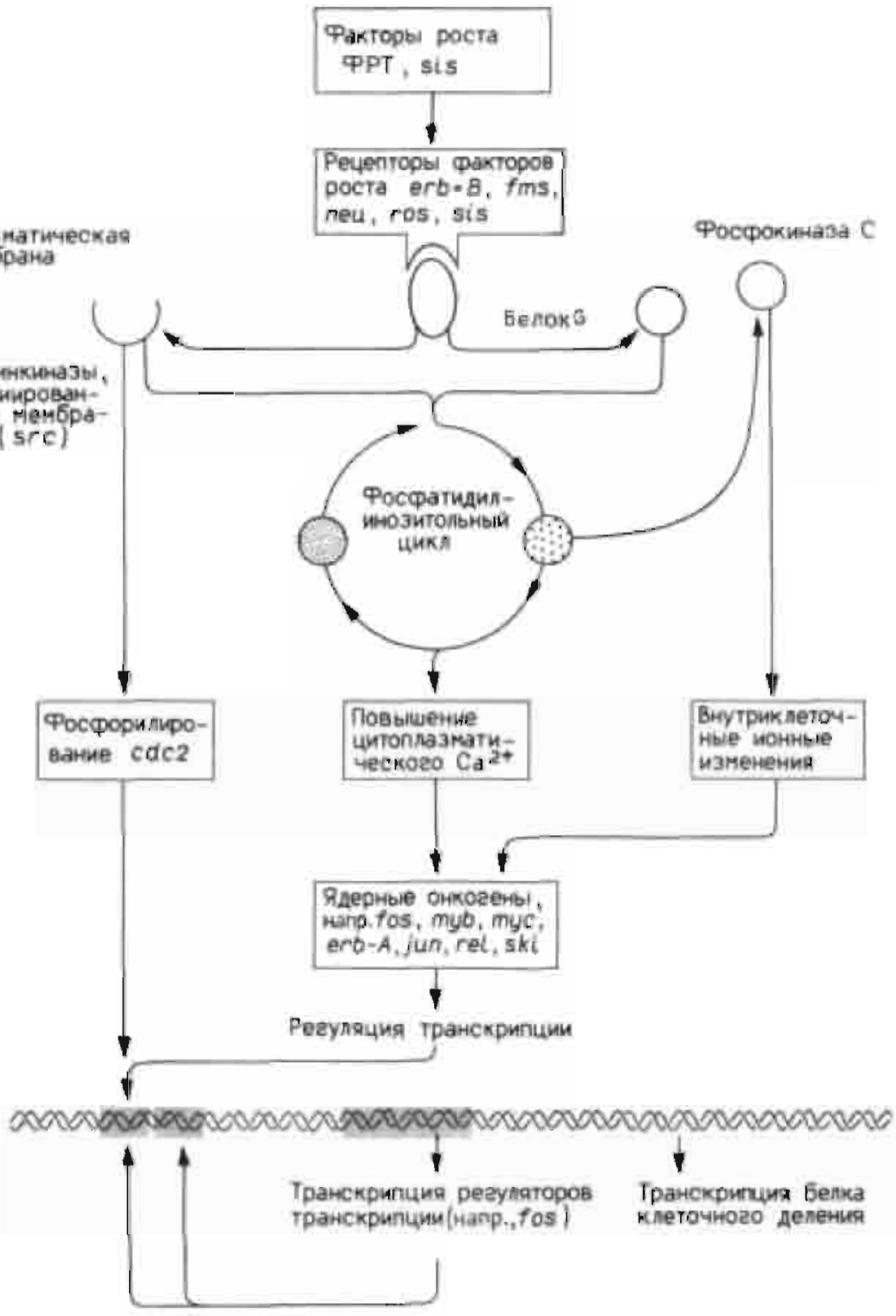


Рис. 20.26. Схема событий, контролирующих деление клетки. Факторы роста (или родственные им онкогенные вещества) связываются со своими специфическими рецепторами. Эти рецепторы начинают либо сами действовать как тирозинкиназа, либо активируют другие молекулы к функционированию в качестве тирозинкиназ. Эти киназы активируют фосфатидилинозитольный цикл, который вводит в действие фосфокиназу С и повышает концентрацию свободных ионов кальция в цитоплазме. Эти факторы регулируют синтез ДНК так же, как и ядерные онкогены. (По Bishop, 1989.)

собой цитоплазматический и трансмембранный домены, и только небольшая его часть действительно связывает ЭФР. Обычно рецептор ЭФР характеризуется незначительной тирозинкиназной активностью, которая сильно возрастает при связывании с ЭФР.

Было обнаружено, что эта тирозинкиназная активность фосфорилирует фосфолипазу С, активируя таким образом фосфатидилинозитольный путь к делению клетки (Margolis et al., 1989; Meisenhelder et al., 1989). Полагают (см. Bell, 1986 и рис. 20.27), что рецепторы факторов роста, такие, как рецептор ЭФР, активируют фермент фосфолипазу С либо прямо, либо косвенно посредством белка G. Фосфолипаза С расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат на диацилглицерол и инозитолтрисфосфат. Первый из этих продуктов может активировать натрий-протоновый насос, вследствие чего повышается pH внутри клетки, тогда как второй – инозитолтрисфосфат – высвобождает ионы кальция, хранящиеся в эндоплазматическом ретикулуме. Сочетание повышенного pH и свободного внутриклеточного кальция, как известно, стимулирует деление клетки.

«Усеченный» рецептор ЭФР – продукт онкогена v-*erb*-B, – по-видимому, всегда обладает высокой тирозинкиназной активностью (Hayman et al., 1983). Известно, что эта способность фосфорилировать тирозиновые остатки белка служит сигналом для митоза и коррелирована с трансформацией клеток

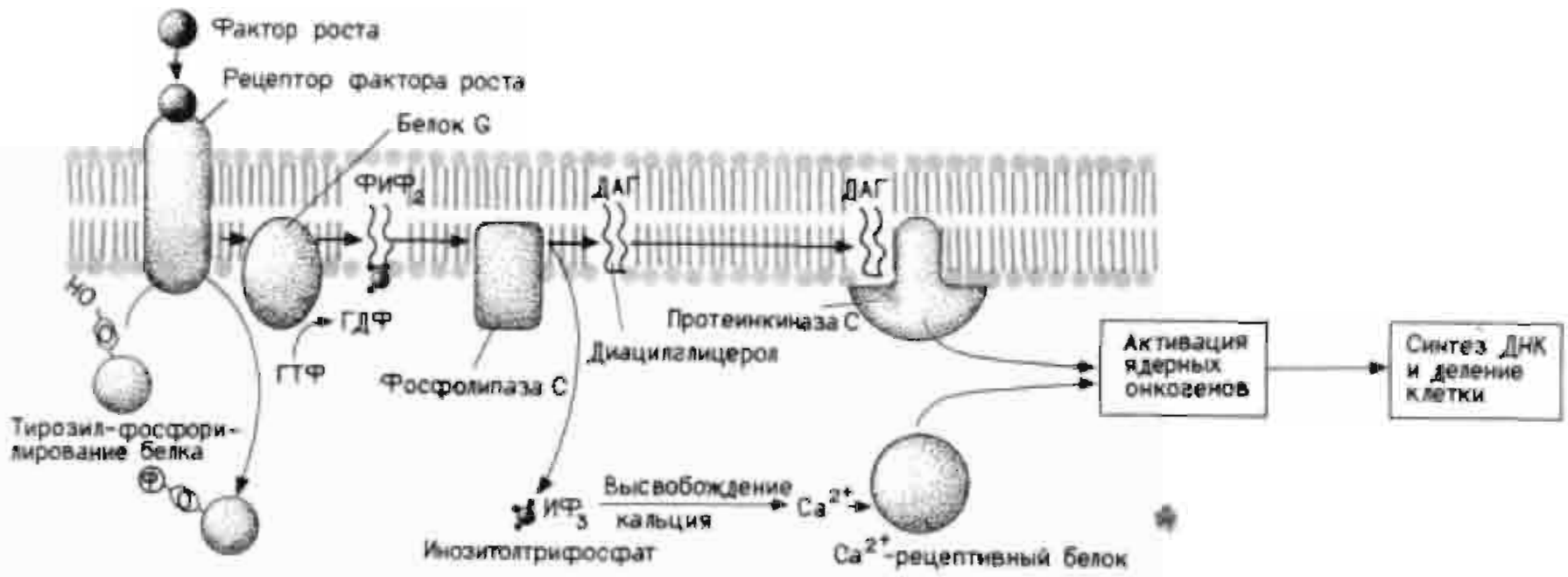


Рис. 20.27. Суммарная модель некоторых изменений, ведущих к делению клетки. Связывание фактора роста с рецептором вызывает активность рецептора тирозинкиназы и активацию фосфолипазы С. Фосфолипаза С расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат ($ФИФ_2$) на инозитолтрифосфат ($ИФ_3$) и диацилглицерол (ДАГ). $ИФ_3$ мобилизует кальций из депо эндоплазматического ретикулума, а ДАГ активирует протеинкиназу С. Протеинкиназа С фосфорилирует белки, функционирующие как Na^+/H^+-насос. Ионные и метаболические процессы, активируемые этими изменениями, индуцируют экспрессию ядерных онкогенов, таких, как *c-fos* и *c-myc*.

многих типов (Sefton et al., 1980; Klarlund, 1985; Martin-Zanca et al., 1986). Очевидно, домен, связывающий ЭФР в обычном рецепторе, ингибирует его тирозинкиназную активность, и это ингибирование снимается при связывании ЭФР. Белок v-*erb*-B лишен этого связывающего домена и сохраняет свое стимулированное состояние. Таким образом, клетки, содержащие v-*erb*-B, по-видимому, вырабатывают рецептор фактора роста, который постоянно стимулирует клетку к делению даже в отсутствие фактора роста.

Другой онкоген, имитирующий рецептор фактора роста,–это онкоген v-*fms* вируса кошачьей саркомы Мак-Довоу. Он имитирует рецептор для КСФ-1 фактора роста, специфичного в отношении макрофагов и их предшественников. Продукт v-*fms* может связывать КСФ-1 и при этом проявлять тирозинкиназную активность (Scherr et al., 1985). Человеческий протоонкоген для рецептора КСФ-I может узнаваться кДНК, приготовленной на основе гена v-*fms*; он картирован на длинном плече хромосомы 5 человека. В связи с этим представляет интерес тот факт, что индивидуумы с делециями в длинном плече хромосомы 5 утрачивают ген рецептора КСФ-I и характеризуются аномальным созреванием клеток крови (Nienhuis et al., 1985). Экстракопии гена v-*fms* в клетках костного мозга мыши стимулируют злокачественный рост многих линий кроветворных клеток (Heard et al., 1987).

Некоторые другие вирусные онкогены также ко-

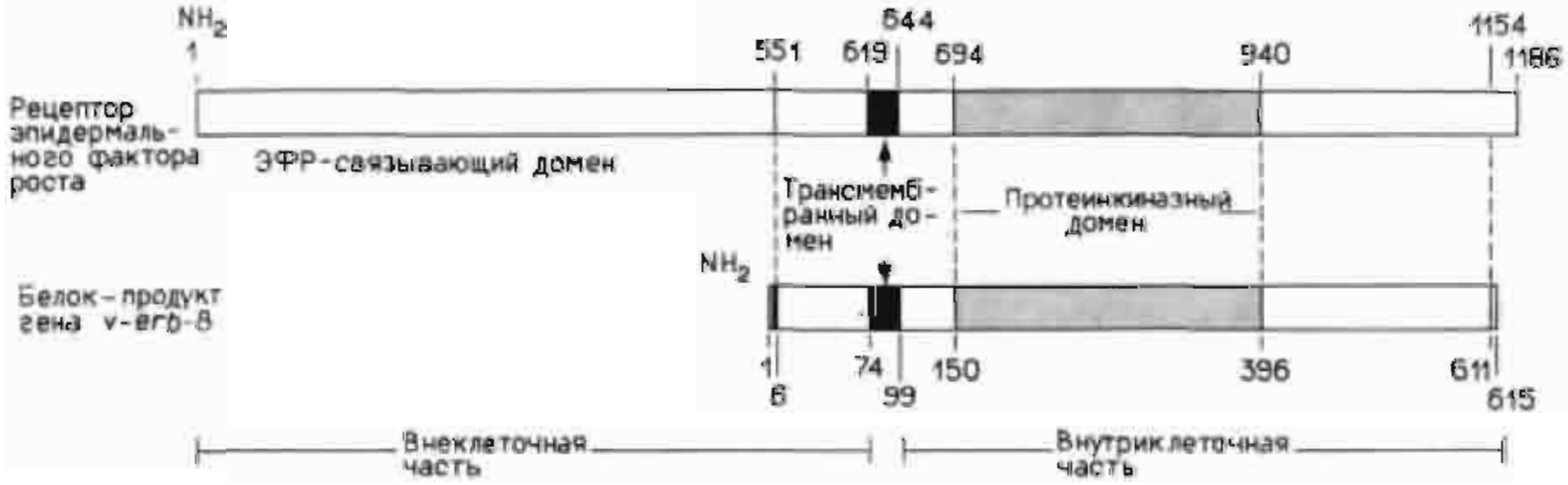


Рис. 20.28. Белок v-*erb*-B как усеченный рецептор ЭФР. Белок v-*erb*-B (*внизу*) содержит 6 аминокислот, кодируемых вирусным геном (*gag*), которые присоединены к 609 аминокислотам, кодируемым, вероятно, геном карбоксильной половины рецептора ЭФР (*вверху*). Эта структура представлена протеинкиназным доменом, трансмембранным доменом и небольшой частью внеклеточного домена. (Из Hunter, 1985.)

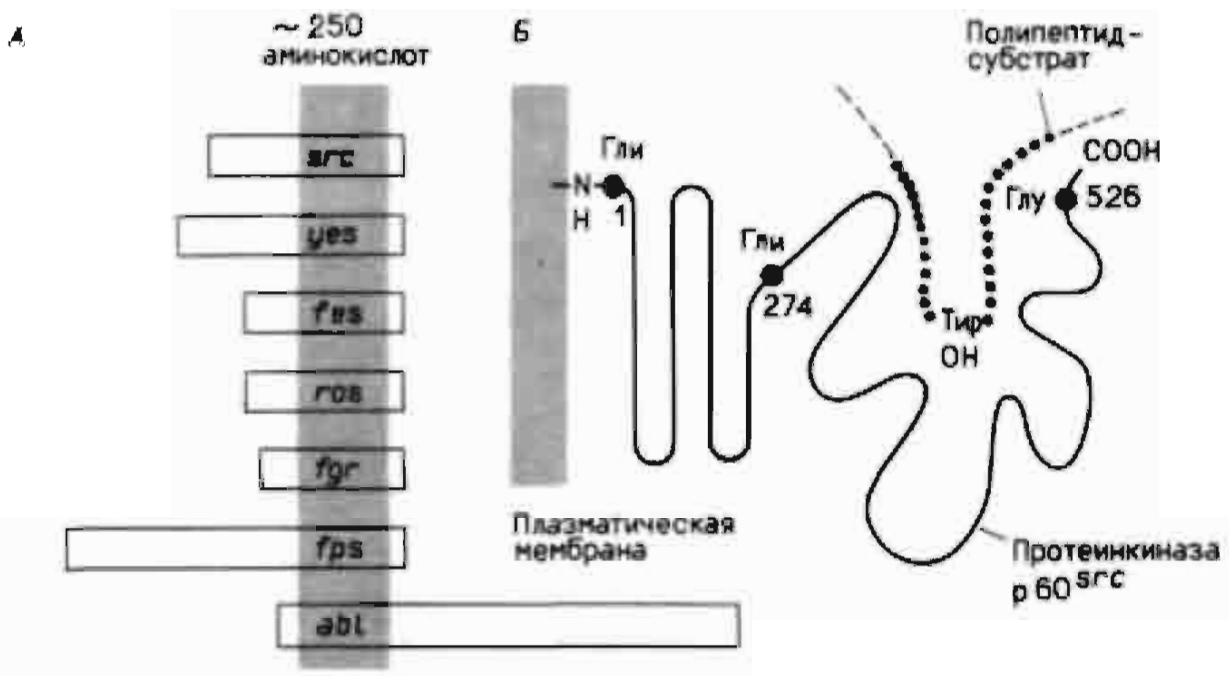


Рис. 20.29. Тирозинкиназная область онкогенных белков. *А*. Семь белков, кодируемых различными онкогенами. Несмотря на значительные различия в размерах (эти различия отражены в относительной длине отрезков), каждый из белков содержит область (обозначена серым цветом), состоящую примерно из 250 аминокислот, которая катализирует тирозинкиназную реакцию. *Б*. Протеинкиназа *src* ($p60^{src}$) состоит из 526 аминокислот, связанных с клеточной мембраной N-концевым остатком. Тирозинкиназный сайт располагается вблизи карбоксильного конца. (По Avers, 1985.)

дируют белки, характеризующиеся тирозинкиназной активностью, однако данными о том, что они гомологичны какому-либо из известных факторов роста, мы не располагаем (рис. 20.29). Примером может служить v-*src* вируса саркомы Рауса. Этот онкоген в инфицированных клетках локализуется на внутренней поверхности плазматической мембраны; если тирозинкиназная активность отсутствует (что имеет место у некоторых мутантов вируса), то он не способен трансформировать клетки (Erikson et al., 1979; Levinson et al., 1980). Белок c-src может быть активирован путем сайт-специфического фосфорилирования тирозина. Это фосфорилирование сопровождается активацией рецептора фактора роста тромбоцитов (Piwnica-Worms et al., 1987; Kmiecik, Shalloway, 1987). Продукт гена c-*src* (вместе с его тирозинкиназной активностью) естественным образом появляется по ходу эмбрионального развития и обычно отсутствует у взрослых организмов (Schartl, Barnekow, 1984). Особенно четко это проявляется при развитии нейральной сетчатки, где он обнаруживается в нейронах по мере их дифференцировки (Sorge et al., 1984).

Большой интерес представляют субстраты этих тирозинкиназ. Существует ряд сообщений о многочисленных и разнообразных белках, которые фосфорилируются этими онкогенами, но до сих пор мы не можем с достаточной степенью определенности назвать субстраты, играющие роль в стимуляции клеточного деления. Для тирозинового фосфорилирования весьма важным субстратом служит сам фермент. Продукты некоторых онкогенов, такие, как белок src, белок v-erb-B и нормальный рецептор ЭФР, подвергаются **аутофосфорилированию**. Аутофосфорилирование имеет важное значение для повышения активности тирозинового фосфорилирования других субстратов (Weber et al., 1984; Downward et al., 1984). Белок src также способен фосфорилировать интегрин: фосфорилированный интегрин обнаруживается вскоре после инфицирования клетки вирусом саркомы Рауса (Hirst et al., 1984). После того как произойдет инфекция, этот рецептор теряет способность связывать и фибронектин (на внешней стороне мембраны), и талин (на внутренней ее стороне). Ингибирование функции рецептора после фосфорилирования, по-видимому, влияет на морфологию и адгезивные свойства трансформированных клеток. Имеются данные о том, что ген v-*src* фосфорилирует винкулин – один из белков, входящих в состав специализированного адгезионного контакта клетки с субстратом (Sefton et al., 1981).

Белок src может также фосфорилировать молекулы, непосредственно участвующие в стимуляции деления клетки. Показано (Draetta et al., 1988), что этот белок способен фосфорилировать cdc 2(p34)-субъединицу фактора, стимулирующего созревание (ФСС, или MPF – от maturation promoting factor). Как уже говорилось, p34 играет важную роль в жизни клетки, побуждая ее входить в митоз. Активность белка src обусловлена фосфорилированием и выражается в том, что он позволяет клетке перейти из фазы G_2 в фазу M. Таким образом, *src* важен для осуществления деления клетки, и следствием его аберрантной экспрессии будет неуместная стимуляция клеточных делений.

ВАРИАНТЫ ПЕРЕНОСЧИКОВ СИГНАЛА. Некоторые онкогены имитируют элементы, переносящие сигнал, стимулирующий деление, от мембраны к ядру. Изучение таких переносчиков – одна из наиболее противоречивых и волнующих областей в исследовании рака и клеточного роста, поскольку эти продукты онкогенов могут помочь в идентификации гипотетических соединений-переносчиков. Онкоген v-*ras* вирусов сарком Гарвея и Кирстена кодирует связанный с мембраной белок с молекулярной массой 21 000 дальтон, который связывает ГТФ и ГДФ.

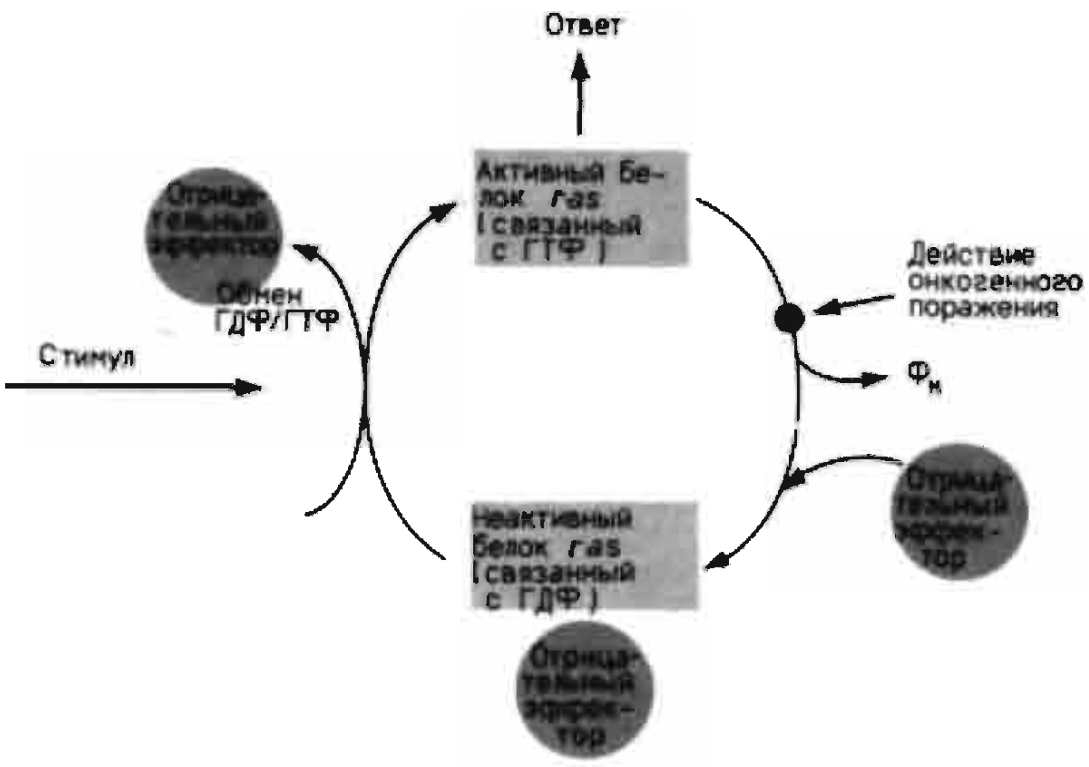


Рис. 20.30. Схема, показывающая, каким образом белок ras может вызвать сверхпролиферацию клеток. Под действием обычного стимула (от рецептора фактора роста) в белке ras (p21) происходит замена ГДФ на ГТФ и он теряет свой отрицательный эффектор. Это изменение активирует белок, и он начинает функционировать. Затем он меняет ГТФ на ГДФ, связывает отрицательный эффектор и становится неактивным. Полагают, что онкогенные поражения препятствуют циклическим изменениям этого белка, вследствие чего белок ras постоянно находится в активном состоянии. (Из Levinson, 1986.)

Эти ГТФ-связывающие белки вовлечены в регуляцию клеточного роста. Связывая ГТФ, белок активируется и начинает контролировать некоторые эффекторные функции, такие, как, например, открывание в клеточной мембране ионных каналов или активация протеинкиназы С (рис. 20.27, 20.30, 20.31). Затем они гидролизуют ГТФ до ГДФ и становятся неактивными до тех пор, пока рецептор гормона не стимулирует их снова. Лакал и др. (Lacal et al., 1986a, b) продемонстрировали, что связывание ГТФ существенно для онкогенной активности белка v-ras, но уровень гидролиза ГТФ со злокачественной трансформацией клеток не коррелирован.

ВАРИАНТЫ ЯДЕРНЫХ ФАКТОРОВ. Функция последнего класса онкогенов приурочена к тому периоду, когда сигнал к делению клетки уже прошел от мембраны через цитоплазму и воспринят ядром. Эти онкогены кодируют белки, осуществляющие ответ ядра на цитоплазматический стимул, вызывающий митоз. Регуляция клеточного цикла обычно осуществляется в течение фазы G_1. В это время клетка производит новые мРНК, необходимые для

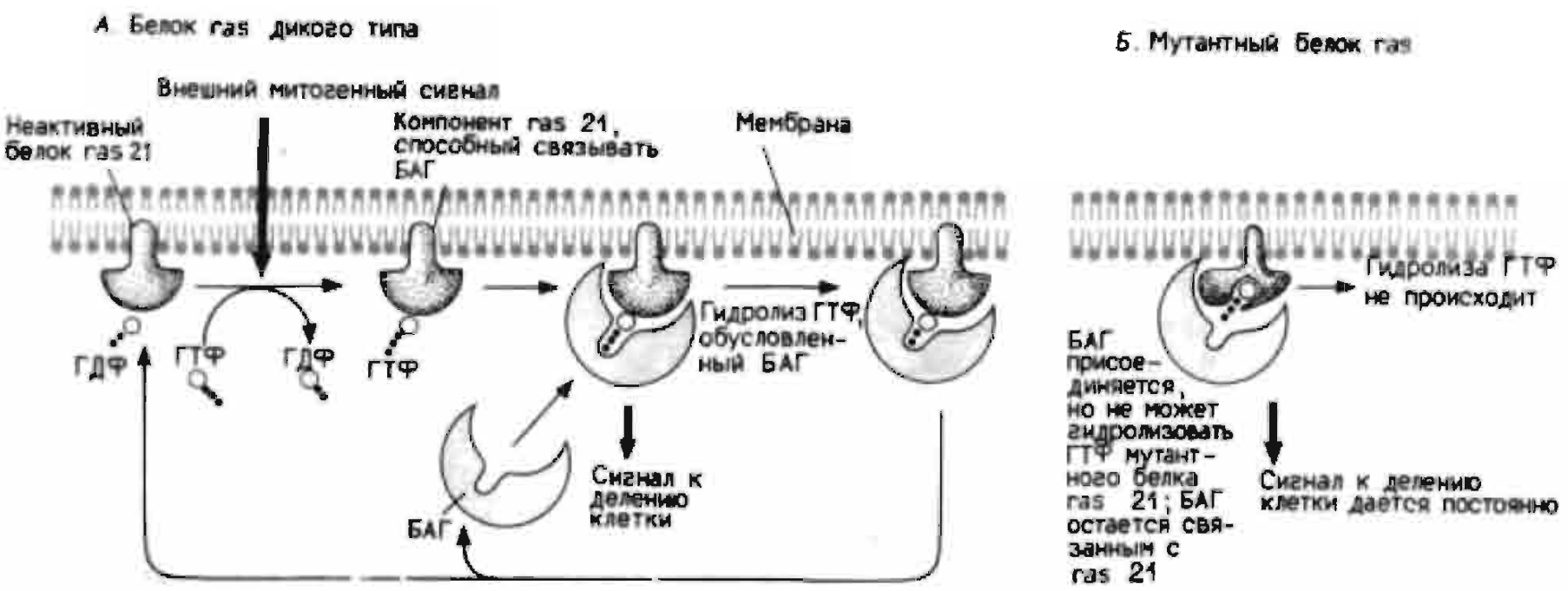


Рис. 20.31. Механизм онкогенеза при участии мутантных белков ras. *А*. В клетках, содержащих белки ras дикого типа, внешний митогенный сигнал вызывает фосфорилирование ГДФ, связанного с неактивным белком ras. Связанный с ГТФ белок ras способен образовывать комплекс с белком БАГ и трансдуцировать свой сигнал к делению клетки. Белок БАГ также гидролизует ГТФ до ГДФ и покидает белок ras, оказавшийся теперь в неактивной форме. *Б*. В случае мутантного белка ras белок БАГ присоединяется к мутантной форме ras и обусловливает тем самым передачу митогенного сигнала. Но он, однако, не способен гидролизовать ГТФ до ГДФ, поэтому он остается связанным с белком ras, создавая ситуацию, при которой митогенный сигнал поступает постоянно. (По McCormick, 1989.)

синтеза белков, участвующих в делении; установлено, что около 5% типов мРНК делящихся клеток отсутствует в неделящихся клетках (Williams, Penman, 1975; Lau, Nathans, 1985). Если эти белки, индуцирующие митоз, кодируются онкогенными вирусами, то в клетке они могут содержаться постоянно, пока она инфицирована вирусом. По всей вероятности, подобная ситуация имеет место в случае онкогенов v-*myc* и v-*fos*. Протоонкоген c-*fos* экспрессируется в течение очень короткого периода времени, когда клетка переходит из фазы G_0 в фазу G_1 клеточного цикла, например в случае переноса фибробластов из бессывороточной среды в среду, содержащую сыворотку (Greenberg, Ziff, 1984; Kruijer et al., 1984). Ген c-*fos* может быть активирован ФРТ, интерлейкином-3, фактором роста нервов, КСФ-1 в течение пяти минут после связывания их клеточной поверхностью (Gonda, Metcalf, 1984; Kruijer et al., 1985; Conscience et al., 1986). Белок fos обнаружен в ядрах стимулированных клеток и связан с ДНК (Sambucetti, Curran, 1986). На самом деле c-*fos* димеризуется с другим протоонкогеном – c-*jun*, образуя человеческий фактор транскрипции AP-1 (Halazonetis et al., 1988; Rauscher et al., 1988). По-видимому, онкоген v-*fos* вируса остеосаркомы FBJ мыши обеспечивает клетку такой же информацией. Если клетки инфицированы онкогеном v-*fos*, они больше не нуждаются для своей пролиферации в ростовых факторах.

Продукт онкогена v-*myc* вируса птичьего миелоцитоматоза связывается с ядерным хроматином (Donner et al., 1982). Клеточные гомологи гена v-*myc* (существует несколько близкородственных генов, составляющих семейство протоонкогенов) синтезируют после стимуляции разнообразными ростовыми факторами короткоживущую мРНК и белковые продукты (рис. 20.32) (Kelly et al., 1983). Как и в случае протоонкогенов c-*fos* продукты гена c-*myc* появляются сразу же, как только клетка переходит из фазы G_0 в фазу G_1.

Если белок myc инактивирован антителами, то клетки не пролиферируют (Studzinski et al., 1986). Однако продукты гена *myc* сами по себе еще не служат достаточным основанием для поддержания клеток в состоянии роста или перехода к злокачественности. Наилучшим объектом для оценки онкогенного потенциала вируса или генной последовательности часто служат клетки NIH3T3. Эти мышиные фибробласты легко поддерживаются в культуре в состоянии роста до тех пор, пока они не вступят в контакт с соседями со всех сторон и пока будет хватать ростовых факторов в сыворотке, где они растут. Клетки 3T3 избегают старения и становятся практически бессмертными. Однако они не злокачественны. Они сохраняют способность к контактному ингибированию, не растут в суспензии

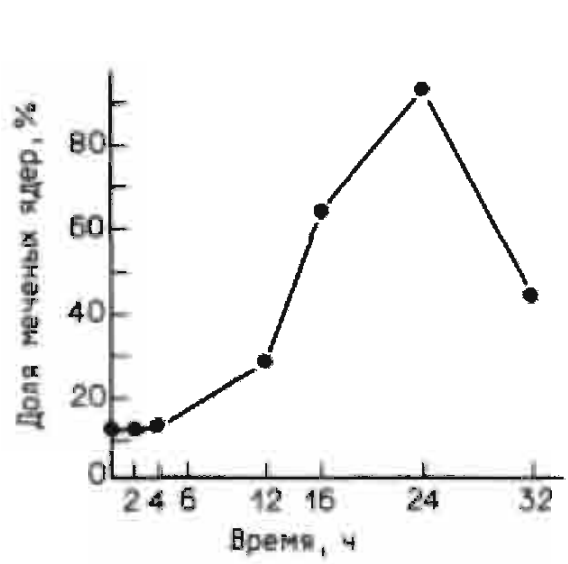




Рис. 20.32. Индукция онкогенного белка c-myc в клетках плаценты человека. *А*. Индукция экспрессии c-*myc* в ядрах культивируемых клеток трофобласта после стимуляции ФРФ во время 0. *Б*. Экспрессия c-*myc* в пролиферирующих ворсинках хориона плаценты человека, выявляемая с помощью гибридизации in situ с радиоактивной ДНК c-*myc*. В центре рисунка располагается зародыш. Область, затемненная радиоактивностью, выявляет местоположение клеток ворсинок цитотрофобласта. (*А* – из Goustin et al., 1985; *Б* – из Pfeifer-Ohlsson et al., 1984; фотография с любезного разрешения этих авторов.)

и обычно не образуют опухолей после инъекции мышам. Вместе с тем инсерция в эти клетки онкогена *myc* делает их злокачественными. Если же онкогены *myc* будут включены в первичные (смертные) фибробласты, то фибробласты трансформироваться не будут. Ленд и др. (Land et al., 1983) показали, что трансформация нормальных фибробластов может происходить в том случае, когда в одни и те же клетки встроены и онкогены *ras*, и онкогены *myc*. Очевидно, что в таких случаях злокачественная трансформация зависит от кооперации *myc* с продуктами другого онкогена или протоонкогена.

Как клеточные онкогены вступают на неверный путь

Формирование большей части человеческих опухолей обусловлено все же не вирусами. Существуют другие механизмы, посредством которых протоонкогены приобретают способность трансформировать клетку. Эти механизмы включают мутации, амплификацию генов и перестройку хромосом.

Онкогенез путем мутаций

Еще в начале шестидесятых годов было известно, что мутагены (агенты, вызывающие мутации) в то же время служат канцерогенами (агентами, вызывающими образование злокачественных опухолей). Брюс Эймс (Ames, 1979) показал, что митогенная способность данного вещества прямо пропорциональна его способности вызывать опухоли. Каким-то образом молекулы, повреждающие ДНК (судя по их способности индуцировать мутации у бактерий), приводят к формированию опухолей у мышей.

В 1982 г. Ших и Вейнберг (Shih, Weinberg, 1982) трансфицировали клетки NIH3T3, введя в них ДНК из опухолевых клеток мочевого пузыря человека (рис. 20.33). Некоторые из мышиных фибробластов захватывают человеческую ДНК, в составе которой может оказаться человеческий ген, трансформировавший клетки мочевого пузыря. Клетки NIH3T3, содержащие этот ген, начинали быстро расти и формировать очаги трансформированных клеток, которые затем были изолированы. ДНК этих клеток была выделена, фракционирована и использована для трансфекции другой группы клеток NIH3T3. Снова некоторые из клеток получили человеческий

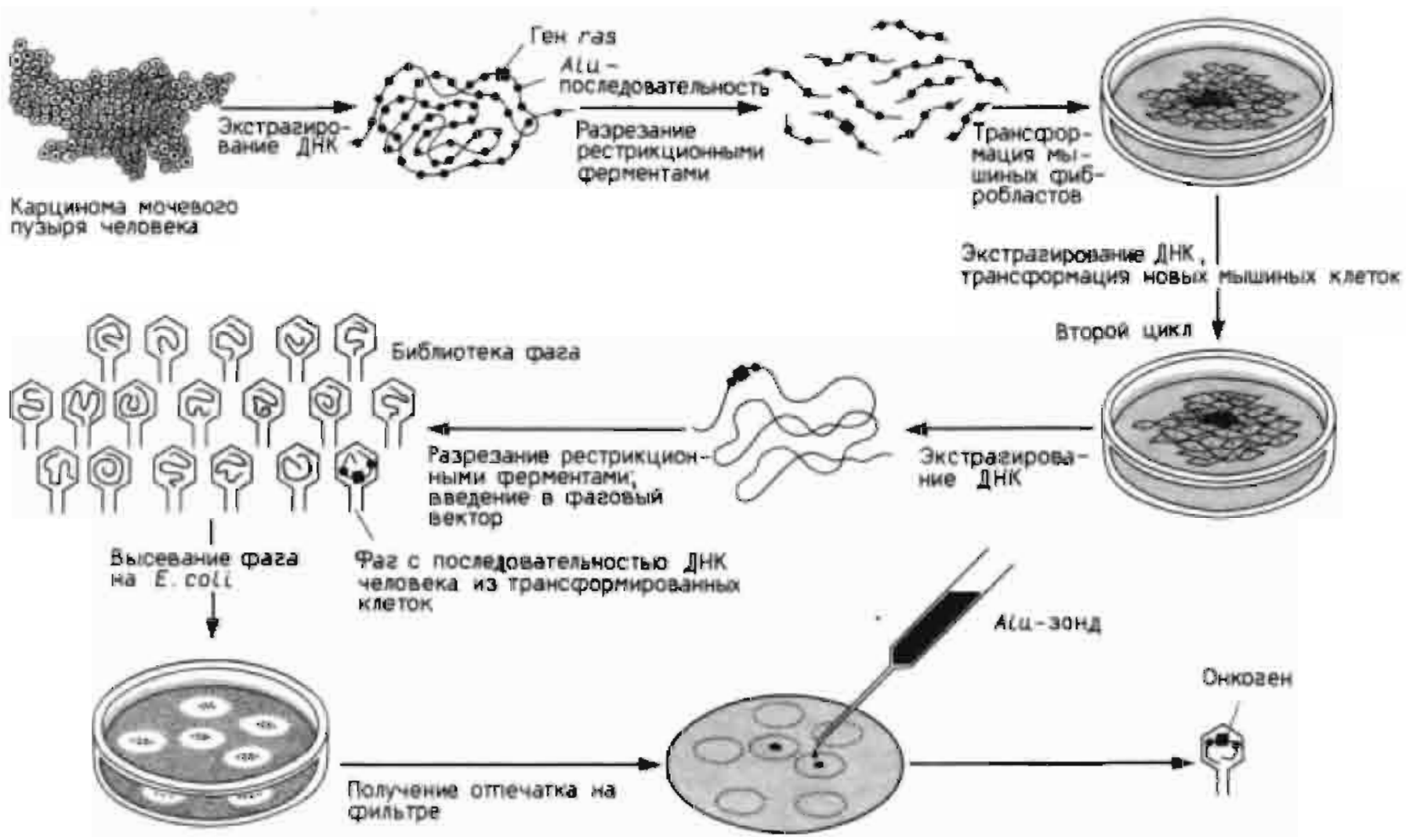


Рис. 20.33. Выделение мутантного гена *ras* из карциномы мочевого пузыря человека. Человеческая ДНК характеризуется наличием коротких повторяющихся сегментов ДНК – *Alu*-последовательностей, располагающихся по всему геному. ДНК из клеток карциномы мочевого пузыря человека экстрагировали, разрезали рестрикционными ферментами и вносили в культуру мышиных фибробластов. Мышиные клетки, включившие онкоген, становились злокачественными и образовывали скопления – клеточные островки. ДНК из этих островков также экстрагировали, расщепляли и вносили в другую чашку с мышиными фибробластами. Когда появились островки, ДНК из их клеток вновь разрезали рестрикционными ферментами и включали в фаговые векторы. Фаги размножались в культивируемых клетках *E. coli*. Когда бактериальные клетки разрушились, ДНК помещали на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизовали с радиоактивной *Alu*-последовательностью ДНК. Клоны, содержащие *Alu*-последовательность, выявляли с помощью радиоавтографии. Эта последовательность указывает на человеческое (а не мышиное) происхождение содержащей ее ДНК. Поскольку при этом велась селекция на злокачественность, можно полагать, что эти клоны содержат и онкоген, ответственный за злокачественную трансформацию клеток. Затем было произведено секвенирование человеческой ДНК.

ген, а вместе с ним и трансформированный фенотип. ДНК этих клеток была клонирована, и клоны, содержащие человеческую ДНК, были выявлены путем гибридизации ДНК. Таким образом был изолирован человеческий ген, обусловливающий способность к злокачественному росту. Оказалось, что этот ген является человеческим гомологом онкогена *ras* вируса крысиной саркомы Гарвея и Кирстена. Более того, он отличался от нормального человеческого гена только по одному нуклеотиду (Tabin et al., 1982; Capon et al., 1983). Кодон двенадцатой аминокислоты вместо ГГГ (глицинового) становился ГТГ (валиновым). Результаты экспериментов, в которых использовались другие линии опухолевых клеток человека, показали, что замены аминокислот в положениях 12, 13, 59, 61 или 63 белка, состоящего из 189 аминокислот, могут активировать его трансформирующую способность (Der et al., 1986; Levinson et al., 1986). В сходных экспериментах (Zarbl et al., 1985) крысам с пищей вводили такие хорошо известные мутагены, как нитрозометилмочевина (которая вызывает точковые мутации с заменой гуанина на аденин). Вызванные ими опухоли изолировали, а затем из их клеток выделяли ДНК. В случае опухоли молочной железы, индуцированной нитрозометилмочевиной, в двенадцатом кодоне гена c-*ras* в результате мутации происходила замена Г на А. Было обнаружено, что трансформирующая способность других протоонкогенов также активируется мутациями в кодирующем белок участке этих генов[1].

Мутации, делающие белок *ras* онкогенным, участвуют в ингибировании ГТФазной активности. В норме белок *ras* связывает ГТФ, катализируя его превращение в ГДФ, который остается с ним связанным. Эта реакция в значительной степени стимулируется образованием комплекса белка ras с **белком, активирующим ГТФазу** (БАГ). Этот белок (молекулярная масса его составляет 120 000 дальтон) повышает свою гидролизную активность более чем в 100 раз (Trahey, McCormick, 1987; Gibbs et al., 1988). Таким образом, в течение большей части времени с белком ras оказывается связанным не ГТФ, а ГДФ. ГДФ-связанная форма белка ras неактивна, а его ГТФ-связанная форма активирует другие белки. Все мутации гена *ras*, делающие его онкогенным, ингибируют ГТФазную активность БАГ. В этом случае БАГ сохраняет связь с белком ras, который благодаря своему ГТФ продолжает активно переносить митогенный сигнал к ядру (рис. 20.30; Cales et al., 1988; McCormick, 1989).

[1] Это может объяснить и возникновение лейкемии в результате радиоактивного облучения. Стронций-90, долгоживущий радиоактивный изотоп, образующийся при делении ядер атомов, может вместо кальция включиться в растущие кости. В результате он оказывается вблизи клеток красного костного мозга, служащих стволовыми клетками для лимфоцитов и других клеток крови. Высокоэнергетическая эмиссия электронов этим изотопом может послужить причиной индуцированного мутагенеза кроветворных клеток, находящихся в состоянии интенсивного деления.

Онкогенез путем амплификации генов

Еще один механизм, посредством которого протоонкогены превращаются в онкогены, – это генная амплификация. Шваб и др. (Schwab et al., 1983) обнаружили, что в клетках нейробластомы (опухоль нервной ткани) человека содержатся многочисленные копии последовательности ДНК, родственные онкогену v-*myc* (рис. 20.34). Этот ген был назван N-*myc* ("N" означает «нерв»). Имеются данные о том, что быстрая пролиферация нейробластомы связана с амплификацией протоонкогена N-*myc* (Seeger et al., 1985). Полагают, что амплифицированные гены транскрибируют большие количества мРНК для белка. Избыток матрицы *myc* обусловливает наличие бóльших количеств белка, следовательно, часть белка c-myc будет оставаться в клетке, хотя в норме он должен разрушаться. Поскольку белок myc обычно синтезируется в ответ на сигналы роста, идущие от клеточной поверхности, в случае постоянного присутствия белка c-myc ядро будет получать сигналы роста тогда, когда на самом деле их нет.

Онкогенез путем инсерции промотора

Существуют и другие пути, приводящие к нарушению регуляции транскрипции протоонкогена и перепроизводству матриц (а следовательно, и его

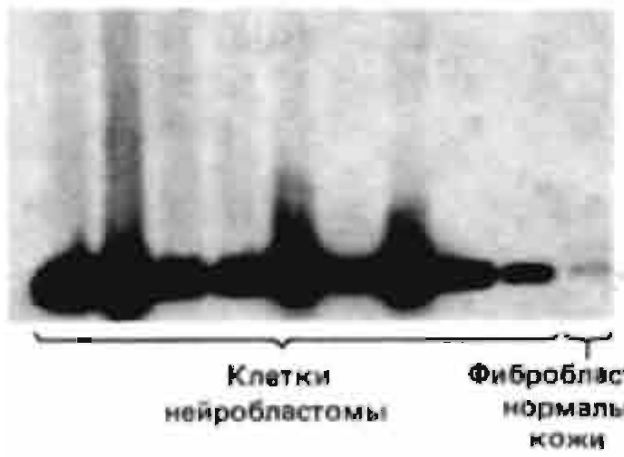


Рис. 20.34. Амплификация гена c-*myc* в клетках нейробластомы. ДНК из доброкачественных фибробластов кожи человека и девяти нейробластом человека разрушали рестрикционными ферментами, переносили на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизовали с радиоактивной ДНК *myc*. Число генов *myc* в фибробластах кожи оставалось нормальным, тогда как в клетках нейробластом происходила амплификация этих генов. (Из Schwab et al., 1983; фотография с любезного разрешения авторов.)

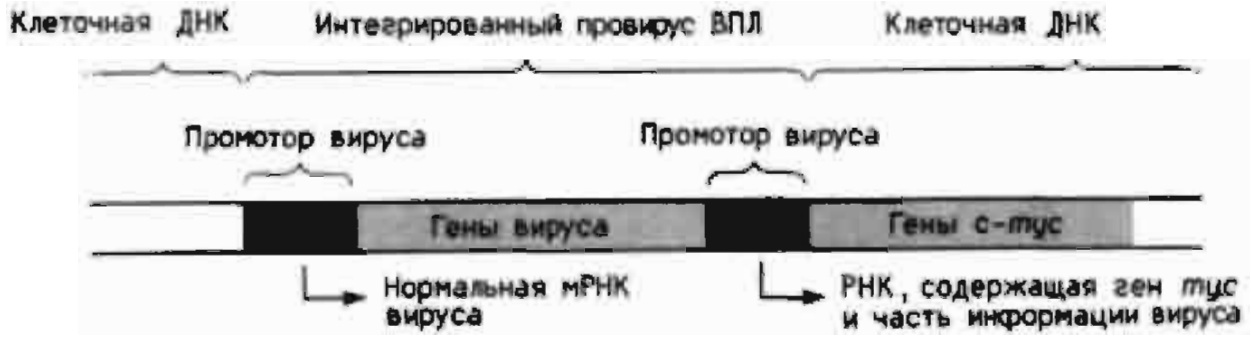


Рис. 20.35. Активация гена c-*myc* за счет промотора вируса птичьего лейкоза (*ВПЛ*). ВПЛ интегрируется в случайных местах генома хозяина, дуплицируя при этом свой промотор. Если интеграция вируса произошла в области ДНК, прилежащей к гену *c-myc*, то последний попадает под контроль «праворукого» вирусного промотора. (По Hayward et al., 1981.)

белкового продукта). Например, у цыплят некоторые опухолеродные вирусы не несут своих собственных онкогенов, а имеют сильный промотор, встроенный перед протоонкогеном; в результате протоонкоген попадает под вирусный контроль. Такой механизм называется **инсерцией промотора** (Hayward et al., 1981). Вирус птичьего лейкоза (ВПЛ) повышает транскрипцию гена c-*myc* в случае инсерции его промотора вблизи гена. При этом структура хроматина c-*myc* приобретает характерную для высокоактивных генов конформацию, чувствительную к ДНК-полимеразе I (Linial et al., 1985). Таким образом, ген c-*myc* транскрибирует гораздо больше матриц, чем это происходит при нормально идущем синтезе (рис. 20.35).

Онкогенез путем перестройки хромосом

В случае лимфоцитарных опухолей человека часто наблюдается нарушение регуляции гена c-*myc* вследствие **перестройки хромосом** (Croce, 1987). В 1979 г. на хромосомах 14, 22 и 2 были картированы три иммуноглобулиновых гена. Активность этих генов приурочена только к созреванию В-лимфоцитов и плазматических клеток. В клетках лимфомы Беркитта (опухоль, образованная трансформированными В-клетками) в результате транслокации сегмент хромосомы 8 (небольшая часть длинного плеча вблизи конца хромосомы) переносится в область этих генов (рис. 20.36). Было высказано предположение (Croce, 1985), что ген хромосомы 8 вовлечен в процесс регуляции роста, и что этот ген, будучи транслоцирован в эту область генома, попадает под контроль промотора или энхансеров иммуноглобулинового гена. Эта гипотеза подтверждается тремя аргументами. Во-первых, человеческий онкоген c-*myc*, выявляемый с помощью гибридизации in situ, локализован в том сайте хромосомы 8, который транслоцируется в эти области иммуноглобулиновых генов. Во-вторых, если из клеток лимфомы Беркитта выделить ДНК и разрезать ее ферментами рестрикции, то фрагменты, содержащие ДНК c-*myc*, обнаруживаются вместе с генами иммуноглобулинов (Leder et al., 1983). В-третьих, количество мРНК, транскрибированное с этих транслоцированных хромосом, коррелирует с активацией иммуноглобулиновых генов. Если иммуноглобулиновые гены

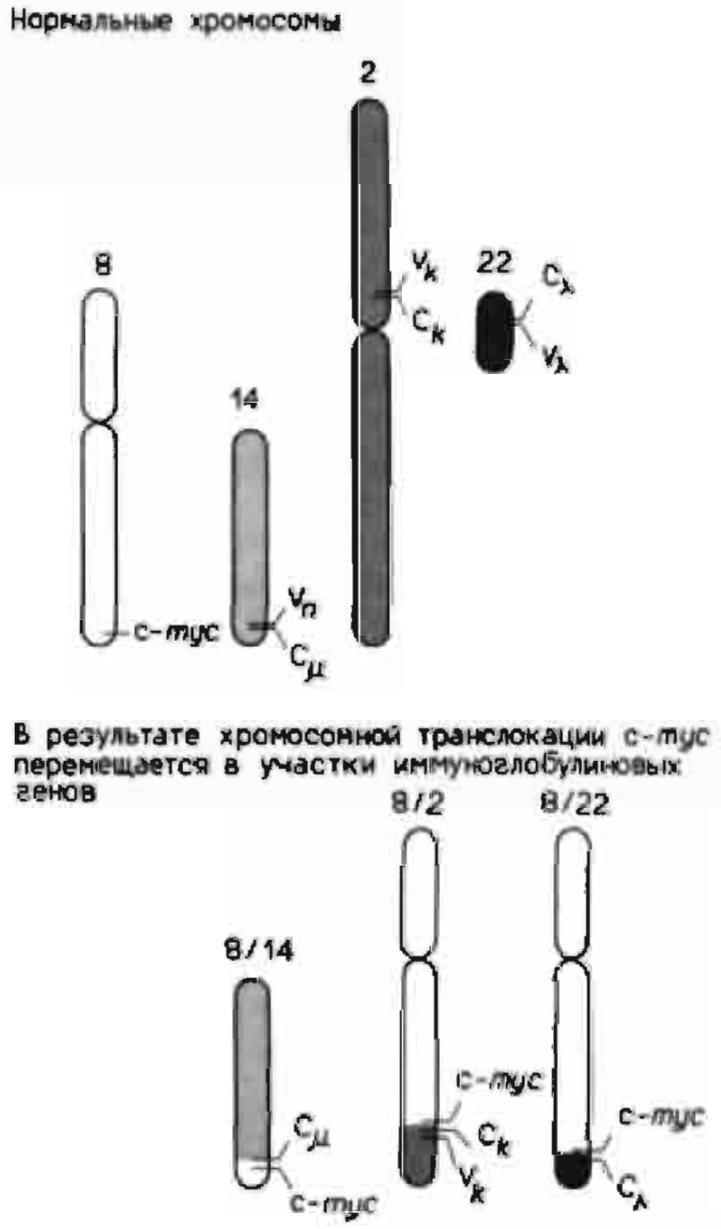


Рис. 20.36. Три хромосомные транслокации, приводящие к возникновению лимфомы Беркитта; в результате каждой транслокации ген c-*myc* (расположенный на хромосоме 8) переносится в один из трех участков иммуноглобулиновых генов (на хромосомах 14, 2 или 22). (По Adams et al., 1985; Fahrlander et al., 1985.)

выключить (это можно сделать, слив клетку лимфомы Беркитта с фибробластом), то в транслоцированной хромосоме ген c-*myc* больше не транскрибируется. Точно так же c-*myc*, по-видимому, не транскрибируется с нормальной хромосомы 8 в клетках лимфомы Беркитта (Nishikura et al., 1983; Croce et al., 1984). Активировать ген c-*myc* можно путем отделения c-*myc* от элементов, обеспечивающих его нормальную отрицательную регуляцию, или путем помещения c-*myc* вблизи энхансера иммуноглобулинового гена. Было обнаружено, что у мыши ген *myc* переносится в результате транслокации к энхансерным элементам иммуноглобулинового гена. Энхансеры стимулируют транскрипцию этих генов *myc*, что приводит к злокачественной трансформации лимфоцитов (Adams et al., 1985; Fahrlander et al., 1985).

Таким образом, протоонкогены могут быть трансформированы в онкогены по крайней мере четырьмя способами:

1. В результате точковых мутаций могут синтезироваться белки, способные нарушать регуляцию клеточного роста.
2. Амплификация протоонкогенов может привести к перепроизводству белкового продукта.
3. Инсерция вирусом нового промотора может нарушить регуляцию транскрипции онкогена, поместив его под вирусный контроль.
4. Транслокация протоонкогена в различные области генома может поместить протоонкоген под контроль различных клеточных промоторов или энхансеров.

Онкогенез путем утраты генов подавления опухолевого роста (генов-супрессоров)

Помимо перечисленных выше четырех механизмов онкогенеза существует еще пятый механизм, включающий утрату ингибитора клеточных делений. В течение нескольких десятилетий было известно, что есть семьи с предрасположенностью к некоторым видам опухолей (Knudson, 1971, 1976). Одна из таких опухолей – ретинобластома – представляет собой опухоль сетчатки и имеет как спорадическую, так и наследственную форму. Среди членов семей, в роду которых наблюдается это заболевание, обнаружено отсутствие определенного участка в длинном плече хромосомы 13 (Benedict et al., 1983). Было высказано предположение, что именно в этой области локализован ген устойчивости к ретинобластоме и что члены упомянутых семей наследуют только один нормальный аллель устойчивости к ретинобластоме, тогда как большинство людей имеют по два таких гена на клетку. Любая соматическая мутация, нарушающая функцию этого единственного оставшегося аллеля дикого типа, может стать причиной того, что индивидуальная клетка продолжит деления и даст начало опухоли.

Анализ образцов ДНК детей с такой опухолью показал, что почти все их клетки гетерозиготны по этой области (т.е. имеют только один функциональный аллель на клетку), но что в самих опухолевых клетках функциональных аллелей нет (Cavanee et al., 1983; Friend et al., 1986; Horowitz et al., 1990). Утрата генов-супрессоров ретинобластомы, называемых *RB1*, может быть вызвана точковой мутацией или делецией. Для подавления клеточного деления клетке нужна, по-видимому, только одна копия этого гена. Таким образом, *RB1* можно считать геном-супрессором опухоли, полная утрата которого запускает онкогенез.

Белок, кодируемый этим геном, представляет собой фосфопротеин с молекулярной массой 105 килодальтон, способный связывать ДНК, и фосфорилирование которого зависит от стадии клеточного цикла (Lee et al., 1987). Белок RB локализован в ядре и относительно нефосфорилирован в покоящихся клетках (находящихся в фазах G_1 или G_0). Однако во время фазы S почти весь белок становится фосфорилированным по нескольким сериновым и треониновым сайтам (DeCarpio et al., 1989; Buchkovich et al., 1989; Chen et al., 1989). Возможно, что дефосфорилированная форма белка RB блокирует вхождение клетки в фазу S, а фосфорилирование белка устраняет этот блок. (Так же, как этот блок устраняло бы и отсутствие белка.) Такая модель прямо связана с гипотезой контроля клеточного деления протеинкиназами. Ген *RB* был клонирован, и его введение в культивируемые клетки ретинобластомы вызывало замедление их роста и восстановление его нормального характера (Huang et al., 1988). Аномалии этого гена обнаружены не только в клетках ретинобластомы, но и в некоторых других опухолях. Последние данные (Robbins et al., 1990) свидетельствуют о том, что функционирование белка RB вызывает ингибирование транскрипции гена c-*fos*. Последний кодирует фактор транскрипции, необходимый для перехода клетки из фазы G_0 в фазу G_1. Таким образом, белок RB предотвращает деление клеток.

Важность белка RB подтверждается также тем, что он служит мишенью для трансформирующих белков разных опухолеродных вирусов. Высокомолекулярный T-белок вируса SV-40, белок E1A аденовируса и, вероятно, белок E7 вируса папилломы человека, – все они связываются с нефосфорилированным (предположительно, активным) белком RB (Cooper, Whyte, 1989). Эти белки опухолеродных вирусов могут проявлять свое действие путем функционального устранения клеточного белка RB, следствием чего являются непрекращающиеся клеточные циклы.

Злокачественный фенотип часто оказывается результатом многих мутаций. В культивируемых клетках для появления злокачественности необходимы, как это уже обсуждалось ранее, по крайней мере два гена (например, ген *ras*, кодирующий цитоплазматический белок, и ген *myc*, кодирующий какой-то ядерный фактор). В случае некоторых типов злокачественных опухолей, таких, например, как ретинобластома, достаточно, по-видимому, удаления всего лишь одной пары генов, для того чтобы клетка малигнизировалась. Однако в большинстве случаев образование опухоли представляет собой более сложный процесс, и малигнизация клеток включает как активацию некоторых онкогенов, так и элиминацию опухолевых генов-супрессоров, например гена *RB1*. Такая ситуация характерна для медленно растущих опухолей, которые проходят в своем развитии ряд стадий. Фогельштейн и др. (Vogelstein et al., 1989) провели исследование хромосом в ходе развития рака прямой кишки. В этом случае клетки, утратившие часть хромосомы 5, переходят к более быстрому росту и становятся незлокачественными аденомами. Переход от аденомы к карциноме (когда клетки становятся злокачественными и проникают в стенку прямой кишки) совпадает с активацией гена *ras* путем мутации и утратой некоторых частей хромосом 18 и 17. Поскольку обе копии гена-супрессора опухоли должны подвергнуться делеции, необходимо, чтобы произошло не менее дюжины хромосомных изменений, прежде чем нормальная клетка трансформируется в злокачественную опухолевую.

Продукты этих генов-супрессоров опухоли могут быть соотнесены с фенотипами, которые экспрессируют трансформированные клетки. Ген-супрессор опухоли, локализованный на хромосоме 18, идентифицирован (Fearon et al., 1990); оказалось, что он сходен с известными генами молекул клеточной адгезии N-МКА и фасцилина II. Этим можно объяснить анархизированную морфологию ткани аденомы и карциномы, дедифференцировку их клеток и нарушение нормальных клеточных контактов. Ген-супрессор опухоли обнаружен в клетках почки хомячка; вероятно, он связан с подавлением ангиогенеза (см. гл. 6). В случае делеции этого гена клетка приобретает способность секретировать фактор, индуцирующий формирование кровеносных сосудов (Rastinejad et al., 1989).

Не всегда одни и те же гены, подавляющие развитие опухоли, активны в одной и той же клетке. Так, ген-супрессор опухоли, локализованный на хромосоме 17, который также выделен, не обнаружен при разных типах рака прямой кишки и в мелкоклеточной карциноме легкого. *RB1*-ген-супрессор опухоли не влияет на образование этих опухолей, но имеет важное значение для остановки роста остеосарком. Корреляция различных событий, происходящих на уровне хромосом, с развитием клетки в направлении злокачественности является многообещающим способом диагностики стадии развития опухоли и предсказания возможности злокачественной трансформации клетки.

Старение

В процессе развития организм проходит путь от стадии одноклеточной зиготы к зрелости. Но что происходит потом? Является ли **старение** также запрограммированным событием? Ответ на этот вопрос неоднозначен, однако все соглашаются с утверждением, что в возрастных изменениях важную роль играют факторы, регулирующие развитие. Старение предполагает прогрессирующую и необратимую утрату функций, что повышает вероятность смерти. Эти изменения могут быть постепенными (как у человека) или внезапными и резкими (как у поденок или лососей). Кроме того, не все изменения, связанные со старением, происходят одновременно. Многие животные не доживают до того возраста, когда у них появляются признаки старения. Дожить до такого возраста – привилегия тех, кто находится на вершине пищевых пирамид. Полевая мышь (*Mus musculus*) в лабораторных условиях живет около 3–4 лет, но в природе мыши этого возраста не встречаются никогда. Свыше 99% мышей погибают, не «отметив» свой первый день рождения. Мыши достигают половой зрелости в возрасте около 6 нед и максимальных размеров в пределах 3 мес. Даже период беременности длится у них только 20 дней.

Можно полагать, что последовательность событий при старении регулируется ходом развития. Особенно четко эта зависимость прослеживается у поденок и лососевых рыб, погибающих практически сразу же после спаривания, но и другие организмы дают достаточно показательные примеры. В человеческих популяциях благодаря успехам в области здравоохранения и развитию медицинской науки значительно увеличилась продолжительность жизни отдельного человека по сравнению с ожидаемой (**ожидаемая продолжительность жизни**); однако это не увеличило **максимальную продолжительность,** являющуюся видовым признаком. Едва ли можно ожидать, что человек проживет намного больше 95 лет. На рис. 20.37 представлены кривые ожидаемой продолжительности жизни для нескольких человеческих популяций. Во всех случаях максимальная продолжительность жизни составляет 90–100 лет. Кривые для наиболее благополучных популяций, в которых инфекционные заболевания как основной фактор смертности сведены на нет, приближаются к идеальной «прямоугольной» кривой, отражающей

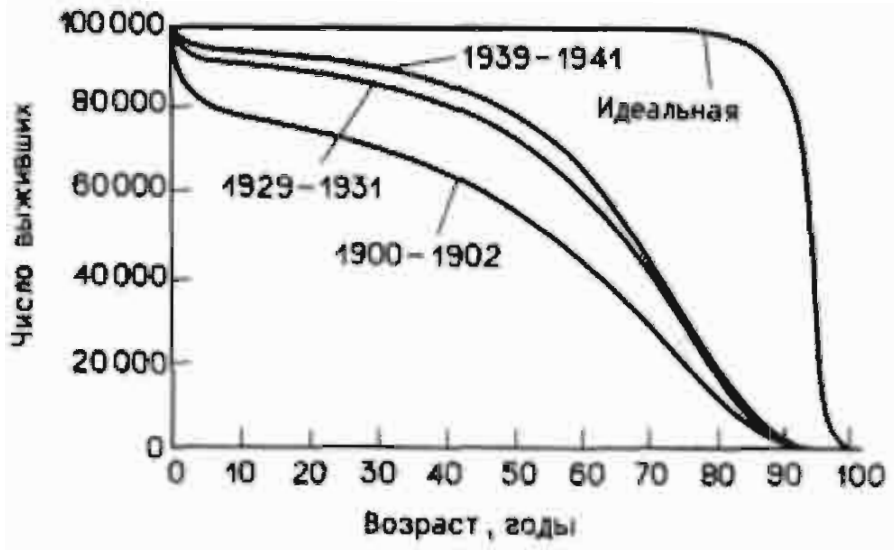


Рис. 20.37. Кривые выживания белых мужчин – граждан США – в разные периоды американской истории. Верхняя кривая – условная идеальная кривая, отражающая ситуацию, в которой не учитывается смерть от несчастных случаев или болезней, и принимается во внимание лишь смерть, наступившая в результате физиологического старения. Три нижние кривые свидетельствуют о том, что, несмотря на улучшение состояния здравоохранения от 1900 к 1941 году, продолжительность жизни самых старых индивидуумов не изменилась. (По Hayflick, 1980.)

Таблица 20.4. Максимальная продолжительность жизни некоторых приматов

Вид	Максимальная продолжительность жизни, годы
Тупайя	7
Игрунка	15
Беличья обезьяна	21
Макак резус	29
Павиан	36
Гиббон	32
Орангутан	50
Горилла	40
Шимпанзе	45
Человек	95

Из Cutler, 1979.

условия, при которых продолжительность жизни всех индивидуумов достигает биологически обусловленных пределов. Чем более неблагополучна популяция, тем больше особей умирает до достижения этого возраста. На протяжении большей части истории человечества средняя продолжительность жизни составляла 35–40 лет. (Такой продолжительностью характеризовались некоторые сообщества в США еще в 1902 г.) В текущем столетии ожидаемая продолжительность жизни в США достигла среднего значения 74,6 года, но *максимальная* продолжительность жизни не изменилась.

Медавар и некоторые другие исследователи (см. Cutler, 1979) считают, что эволюционный прессинг работает на отбор таких сроков жизни, которые бы давали возможность организму оставить потомство, а в некоторых случаях и вырастить его, после чего он погибает. Условия, определявшие эволюцию разных животных, варьируют. В табл. 20.4 приведена максимальная продолжительность жизни у приматов. Человек (вероятно, наиболее долгоживущее существо из всех когда-либо населявших Землю млекопитающих) характеризуется продолжительностью жизни в 14 раз большей, чем самый короткоживущий из приматов. Генетический контроль над продолжительностью жизни очевиден и в случае некоторых мутаций, следствием которых является преждевременное старение (Brown, 1985). При **прогерии** (синдроме Хатчинсона-Джилфорда) признаки старения наблюдаются в течение первого года жизни ребенка. Когда эти дети умирают (обычно от сердечной недостаточности в возрасте 12 лет), оказывается, что их кожа, распределение волос и жира несут признаки, характерные для пожилых.

Старение сопровождается многочисленными изменениями, и хотя установить корреляцию этих изменений с возрастом не составляет особого труда, очень сложно определить, какие из них служат причиной старения, а какие – следствием. Природа некоторых изменений представляется органической, они вызываются постепенным накоплением в организме токсичных веществ. Примером может быть атеросклероз («отвердение» стенок артерий), при котором отложение холестерина на стенках артерий может блокировать ток крови. Первопричиной других возрастных явлений служат изменения на уровне клеток, например изменения иммунного клеточного ответа в стареющем организме. И пожилые люди, и старые мыши подвержены инфекциям (их иммунный ответ не достаточен для разрушения чужеродных организмов) или аутоиммунным заболеваниям (при которых реакция иммунной системы направляется против собственного тела). Причину этих явлений можно проследить до перерождения тимуса. По мере старения организма ткань тимуса постепенно замещается жировой тканью. Уровень гормонов тимуса снижается и к 60 годам их практически невозможно выявить. Одновременно у пожилых людей снижается число Т-клеток (Bender, 1985), причем эти старые Т-клетки не могут осуществлять своих функций так эффективно, как Т-клетки более молодых особей. Т-клетки пожилых здоровых индивидуумов, стимулированные антигенами или митогенами, что в норме вызывает деление Т-клеток, вдвое по сравнению с Т-клетками молодых индивидуумов снижают свою митотическую активность (Weksler, 1983). Таким образом, пожилые люди обладают меньшим количеством Т-клеток, и эти клетки менее активны. Поскольку функции Т-клеток направлены как на разрушение чужеродных орга-

низмов, так и на предотвращение любого иммунного ответа, направленного против собственных тканей, утрата Т-клеток может оказаться важным фактором старения человека.

В случае В-клеток (клеток, ответственных за синтез антител) также наблюдается и снижение их числа, и снижение их синтетической активности по мере старения организма. Например, наибольшая частота заболевания столбняком среди пожилых людей объясняется недостатком противостолбнячных антител в сыворотке этих людей. Подтверждением служат эксперименты Кишимото и его коллег (Kishimoto, 1982), которые культивировали В-клетки молодых и старых доноров с Т-клетками человека, недавно получившего инъекцию живой вакцины с целью поднять у него титр противостолбнячных антител. «Старые» В-клетки синтезировали гораздо меньше антител против столбнячного токсина, чем «молодые». Дальнейшие исследования показали, что этот результат отчасти является следствием пятикратного уменьшения числа В-клеток, способных реагировать на столбнячный антиген.

Дефект Т-клеток и В-клеток, вероятно, связан с клеточным делением и способностью реагировать на экзогенные факторы роста. Стимулированные антигеном Т-клетки старых мышей и пожилых людей имеют меньше рецепторов для фактора роста Т-клеток интерлейкина-2 и сниженную способность к «кэппингу» своих поверхностных рецепторов (Noronha et al., 1980; Brohee et al., 1982). Те же «старые» Т-клетки, которые еще способны делиться, характеризуются значительно более длительным временем деления и часто не заканчивают первого деления (Hefton, Weksler, 1981; Hefton et al., 1980).

Поскольку старение в значительной степени может быть обусловлено подобными клеточными процессами, одним из основных способов изучения этого явления стали наблюдения над изменениями фибробластов, культивируемых вне организма. В отличие от большинства незлокачественных эпителиальных, нервных клеток и лимфоцитов, не растущих в культуре, фибробласты обладают способностью делиться примерно один раз в сутки. Среда, в которой культивируются эти клетки, поддерживается постоянной, поэтому закономерен вопрос, будут ли они подвергаться старению без воздействий со стороны стареющих иммунной, сердечно-сосудистой и эндокринной систем. Хейфлик и Мурхед (Hayflick, Moorhead, 1961) обнаружили, что фибробласты в культуре действительно подвергаются своего рода старению. Эти авторы показали, что культивируемые фибробласты, полученные от человеческого эмбриона, имеют определенную ограниченную продолжительность жизни, которую можно разделить на три стадии (рис. 20.38). Первая – стадия медленного роста, когда происходит адаптация клеток к условиям культивирования. За этой lag-фазой следует фаза логарифмического роста, когда клетки делятся каждые 21 ч. Через 40–50 делений клеточный цикл удлиняется. Затем клетки прекращают деление и задерживаются в фазе G_1 клеточного цикла. Некоторые из них не «подчиняются» такой участи и путем какого-то пока еще неизвестного механизма дают «бессмертные» клеточные линии, бóльшая часть которых (за исключением таких клеток, как NIH3T3) становится злокачественными.

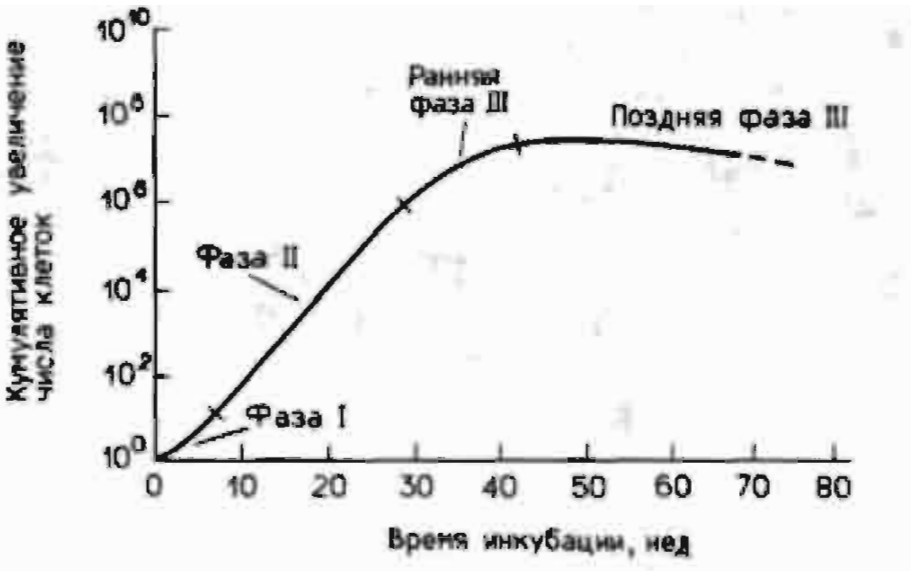


Рис. 20.38. Жизненный цикл культивируемых диплоидных фибробластов человека. После lag-фазы (фаза I) наступает период быстрого логарифмического роста (фаза II), затем клетки прекращают делиться (фаза III). (Из Matsumura et al., 1979.)

Как и следовало ожидать, фибробласты, полученные от пожилых индивидуумов, делятся на протяжении меньшего периода времени, чем фибробласты, полученные от молодых (Schneider, Mitsui, 1976; Martin et al., 1986) и характеризуются более длинным клеточным циклом (около 24,3 ч). Кроме того, представляется, что фибробласты «запоминают», сколько делений они уже совершили. Если человеческие фибробласты, замороженные на несколько лет после их двадцатого деления, возвратить в нормальные условия, то они делятся еще примерно 30 раз. «Часы», определяющие ход событий при старении, находятся, по-видимому, в ядре. Маггилтон-Харрис и Хейфлик (Muggleton-Harris, Hayflick, 1976) трансплантировали ядра «молодых» (10 делений) фибробластов в энуклеированную цитоплазму «старых» (30 делений) фибробластов, и наоборот. Число последующих делений в таких гибридных клетках контролировалось ядрами (рис. 20.39).

В чем причины прекращения делений? Было показано (Phillips et al., 1984), что по мере того, как фибробласты проходят повторные клеточные деления, они утрачивают способность реагировать на нормальные физиологические стимуляторы митозов фибробластов – ФРТ, ЭФР, инсулин и трансферрин.

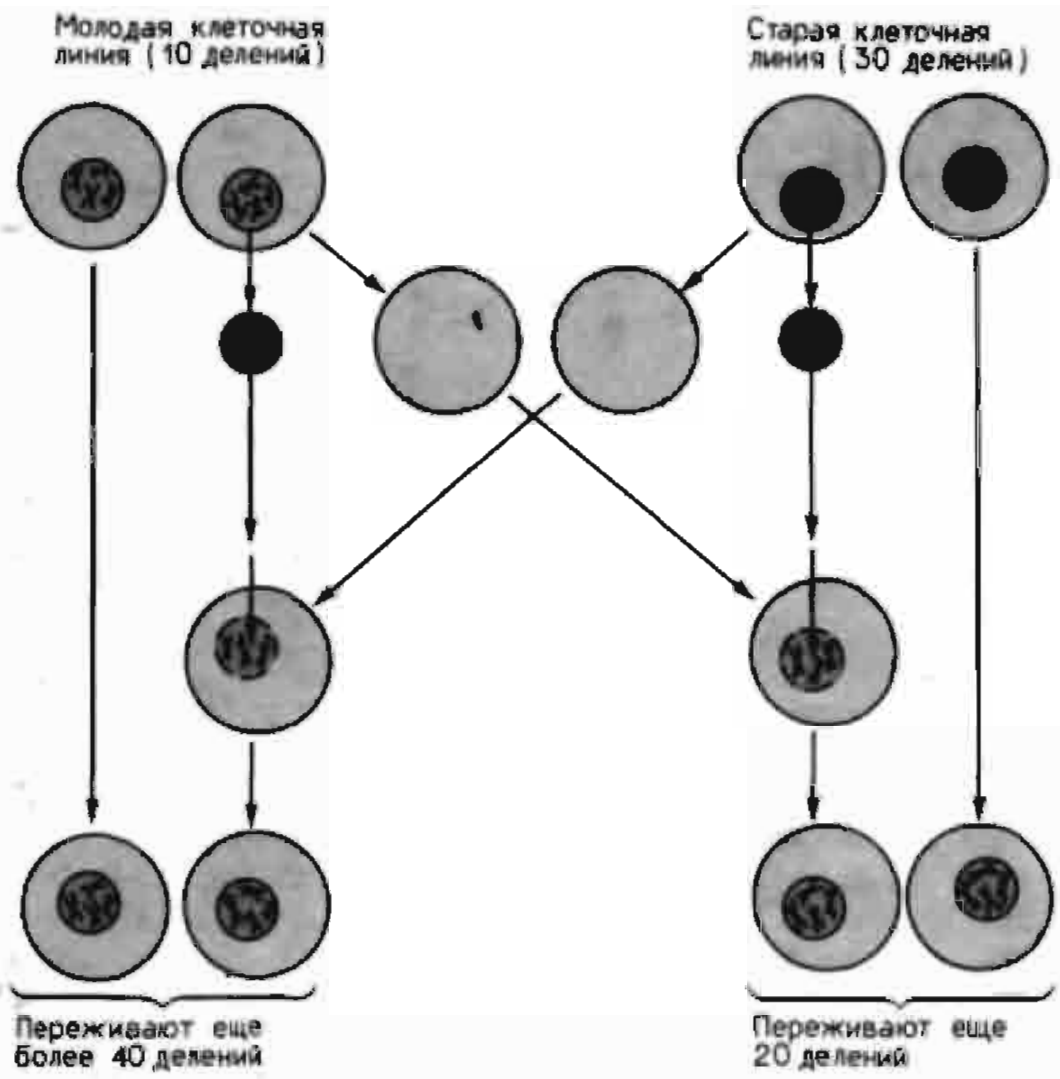


Рис. 20.39. Ядерный контроль старения. При трансплантации старых ядер в молодые клетки и наоборот возраст ядра, а не цитоплазмы контролирует число последующих делений. (Из Hayflick, 1980.)

Из рис. 20.40 видно, что молодые клетки с легкостью переходят к синтезу ДНК после стимуляции этими экзогенными факторами роста, тогда как клетки старшего возраста не реагируют на их даже в 1000 раз большую концентрацию. Несмотря на то что число рецепторов ЭФР с возрастом, очевидно, не изменяется, их способность фосфорилировать себя и другие белковые субстраты резко падает (Carlin et al., 1983; Phillips et al., 1983). Критическое значение может иметь индукция белка fos. Этот фактор транскрипции обычно индуцируется фактором роста тромбоцитов и экспрессируется при переходе клетки от G_0 к G_1. В старческих клетках ген *fos* не транскрибируется и клетка необратимо погружается в состояние G_0 (Seshardi, Campisi, 1990). Для фибробластов больных с определенными старческими синдромами также характерна сниженная реакция на ЭФР и ФРТ (Bauer et al., 1986). По-видимому, старение в значительной степени связано с неспособностью клеток отвечать на экзогенные факторы, необходимые для роста и поддержания организма.

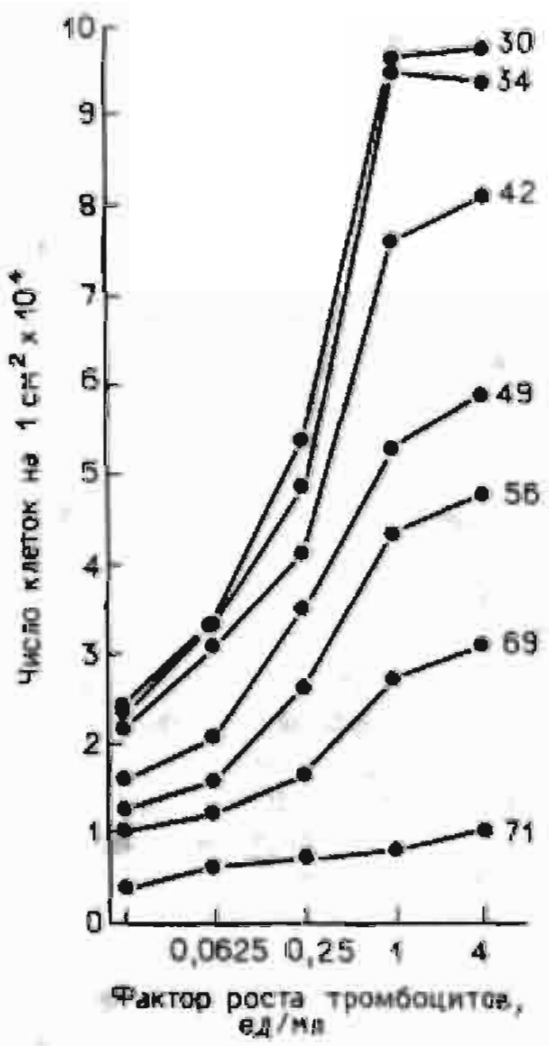


Рис. 20.40. Способность культивируемых человеческих фибробластов отвечать на фактор роста тромбоцитов (ФРТ). Через два дня культивирования добавлен ФРТ. Молодые клетки (прошедшие до 42 циклов) активно реагируют на относительно небольшие количества ФРТ, для сравнительно пожилых клеток (49–69 циклов) требуется большее количество ФРТ, а очень старые клетки (71 цикл) вообще не реагируют на ФРТ. (Из Fillips et al., 1984.)

Дополнительные сведения и гипотезы

Механизмы старения

Мы не знаем, какие причины вызывают старение клеток. Один из возможных механизмов предлагает **теория соматических мутаций** (Burnet, 1974; Holliday, Kirkwood, 1981), согласно которой считают, что с возрастом, по мере того как клетки делятся, происходит постепенное накапливание мутаций. Теория **ошибок в синтезе белка** (или **катастрофы ошибок**) (Orgel, 1973) постулирует, что ошибки в белоксинтезирующем аппарате клетки сами по себе достаточны для возникновения эффектов старения. При этом трудно провести границу между этими теориями, поскольку, если справедлива модель катастрофы ошибок, то следует ожидать немедленного появления новых соматических мутаций в результате неправильного синтеза ДНК-полимеразы (Holliday, Kirkwood, 1983). Причиной таких мутаций (будь они общего происхождения или вызваны ошибочным синтезом белка) могут служить свободные радикалы или другие молекулы, способные вызвать нарушения в структуре ДНК. Между продолжительностью жизни вида-донора клеток и способностью поврежденной ДНК к репарации (Nette et al., 1984) установлена корреляция, однако другие исследователи (Krystal et al., 1983) не обнаружили снижения активности репарации по мере старения организма, являющегося источником клеток.

В соответствии с приведенными выше моделями старение оказывается результатом весьма случайных атак на ДНК. Вместе с тем не так давно получены данные о том, что в определенный момент жизни клетки ядро синтезирует анти-пролиферативные мРНК, которые активно препятствуют дальнейшим делениям (Lumpkin et al., 1986). Несколько ранее Перейра-Смит и др. (Pereira-Smith et al., 1985) обнаружили, что связанный с мембраной белок, выявляемый только в старческих клетках, при переносе его в молодые клетки ингибирует инициацию синтеза ДНК. Это свидетельствует о существовании «гена старения». Лампкин и др. (Lumpkin et al., 1986) выделили поли(А)-содержащую цитоплазматическую РНК (предположительно, мРНК) из молодых и старых человеческих фибробластов и инъецировали ее в цитоплазму молодых клеток, рост которых был приостановлен удалением сывороточных факторов роста из культуральной среды. После внесения сывороточных факторов те клетки, которым была сделана микроинъекция «молодой» мРНК, снова приступали к делению (97% от контроля), тогда как клетки, в которые инъецировали «старую» мРНК, не переходили к делению (24% контрольного значения). Таким образом, не исключено, что старение представляет собой не случайный клеточный процесс, но процесс, находящийся под активным контролем в ходе развития организма.

Характер роста организма можно изучать на любом уровне – от молекулярного до организменного. Поскольку различные методические и концептуальные подходы препятствуют объединению этих направлений исследования, представления о явлении роста у физиологов, анатомов и специалистов в области клеточной биологии различаются. Биологи развития должны учитывать все эти разнообразия концепций роста и стремиться к их максимальному синтезу. Появившееся в восьмидесятых годах учение об онкогенах создало основы для интеграции представлений о росте у клеточных биологов и физиологов. Можно полагать, что в недалеком будущем с позиции этих новых идей можно будет объяснить ускорения аллометрического роста и другие явления на организменном уровне. Во всяком случае утверждение Джозефа Нидхема, высказанное им в 1951 г., справедливо и сегодня:

> «До тех пор, пока нам не удастся связать условно выделенные уровни организации, сохранится определенная бессмысленность в отношении генетической предопределенности размеров и формы или математических уравнений спиралей или многогранников. Объединенная наука о жизни должна с неизбежностью искать пути, которые позволят понять, каким образом один уровень связан с другими».

ЛИТЕРАТУРА

Adams J. M. and 7 others. (1985). The *c-myc* oncogene by immunoglobulin enhancers induce lymphoid malignancy in transgenic mice, Nature, **318**, 533–538.

Adamson E. (1987). Oncogenes on development, Development, **99**, 449–471.

Adebonojo F. O. (1975). Studies on human adipose cells in culture: relation of cell size and cell multiplication to donor age, Yale J. Biol. Med., **48**, 9–16.

Alberch P., Gould S. J., Oster G. F., Wake D. B. (1979). Size and shape in ontogeny and phylogeny, Paleobiology, **5**, 296–317.

Ames B. (1979). Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer, Science, **104**, 587–593.

Avers C.M. (1985). Molecular Cell Biology, Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.
Baserga R. (1985). The Biology of Cell Reproduction, Harvard University Press, Cambridge, MA.
Bauer E.A., Silverman N., Busick D.F., Kronbergan A., Deuel T.F. (1986). Diminished response of Werner's Syndrome fibroblast to growth factors PDGF and EGF, Science, **234**, 1240–1243.
Beemon K., Hunter T. (1977). In vitro translation yields a possible Rous sarcoma virus *src* gene product, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3302–3306.
Bell R.M. (1986). Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers, Cell, **45**, 631–632.
Bender B.S. (1985). B lymphocyte function in aging, Rev. Biolog. Res. Aging, **2**, 143–154.
Betsholtz C., Westermark B., Ek B., Heldin C.H. (1984). Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: Implications for autocrine receptor activation, Cell, **39**, 447–457.
Bohmann D., Bos T.J., Admon A., Nishimura T., Vogt P., Tjian R. (1987). Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1, Science, **238**, 1386–1392.
Brohee D., Kennes B., Neve P. (1982). Increased stability of E-rosettes and restricted capping of sheep erythrocytes by lymphocytes of aged humans, Mech. Aging Dev., **18**, 47–52.
Brook C.G.D. (1972). Evidence for a sensitive period in adipose-cell replication in man, Lancet, **2**, 624–627.
Brooks W.K. (1886). Report on the Stomatopoda collected by H.M.S. Challenger, Challenger Report, **16**, 1–114.
Brown W.T. (1985). Genetics of human aging, Rev. Biol. Res. Aging, **2**, 105–114.
Bruce S.A., Deamond S.F., Tso P.O.P. (1986). In vitro senescence of Syrian Hamster mesenchymal cells of fetal to adult origin: Inverse relationship between in vivo donor age and in vitro proliferative capacity, Mech. Aging Dev., **34**, 151–173.
Brugge J.S., Erikson R.L. (1977). Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus, Nature, **269**, 346–348.
Bullough W.S., Laurence E.B. (1960). The control of epidermal mitotic activity in the mouse, Proc. R. Soc. (London), **B**, **151**, 517–536.
Bullough W.S., Laurence E.B., Iverson O.H., Elgjo K. (1967). The vertebrate epidermal chalone, Nature, **214**, 578–580.
Burnet F.M. (1974). Intrinsic Mutagenesis: A Genetic Approach to Aging, Wiley, New York.
Capon D.J., Chen E.Y., Levinson A.D., Seeburg P.H., Goeddel D.V. (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue, Nature, **302**, 33–37.
Carlin C.R., Phillips P.D., Knowles B.B., Cristofalo V.J. (1983). Diminished in vitro tyrosine kinase activity of senescent human fibroblasts, Nature, **306**, 617–620.
Cohen S., Carpenter G., King L., Jr. (1980). Epidermal growth factor–receptor protein kinase interaction, J. Biol. Chem., **255**, 4834–4842.
Conscience J.-F., Verrier B., Martin G. (1986). Interleukin-3-dependent expression of the *c-myc* and *c-fos* proto-oncogenes in hemopoietic cells, EMBO, J., **5**, 317–323.
Copeland N.G., Zelenetz A.D., Cooper G.M. (1979). Transformation of NIH/3T3 cells by DNA of Rous sarcoma virus, Cell, **17**, 993–1002.
Croce C.M. (1985). Chromosomal translocations, oncogenes, and B-cell tumors, Hosp. Pract., **20(1)**, 41–48.
Croce C.M. (1987). Role of chromosome translocations in human neoplasia, Cell, **49**, 155–156.
Croce C.M., Thierfelder W., Erikson J., Nishikura K., Finan J., Lenoir G.M., Nowell P.C. (1984). Transcriptional activation of an unarranged and untranslocated *c-myc* oncogene by translocation of a *Cλ* locus in Burkitt lymphoma cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 6922–2926.
Cutler R.G. (1979). Evolution of human longevity: A critical overview, Mech. Aging. Dev., **9**, 337–354.
Der C.J., Finkel T., Cooper G.M. (1986). Biological and biochemical properties of human ras^H genes mutated at codon 61, Cell, **44**, 167–176.
Doehmer J., Barinaga M., Yale W., Rosenfeld M.G., Verma I.M., Evans R.M. (1982). Introduction of rat growth hormone gene into fibroblasts via a retroviral DNA vector: Expression and regulation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 2268–2272.
Donner P., Greiser-Wilka I., Moelling K. (1982). Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus, Nature, **296**, 262–266.
Doolittle R.F., Hunkapiller M.W., Hood L.E., Devare S.G., Robbins K., Aaronson S.A., Antoniades H.N. (1983). Simian sarcoma virus *one* gene, v-*sis*, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor, Science, **221**, 275–277.
Downward J., and 8 others. (1984). Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-*erb-B* oncogene protein sequences, Nature, **307**, 521–527.
Duesberg P.H. (1983). Retroviral transforming genes in normal cells? Nature, **304**, 219–225.
Ebina Y., and 8 others. (1985). The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling, Cell, **40**, 747–758.
Eden S., Isaksson O.G.P., Madsen K., Friberg U. (1983). Specific binding of growth hormone to isolated chondrocytes from rabbit ear and epiphyseal plate, Endocrinology, **112**, 1127–1129.
Einat M., Resnitzky D., Kimsky A. (1985). Close link between reduction of *c-myc* expression by interferon and G_0/G_1 arrest, Nature, **313**, 597–600.
Erikson R.L., Collett M.S., Erikson E.L., Purchio A.F. (1979). Evidence that avian sarcoma virus transforming gene product is a cyclic AMP-independent protein kinase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 6260–6264.
Fahrlander P.D., Sümegi J., Yang J.-Q., Weiner F., Marcu K.B., Klein G. (1985). Activation of the *c-myc* oncogene by the immunoglobulin heavy chain gene enhancer [after multiple] switch region-mediated chromosome rearrangements in a murine plasmacytoma, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 3746–3750.
Finkel T., Cooper G.M. (1984). Detection of a molecular complex between *ras* proteins and a transferrin receptor, Cell, **136**, 1115–1121.
Gonda T.J., Metcalf D. (1984). Expression of *myb*, *myc*, and *fes* proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukemia, Nature, **310**, 249–251.
Goss R.J. (1966). Hypertrophy versus hyperplasia, Science, **153**, 1615–1620.
Goss R.J. (1978). The Phylosophy of Growth, Academic, New York.
Gould S.J. (1966). Allometry and size in ontogeny and phylogeny, Biol. Rev., **41**, 587–640.
Gould S.J. (1971). Geometric similarity in allometric growth: A contribution to the problem of scaling in the evolution of size, Am. Natur., **105**, 113–136.
Gould S.J. (1974). The origin and function of "bizarre" structures: Antler size and skull size in the "Irish Elk", *Megalocerus giganteus*, Evolution, **28**, 191–220.
Goustin A.S., and 9 others. (1985). Coexpression of the *sis* and *myc* proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth, Cell, **41**, 301–312.
Greenberg M.E., Ziff E.B. (1984). Simulation of 3T3 cells induces transcription of *c-fos* proto-oncogene, Nature, **311**, 433–438.

Hanafusa H., Halpern C.C., Bucchagà D.L., Kawai S. (1977). Recovery of avian sarcoma virus from tumors induced by transformation-defective mutants, J. Exp. Med., **146**, 1735–1747.

Hayflick L. (1979). Progress in cytogerontology, Mech. Aging Dev., **9**, 393–408.

Hayflick L. (1980). The cell biology of human aging, Sci. Am., **242(1)**, 58–65.

Hayflick L., Moorhead P.S. (1961). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, Exp. Cell Res., **25**, 585–621.

Hayman M.J., Ramsay G.M., Savin K., Kitchener G., Graf T., Beug H. (1983). Identification and characterization of the avian erythioblastosis virus *erb*-B gene product as a membrane glycoprotein, Cell, **32**, 579–588.

Hayward W., Neel B.G., Astrin S. (1981). Activation of a cellular *onc* gene by promoter insertion on ALV-induced lymphoid leukosis, Nature, **290**, 475–480.

Heard J.M., Roussel M.F., Rettenmeier C.W., Sherr C.J. (1987). Multilineage hematopoietic disorders induced by transplantation of bone marrow cells expressing, the v-*fms* oncogene, Cell, **51**, 663–673.

Hefton J.M., Darlington G., Casazza B.A., Weksler M.E. (1980). Immunological studies of aging. V. Impaired proliferation of PHA-responsive human lymphocytes in culture, J. Immunol., **125**, 1007–1010.

Hefton J.M., Weksler M.E. (1981). The study of immune function in aged humans. In: W.H. Adler and A.A. Nordin (eds.), Immunological Techniques Applied to Aging Research, CRC Press, Boca Raton, FL.

Heine U.I., and 7 others. (1987). Role of transforming growth factor-β in the development of the mouse embryo, J. Cell Biol., **105**, 2861–2876.

Heldin C.-H., Westermark B. (1984). Growth factors: Mechanism of action and relation to oncogenes, Cell, **37**, 9–20.

Hirst R., Horowitz A., Buck C., Rohrschneider L. (1986). Phosphorylation of the fibronectin receptor complex in cells transformed by oncogenes that encode tyrosine kinase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 6470–6474.

Holley R.W., Bohlen P., Fava R., Baldwin J.H., Kleeman G., Armour R. (1980). Purification of kidney epithelial cell growth inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 5989–5992.

Holliday R., Kirkwood T.B.L. (1981). Prediction of the somatic mutation and mortilation theories of cellular aging as contrary to experimental observations, J. Theoret. Biol., **93**, 627–642.

Holliday R., Kirkwood T.B.L. (1983). Theories of cell aging: A case of mistaken identity, J. Theoret. Biol., **103**, 329–330.

Hsu Y.-M., Wang J.L. (1986). Growth control in cultured 3T3 fibroblasts. V. Purification of an M_r 13,000 polypeptide responsible for growth inhibitory activity, J. Cell Biol., **102**, 362–369.

Hunter T. (1985). Oncogenes and growth control, Trends Biochem. Sci., **10**, 275–280.

Hunter T. (1986). Cell growth control mechanisms, Nature, **322**, 14–16.

Huxley A. (1939). After Many a Summer Dies the Swan, Harper and Brothers, New York.

Huxley J.S. (1932). Problems of Relative Growth, Dial Press, New York.

Isaksson O.G.P., Jansson J.-O., Gauss I.A.M. (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly, Science, **216**, 1237–1239.

Johnson P.R., Zucker L.M., Cruce J.A., Hirsch J. (1971). Cellularity of adipose deposits in the genetically obese Zucker rat, J. Lipid Res., **12**, 706–714.

Kelly J.D., Raines E.W., Ross R., Murray M.J. (1985). The β chain of PDGF is sufficient for mitogenesis, EMBO J., **3**, 3399–3405.

Kelly K., Cochrane B.H., Stiles C.D., Leder P. (1983). Cell-specific requlation on the c-*myc* gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor, Cell, **35**, 603–610.

Kishimoto S., Tomino S., Mitsuya H., Nishimura H. (1982). Age-related decrease in frequencies of B-cell precursors and specific help on T-cells involved in the 19G anti-tetanus toxoid antibody protection in humans, Clin. Immunol. Immunopathol., **25**, 1–10.

Klarlund J.D. (1985). Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins, Cell, **41**, 707–717.

Kmiecik T.E., Shalloway D. (1986). Activation and suppression of $pp60^{c\text{-}src}$ transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phoshorylation, Cell, **49**, 65–73.

Kozbor D., Giallongo A., Sierzega M.E., Konopka J.B., Witte O.N., Showe L.C., Croce C.M. (1986). Expression of translocated c-*abl* gene in hydrids of mouse fibroblasts and chronic myelogenous leukemia cells, Nature, **319**, 331–333.

Kruijer W., Cooper J.A., Hunter T., Verma I.M. (1984). Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-*fos* gene and protein, Nature, **312**, 711–716.

Kruijer W., Schubert D., Verma I.M. (1985). Induction of the proto-oncogene *fos* by nerve growth factor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 7330–7334.

Krystal G., Morris G.M., Lipman J.M., Sokoloff L. (1983). DNA repair by articular chondrocytes. I. Unscheduled DNA synthesis following ultraviolet irradiation in monolayer culture, Mech. Aging Dev., **21**, 63–96.

LaBarbera M. (1990). Principles of design of fluid transport systems in zoology, Science, **249**, 992–1000.

Lacal J.C., Srivastava S.K., Anderson P.S., Aaronson S.A. (1986a). *Ras* p21 proteins with high or low GTPase activity can efficiently transform NIH/3T3 cells, Cell, **44**, 609–617.

Lacal J.C., Anderson P.S., Aaronson S.A. (1986b). Deletion mutants of Harvey *ras* p21 protein reveal abcolute requirement of at least two distant regions for GTR-binding and transforming activities, EMBO J., **5**, 679–687.

Land H., Parada L.F., Weinberg R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes, Nature, **304**, 596–602.

Lau L.F., Nathans D. (1985). Identification of a set of genes expressed during the G_0/G_1 transition of cultured mouse cells, EMBO J., **4**, 3145–3151.

Lawrence D.A., Pircher R., Kryceve-Martinerie C., Jullien P. (1984). Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form, J. Cell. Physiol., **121**, 184–188.

Leder P., and 7 others. (1983). Translocations among antibody genes in human cancer, Science, **222**, 765–771.

Leof E.B., Wharton W., Van Wyk J.J., Pledger W.J. (1982). Epidermal growth factor and somatomedin C regulate G_1 progression in competent BALB/c-3T3 cells, Exp. Cell Res., **141**, 107–115.

Levinson A.D., Opperman H., Varmus H.E., Bishop J.M. (1980). The purified product of the transforming gene of avian sarcoma virus phosphorylates tyrosine, J. Biol. Chem., **255**, 1973–1980.

Lim R.W., Hauschka S.D. (1984). A rapid decrease in EGF-binding capacity accompanies the terminal differentiation of mouse myoblasts in vitro, J. Cell Biol., **98**, 739–747.

Lin S.L., Kikuchi T., Pledger W.J., Tamm I. (1986). Interferon inhibits the establishment of competence in G_0/S-phase transition, Science, **233**, 356–359.

Linial M., Gunderson N., Groudine M. (1985). Enhanced transcription of *c-myc* in bursal lymphoma cells requires continuous protein synthesis, Science, **230**, 1126–1132.

Lumpkin C.K., Jr., McClung J.K., Pereira-Smith O.M., Smith J.R. (1986). Existence of high abundance antiprolife-

rative mRNAs in senescent human diploid fibroblasts, Science, **232**, 393–395.
Luna A. M., Wilson D. M., Wibbelsman C. J., Brown R. C., Nagashima R. J., Hintz R. L., Rosenfeld R. D. (1983). Somatomedins in adolescence: A cross-sectional study of the effect of puberty of plasma insulin-like growth factor I and II, J. Clin. Endocrinol, Metab., **304**, 545–547.
Martin C. R. (1985). Endocrine Physiology, Oxford University Press, New York.
Martin G. M., Sprague C. A., Epstein C. J. (1970). Replicative life span of cultured human cells; Effects of donor's age, tussue, and genotype, Lab. Invest., **23**, 86–92.
Martin-Zanca D., Hughes S. H., Barbacid M. (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences, Nature, **319**, 743–748.
Marx J. L. (1986). The yin and yang of cell growth control, Science, **232**, 1093–1095.
Matsumura T., Zerrudo Z., Hayflick L. (1979). Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis, and morphology, J. Gerontol., **34**, 328–334.
McMahon J. B., Farrelly J. G., Type P. T. (1982). Purification and properties of rat liver proteins that specifically inhibit the proliferation of non-malignant epithelial cells from rat liver, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 456–460.
Merimee T. J., Zapf J., Hewlett B., Cavalli-Sforza L. L. (1987). Insulin-like growth factors in pygmies. The role of puberty in determining final stature, N. Engl. J. Med., **316**, 906–911.
Moore K. L. (1983). Before We Are Born: Basic Embryology and Birth Defects, 2nd Ed., Saunders, Philadelphia, p. 70.
Muggleton-Harris A. L., Hayflick L. (1976). Cellular aging studied by the reconstruction of replicating cells from nuclei and cytoplasms isolated from normal human diploid cells, Exp. Cell Res., **103**, 321–330.
Neckameyer W. S., Wang L. H. (1985). Nucleotide sequence of avian sarcoma virus UR2 and comparisons of its transforming gene with other members of the tyrosine kinase oncogene family, J. Virol., **53**, 879–884.
Needham J. (1951). Biochemical aspects of form and growth. In: L. L. Whyte (ed.), Aspects of Form, Lund Humphries, London, pp. 77–86.
Nette E. G., Xi Y.-P., San Y.-K., Andrews A. D., King D. W. (1984). A correlation between aging and DNA repair in human epidermal cells, Mech. Aging Dev., **24**, 283–292.
Nienhaus A. W., Bunn H. F., Turner P. H., Gopal T. V., Nash W. G., O'Brien S. J., Sherr C. J. (1985). Expression of the human c-*fms* proto-oncogene in hematopoietic cells and its deletion in the $5q^-$ syndrome, Cell, **42**, 421–428.
Nilsson A., Isgaard J., Lindahl A., Dahlström A., Skottner A., Isaksson O. G. P. (1986). Regulation by growth hormone of number of chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate, Science, **233**, 571–574.
Nishikura K., Rushdim A., Erikson J., Watt R., Rovera G., Croce C. M. (1983). Differential expression of the normal and of the translocated human c-*myc* oncogenes in B-cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 4822–4826.
Noronha A. B. C., Antel J. P., Roos R. P., Arnason B. G. W. (1980). Changes in concanavalin: A capping of human lymphocytes with age, Mech. Aging Dev., **12**, 331–337.
Olashaw N. E., Pledger W. J. (1982). Association of platelet-derived growth factor-induced protein with nuclear material, Nature, **306**, 272–274.
Olwin B. B., Hauschka S. D. (1988). Cell surface fibroblast growth factor and epidermal growth factor receptors are permanently lost during skeletal muscle terminal differentiation in culture, J. Cell Biol., **107**, 761–769.
Orgel L. E. (1973). Aging of clones of mammalian cells, Nature, **244**, 441–445.
Palmiter R. D., Brinster R. L., Hamm R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G. Birnberg N. C., Evan R. M. (1982). Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein growth hormone fusion genes, Nature, **300**, 611–615.
Pardee A. B., Coppock D. L., Yang H. C. (1986). Regulation of cell proliferation and the onset of DNA synthesis, J. Cell Sci. [Suppl.], **4**, 171–180.
Pereira-Smith O. M., Fisher S. F., Smith J. R. (1985). Senescent and quiescent cell inhibitors of DNA synthesis, Exp. Cell Res., **160**, 297–306.
Pfeifer-Ohlsson S., Goustin A. S., Rydnert J., Wahlström T., Bjersing L., Stehelin D., Ohlsson R. (1984). Spatial and temporal pattern of cellular *myc* oncogene expression in developing human placenta: Implications for embryonic cell proliferation, Cell, **38**, 585–596.
Phillips P. D., Kaji K., Cristofalo V. J. (1984). Progressive loss of the proliferative response of senescing WI-38 cells to PDGF, EGF, insulin, transferrin, and dexamethasone, J. Gerontol., **39**, 11–17.
Phillips P. D., Kuhne E., Cristofalo V. J. (1983). ^{125}I-EGF binding ability is stable throughout replicative life span of WI-38 cells, J. Cell. Physiol., **114**, 311–316.
Pilbeam D., Gould S. J. (1974). Size and scaling in human evolution, Science, **186**, 892–901.
Piwnica-Worms H., Saunders K. B., Roberts T. M., Smith A. E., Chang S. H. (1987). Tyrosine phosphorylation regulates the biochemical and biological properties of $pp60^{c\text{-}src}$. Cell, **49**, 75–82.
Pledger W. J., Estes J. B., Howe P. H., Leof E. B. (1984). Serum factor requirements for the initiation of cell proliferation. In: J. P. Mather (ed.). Mammalian Cell Culture, Plenum, New York, pp. 1–15.
Proper J. A., Bjornson C. L., Moses H. L. (1982). Mouse embryos contain polypeptide growth factors capable of inducing a reversible neoplastic phenotype in non-transformed cells culture, J. Cell. Physiol., **110**, 169–174.
Przibram H. (1904). Reported in Przibram H. (1931). Connecting Laws in Animal Morphology, University of London Press, London.
Raff R. A., Kaufman T. C. (1983). Embryos, Genes, and Evolution, Macmillan, New York.
Ralston R., Bishop J. M. (1985). The product of the proto-oncogene c-*src* is modified during the cellular response to platelet-derived growth factor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 7845–7849.
Randall J. E. (1964). Contributions to the biology of the queen conch, *Strombos gigas*, Bull. Mar. Sci., **14**, 246–295.
Raup D. M. (1962). Computer as aid in describing form in gastropod snails, Science, **138**, 150–152.
Raup D. M. (1966). Geometric analysis of shell coiling: General problems, J. Paleontol., **40**, 1178–1190.
Resnitzky D., Yarden A., Zipori D., Kimchi A. (1986). Autocrine β-related interferon controls c-*myc* suppression and growth arrest during hematopoietic cell differentiation, Cell, **46**, 31–40.
Roberts A. B., Anzano M. A., Lamb L. C., Smith J. M., Sporn M. B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: Isolation from non-neoplastic tissues, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 5339–5343.
Roberts A. B., Anzano M. A., Wakefield L. L., Roche N., Stern D. F., Sporn M. B. (1985). Type β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 119–123.
Roberts A. B., Frolik C. A., Anzano M. A., Sporn M. B. (1983). Transforming growth factor for neoplastic and non-neoplastic tissues, Fed. Proc., **42**, 2621–2626.
Ross R., Vogel A. (1978). The platelet-derived growth factor, Cell, **14**, 203–210.
Rous P. (1910). A transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common fowl), J. Exp. Med., **12**, 696–705.

Sambucetti L. C., Curran T. (1986). The *fos* protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose, Science, **234**, 1417–1419.
Savage C. R., Cohen S. (1972). Epidermal growth factor and a new derivative, J. Biol. Chem., **247**, 7609–7611.
Schartl M., Barnekow A. (1984). Differential expression of the cellular *src* gene during vertebrate development, Dev. Biol., **105**, 415–422.
Scherr C. J., Rettenmier C. W., Sacca R., Roussel M. F., Look A. T., Stanley E. R. (1985). The c-*fms* proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1, Cell, **41**, 665–676.
Schneider E. L., Mitsui Y. (1976). The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 3584–3588.
Schwab M., and 8 others. (1983). Amplified DNA with limited homology to *myc* oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a heuroblastoma tumour, Nature, **305**, 245–248.
Seeger R. C., Brodeur G. M., Sather H., Dalton A., Siegel S. E., Wong K. Y., Hammond D. (1985). Association of multiple copies of the N-*myc* oncogene with rapid progression of neuroblastomas, N. Engl. J. Med., **313**, 1111–1116.
Sefton B. M., Hunter T. J., Ball E. H., Singer S. J. (1981). Vinculin-A cytoskeletal target of the transforming protein of Rous sarcoma virus, Cell, **24**, 165–174.
Sefton B. M., Hunter T., Beemon K., Eckhart W. (1980). Evidence that the phosphorylation of tyrosine is essential for cellular transformation by Rous sarcoma virus, Cell, **20**, 807–816.
Shih C., Weinberg R. A. (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line, Cell, **29**, 161–169.
Sokawa Y., Watanabe Y., Kawade Y. (1977). Interferon suppresses the transaction of quiescent 3T3 cells to a growing state, Nature, **268**, 236–238.
Sorge L. K., Levy B. T., Maness P. F. (1984). $pp60^{c-src}$ is developmentally regulated in the neural retina, Cell, **36**, 249–257.
Stern J. S., Greenwood M. R. C. (1974). A review of development of adipose cellularity in man and animals, Fed. Proc., **33**, 1952–1955.
Stiles C. D., Capone G. T., Scher C. D., Antoniades H. N., Van Wyk J. J., Pledger W. J. (1979). Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 1279–1283.
Studzinski G. P., Brelvi Z. S., Feldman S. C., Watt R. A. (1986). Participation of c-*myc* protein in DNA synthesis of human cells, Science, **234**, 467–470.
Sugimoto Y., Whitman M., Cantley L. C., Erikson R. L. (1984). Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 2117–2121.
Tabin C. J., and 8 others. (1982). Mechanism of activation of a human oncogene, Nature, **300**, 143–149.
Temin H. M. (1971). The protovirus hypothesis, J. Natl. Cancer. Inst., **46**, III–VII.
Temin H. M., Rubin H. (1958). Characteristics of an assay for Rous sarcoma cells in culture, Virology, **6**, 669–688.
Thompson D. W. (1942). On Growth and Form, Cambridge University Press, Cambridge.
Thornley A. L., Lawrence E. B. (1976). The specificity of epidermal chalone action: The results of in vivo experimentation with purified skin extracts, Dev. Biol., **51**, 10–22.
Ulrich A., and 14 others. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes, Nature, **313**, 756–761.
Vassilopoulou-Sellin R., Phillips L. S. (1982). Extraction of somatomedin activity from rat liver, Endocrinology, **110**, 582–589.
Verrier B., Müller D., Bravo R., Müller R. (1986). Wounding a fibroblast monolayer results in the rapid induction of the c-*fos* proto-oncogene, EMBO J., **5**, 913–917.
Ward J. M., Armitage K. B. (1981). Circannual rhythms of food consumption, body mass, and metabolism in yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*), Comp. Biochem. Physiol., **69**[A], 621–626.
Waterfield M. D., and 9 others. (1983). Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein $P28^{sis}$ of simian sarcoma virus, Nature, **304**, 35–39.
Weber W., Bertics P. J., Gill C. N. (1984). Immunoaffinity purification of the epidermal growth factor receptor, J. Biol. Chem., **259**, 14631–14636.
Weksler M. E. (1983). Senescence of the immune system, Med. Clin. North, **67**, 263–272.
Wheeler D., Nijhout H. F. (1981). Soldier determination in ants and a new role for juvenile hormones, Science, **213**, 361–363.
Williams J. G., Penman S. (1975). Messenger RNA sequences in growing and resting mouse fibroblasts, Cell, **6**, 197–206.
Wilson E. O. (1953). The origin and evolution of polymorphism in ants, O. Rev. Biol., **28**, 136–156.
Yamamoto T., and 7 others. (1983). Similarity of protein encoded by the c-*erb*B2 gene to epidermal growth factor receptor, Nature, **319**, 230–234.
Zarbl H., Sukumar S., Arthur A. V., Martin-Zanka D., Barbacid M. (1985). Direct mutagenesis of Ha-*ras*-1 oncogenes by *N*-nitroso-*N*-methylurea during initiation of mammary carcinogenesis in rats, Nature, **315**, 382–385.
Zezulak K. M., Green H. (1986). The generation of insulin-like growth factor-I-sensitive cells by growth hormone action, Science, **233**, 551–553.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА К 3-МУ ИЗДАНИЮ

Benedict W. F., Murphree A. L., Banerjee A., Spina C. A., Sparkes M. D., Sparkes R. S. (1983). Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene, Science, **219**, 973–975.
Burchkovich K., Duffy L. A., Harlow E. (1989). The retinoblastoma gene is phosphorylated during specific phases of the cell cycle, Cell, **58**, 1097–1105.
Cales C., Hancock J. F., Marshall C. J., Hall A. (1988). The cytoplasmic protein GAP is implicated as a target for regulation by the *ras* gene product, Nature, **332**, 548–551.
Cavanee W. K. and 8 others (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma, Nature, **305**, 779–784.
Chen P.-L., Scully P., Shen J.-Y., Wang J. Y. J., Lee W.-H. (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell-cycle and cellular differentiation, Cell, **58**, 1193–1198.
Cooper J. A., Whyte P. (1989). RB and cell cycle: Entrance or exit? Cell, **58**, 1009–1011.
DeCarpio J. A. and 7 others (1989). The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element, Cell, **58**, 1085–1095.
Draetta G., Piwnica-Worms H., Morrison D., Druker B., Roberts T., Beach D. (1988). Human *cdc2* protein kinase is a major cell-cycle regulated tyrosine kinase substrate, Nature, **336**, 738–744.
Fearon E. R. and 10 others (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colonorectal cancers, Science, **247**, 49–56.
Friend S. H., Bernards R., Rogelj S., Weinberg R. A. Rapaport J. M., Albert D. M., Dryja T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma, Nature, **323**, 643–646.
Gibbs J. B., Scaber M. D., Allard W. J., Sigal I. S., Scolnick E. M.

(1988). Purification of *ras* GTPase activating protein from bovine brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 5026–5030.

Halazonetis T. D., Georgopoulos K., Greenberg M. E., Leder P. (1988). c-*Jun* demerizes with itself and with c-*Fos*, forming complexes with different DNA binding affinities, Cell, **55**, 917–924.

Horowitz J. M. and 8 others (1990). Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 2775–2779.

Huang H.-J. S. and 7 others (1988). Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells, Science, **242**, 1563–1566.

Kimchi A., Wang X.-E., Weinberg R. A., Cheifetz S., Massague J. (1988). Absence of TGF-β receptors and growth inhibitory responses in retinoblastoma cells, Science, **240**, 196–198.

Knudson A. G. (1971). Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 820–823.

Knudson A. G., Meadows A. G., Nichols W. W., Hill R. (1976). Chromosome deletion and retinoblastoma, N. Engl., J. Med., **295**, 1120–1123.

Lee E. and 7 others (1987). The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity, Nature, **329**, 642–645.

Margolis B. and 8 others (1989). EGF induces tyrosine phosphorylation of phospholipase C-II: A potential mechanism for EGF receptor signalling, Cell, **57**, 1101–1107.

McCormick F. (1989). *ras* GTPase activating protein: Signal transmitter and signal terminator, Cell, **56**, 5–8.

Meisenhelder J., Suh P.-G., Rhee S. G., Hunter T. (1989). Phospholipase C-g is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinase in vivo and in vitro, Cell, **57**, 1109–1122.

Rastinejad F., Polverini P. J., Bouck N. (1989). Regulation of the activity a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene, Cell, **56**, 345–355.

Rauscher F. J. III, Sambucetti L. C., Curran T., Distel R. J., Spiegelman B. M. (1988). Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1, Cell, **52**, 471–480.

Robbins P. D., Horowitz J. M., Mulligan R. C. (1990). Negative regulation of human c-*fos* expression by the retinoblastoma gene product, Nature, **346**, 668–671.

Seshadri T., Campisi J. (1990). Repression of c-*fos* transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts, Science, **247**, 205–208.

Trahey M., McCormick F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-*ras* p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants, Science, **238**, 542–544.

Vogelstein B. and others (1989). Genetic alterations accumulate during colonorectal tumorigenesis. In: W. Cavanee, N. Hastle and E. Stanbridge (eds.), Recessive Oncogenes and Tumor Progression, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY.

Глава 21
Детерминация пола

Половое размножение – ... шедевр природы.

ЭРАЗМ ДАРВИН (1791)

Любопытно отметить, что число спекуляций относительно природы пола наверняка удвоилось с тех пор, как Дрелинкур в восемнадцатом веке собрал две сотни и шестьдесят две «беспочвенные гипотезы», а Блюменбах едко заметил, что самой туманной стало собственная теория Дрелинкура – двести шестьдесят третья.

ДЖ. ТОМСОН (1926)

Введение

Проблема, касающаяся механизма детерминации (определения) пола особи, со времен античности остается одной из важнейших нерешенных проблем эмбриологии. Аристотель, собиравший и анатомировавший зародыши, утверждал, что пол определяется теплом мужского партнера при половом сношении. Чем горячее страсть, тем больше вероятность появления мужского потомства. (Аристотель советовал немолодым людям беременеть летом, если они хотят получить наследника мужского пола.) С тех пор детерминацию пола связывали с условиями среды, в частности с теплом и хорошим питанием. В 1890 г. Геддес и Томсон (Geddes, Thomson, 1890) в результате изучения накопившихся к тому времени данных об определении пола пришли к выводу о том, что любой анализ такого рода требует особого внимания к «конституции, возрасту, питанию и условиям жизни родителей». Эти авторы заключили, что факторы, благоприятствующие сохранению энергии и питательных веществ, способствуют появлению женского потомства, а факторы, благоприятствующие утилизации энергии и пищи, положительно влияют на появление мужского потомства.

Представления об определяющей роли среды в детерминации пола оставались основой научной теории, пока в 1900 г. не были вновь открыты законы Менделя, а в 1902 г. Мак-Клангом (McClung, 1902) не была вторично открыта половая хромосома. Основываясь на изучении работ Менделя, Корренс (Correns) предположил, что характерное для большинства видов соотношение полов, равное 1:1, может быть обусловлено гетерозиготностью самцов и гомозиготностью самок. Однако лишь в 1905 г. было установлено (у насекомых), что женский пол коррелирует с наличием хромосом XX, а мужской – XY или X0 (Stevens, 1905; Wilson, 1905). Это явилось сильнейшим аргументом в пользу того, что развитие полового фенотипа направляется специфическим ядерным компонентом. Таким образом, накапливались данные о том, что пол определяется каким-то ядерным наследственным фактором, а не условиями среды.

Сегодня мы знаем, что у разных видов пол могут детерминировать как факторы внешней среды, так и внутренний механизм. В этой главе нам прежде всего предстоит рассмотреть хромосомные механизмы определения пола, а затем пути, при помощи которых среда может регулировать половой фенотип.

Хромосомная детерминация пола у млекопитающих

Детерминация пола у млекопитающих является строго хромосомной и обычно не зависит от окружающих условий. В большинстве случаев в

генотипе самок содержатся две Х-хромосомы, а в генотипе самцов – XY. Y-хромосома служит решающим наследственным фактором, который определяет пол у млекопитающих. Даже в том случае, когда особь имеет пять Х-хромосом и одну Y-хромосому, она будет мужской. Если же особь имеет одну-единственную Х-хромосому без Y-хромосомы, то она будет женской.

Когда Джост (Jost, 1953) удалял еще недифференцированные гонады у плода кролика, то независимо от генотипа (XX или XY) развившаяся особь всегда оказывалась женской. Все подопытные кролики имели яйцеводы, матки, влагалища и были лишены мужских половых органов. В отсутствие гонад развитие идет по женскому пути. Следовательно, определение пола у млекопитающих зависит от какого-то продукта Y-хромосомы или ею регулируется.

Схема детерминации пола у млекопитающих представлена на рис. 21.1. Если Y-хромосома отсутствует, то зачатки гонад развиваются в яичники. Эстрогены, продуцируемые яичником, обусловливают развитие мюллерова протока во влагалище, шейку матки, матку и яйцеводы. При наличии Y-хромосомы последняя продуцирует или регулирует формирование фактора (до сих пор еще не охарактеризованного), который детерминирует развитие семенников, т.е. вынуждает развивающуюся гонаду вступать на путь, ведущий к развитию семенника, а не яичника. Коль скоро семенник сформировался, он начинает секретировать два важных гормона. Первый из них – гормон, направленный против мюллерова канала, или **антимюллеровский гормон** (АМГ) разрушает ткань, способную в альтернативном случае дать начало матке, яйцеводу, шейке матки и верхней части влагалища. Другой гормон – **тестостерон** – приводит к маскулинизации плода, вызывая формирование пениса, мошонки и других частей мужской анатомии, одновременно стимулируя редукцию зачатков молочных желез. Итак, фенотип организма останется женским, если его не изменят два гормона, вырабатываемые семенниками плода. Перейдем к более подробному анализу этих событий.

Развитие гонад

Развитие гонад представляет собой уникальное эмбриологическое явление. Все прочие зачатки

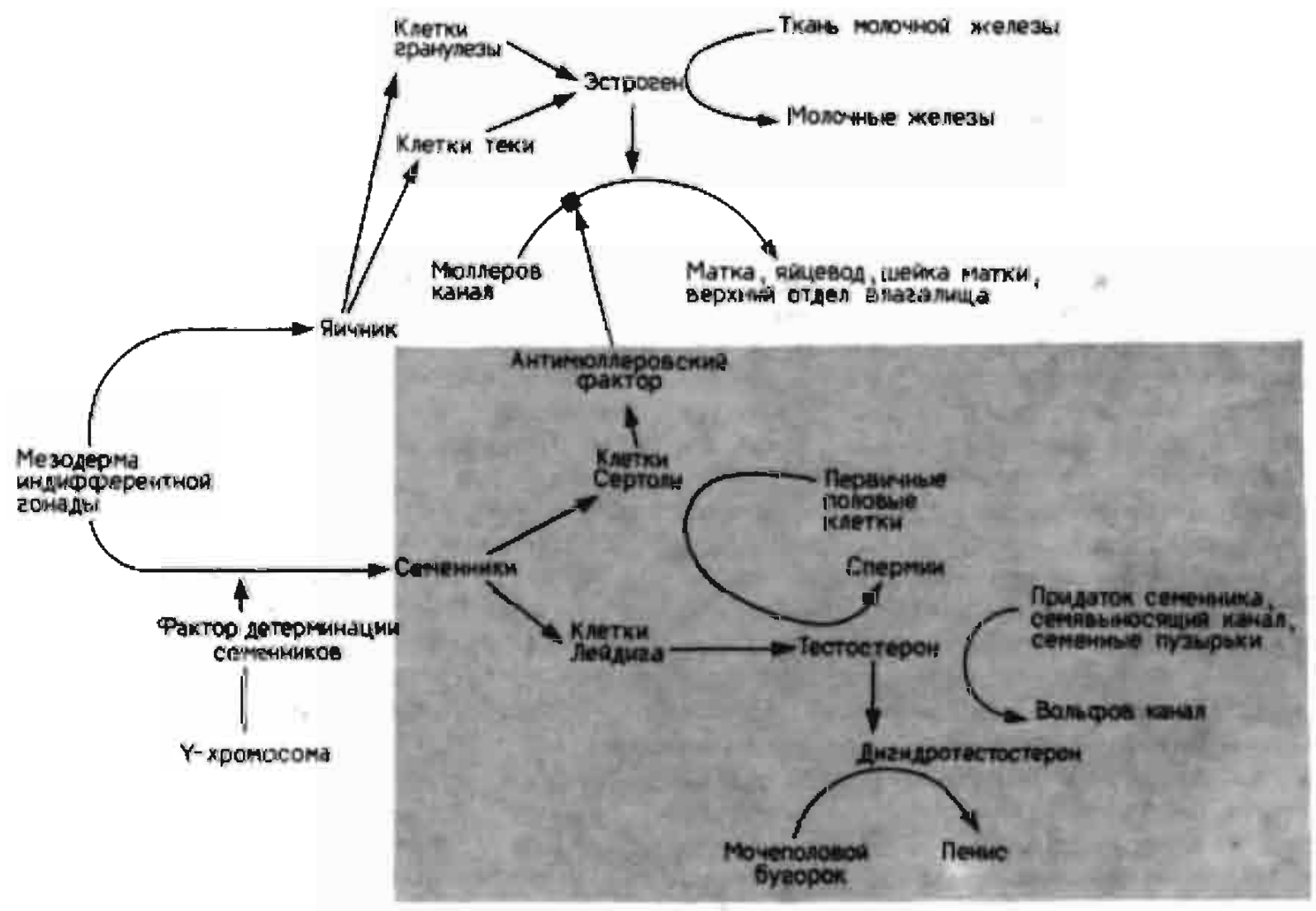


Рис. 21.1. Последовательность событий, ведущих к формированию фенотипов у млекопитающих. При наличии Y-хромосомы индифферентная гонада превращается в семенник. Клетки семенника секретируют гормоны, обусловливающие мужской фенотип. В отсутствие Y-хромосомы действие овариальных генов приводит к развитию яичника, и животное приобретает женский фенотип.

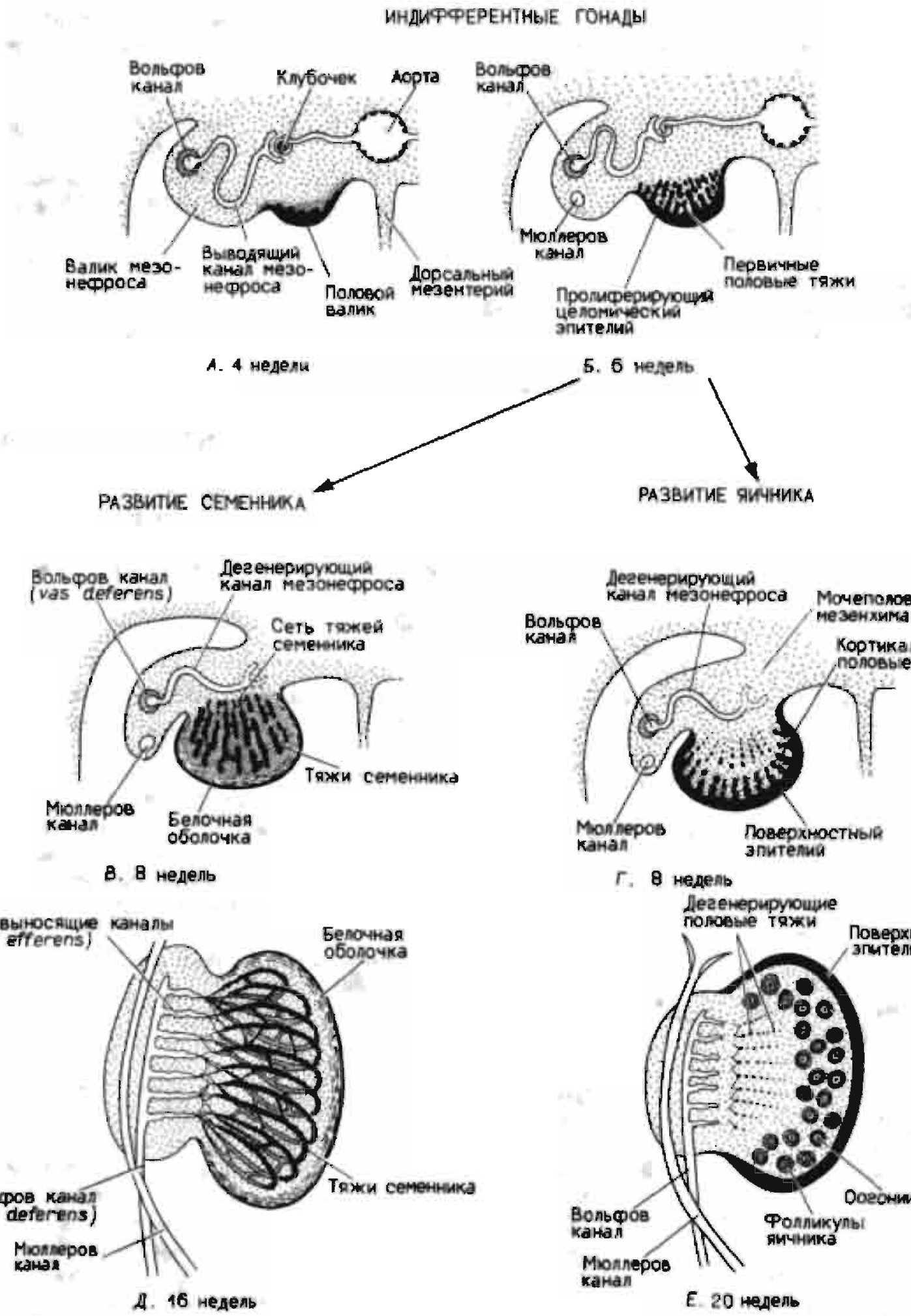


Рис. 21.2. Дифференцировка гонад человека (процесс иллюстрирован на поперечных срезах). *А.* Половой валик 4-недельного эмбриона. *Б.* Половой валик 6-недельного эмбриона; появляются первичные половые тяжи. *В.* Развитие семенника на 8-й неделе. Половые тяжи теряют связь с кортикальным эпителием и формируют сеть семенника. *Г.* Развитие яичника у 8-недельного женского эмбриона человека; первичные половые тяжи дегенерируют. *Д.* 16-я неделя развития; половые тяжи семенника продолжаются в сеть семенника и соединяются с вольфовым каналом. *Е.* 20-недельный яичник человека не связан с вольфовым каналом; новые кортикальные половые тяжи окружают первичные половые клетки, мигрировавшие в половой валик. (По Langman, 1981.)

органов в ходе нормального развития дифференцируются в орган лишь одного типа. Например, зачаток легкого может дать начало только легкому, а зачаток печени – только печени. Что же касается зачатка гонады, то он в норме обладает способностью развиваться в двух направлениях: в результате дифференцировки он может превратиться либо в семенник, либо в яичник. Тип дифференцировки, избранный зачатком, детерминирует будущее половое развитие организма. Прежде чем этот выбор будет сделан, гонада млекопитающих некоторое время находится в **индифферентной стадии**, когда у нее не выражены ни женские, ни мужские признаки. У человека зачаток гонады появляется в промежуточной мезодерме на четвертой неделе развития и сохраняет половую неопределенность до седьмой недели. В течение этой индифферентной стадии эпителий полового валика пролиферирует в лежащую над ним рыхлую соединительную мезенхимную ткань (рис. 21.2, *А*, *Б*). Эти эпителиальные слои формируют **первичные половые тяжи**, которые будут окружать первичные половые клетки, мигрирующие в гонады на шестой неделе. И в XX-, и в XY-гонадах половые тяжи остаются связанными с поверхностным эпителием.

Если генотип плода – XY, то первичные половые тяжи продолжают пролиферировать в течение восьмой недели, глубоко внедряясь в соединительную ткань. Эти тяжи сливаются, образуя сеть внутренних (медуллярных) половых тяжей, а на дистальном конце формируется более тонкая **сеть семенника** (рис. 21.2, *В*, *Д*). Со временем тяжи семенника утрачивают связь с поверхностным эпителием и отделяются от него толстым внеклеточным матриксом – белочной оболочкой (tunica albuginea). Таким образом, половые клетки оказываются в тяжах *внутри* семенника. В течение плодной жизни и в детстве эти тяжи остаются плотными. Однако во время полового созревания в них появляется полость и они превращаются в семенные канальцы, а первичные половые клетки приступают к сперматогенезу. Спермии транспортируются из семенника через сеть семенника в **семявыносящие каналыцы**, которые, являясь остатками мезонефрической почки, связывают семенники с вольфовым каналом. Последний служит собирающим каналом мезонефроса. У самцов вольфов канал дифференцируется в **vas deferens** – проток, через который сперма проходит в уретру и выводится наружу. Тем временем в процессе развития плода интерстициальные мезенхимные клетки семенника дифференцируются в **клетки Лейдига**, продуцирующие тестостерон. Клетки тяжей семенника дифференцируются в **клетки Сертоли**, питающие сперматогенные клетки и секретирующие **антимюллеровский гормон**.

У самок половые клетки располагаются на наружной поверхности гонады. В отличие от мужских половых тяжей, сохраняющих пролиферативную активность, первичные половые тяжи XX-гонад дегенерируют. Однако эпителий вскоре продуцирует новый набор половых тяжей, которые в мезенхиму не проникают, а остаются на наружной поверхности (кортексе) органа. Поэтому они называются **кортикальными половыми тяжами**. Эти тяжи распадаются на кластеры, причем каждый кластер окружает одну или несколько первичных половых клеток (рис. 21.2, *Г*, *Е*). Первичная половая клетка станет **яйцом**, а окружающие ее эпителиальные половые тяжи дифференцируются **в клетки гранулезы**. Мезенхимные клетки яичника дифференцируются **в клетки теки**. Вместе клетки теки и клубочка образуют **фолликулы**, которые одевают половые клетки и секретируют стероидные гормоны. Каждый фолликул содержит единственную половую клетку. У самок мюллеров канал сохраняется и дифференцируется в яйцеводы, матку, шейку матки и верхнюю часть влагалища; вольфов канал в отсутствие тестостерона дегенерирует. Основные этапы развития репродуктивной системы млекопитающих представлены на рис. 21.3.

Контроль детерминации пола у млекопитающих: гены Y-хромосомы

Обнаружено несколько генов, функционирование которых необходимо для нормальной дифференцировки пола. Генетическое изучение *Drosophila* и *Caenorhabditis* позволило идентифицировать многочисленные гены, участвующие в формировании половых фенотипов. Применение генетических методов при изучении млекопитающих сопряжено с большими трудностями, однако в клинических исследованиях также было идентифицировано несколько генов, активирующихся в процессе детерминации мужского или женского пола. Своими знаниями (хотя и весьма скудными) о генах, детерминирующих пол у млекопитающих, мы обязаны двум обстоятельствам. Во-первых, если мутации в большинстве органов оказываются летальными, то мутации в репродуктивных органах обычно приводят к инверсии пола или стерильности. Во-вторых, известен и детерминирующий фактор. У плодовой мухи и нематоды – это соотношение X-хромосом и аутосом. У мышей и человека – определенный участок Y-хромосомы. Для большей части эмбриологических процессов инициирующие элементы пока неизвестны.

Хотя известно, что Y-хромосома является основным детерминантом при определении пола у млекопитающих, многие весьма важные вопросы остаются пока без ответов. Какая часть Y-хромосомы

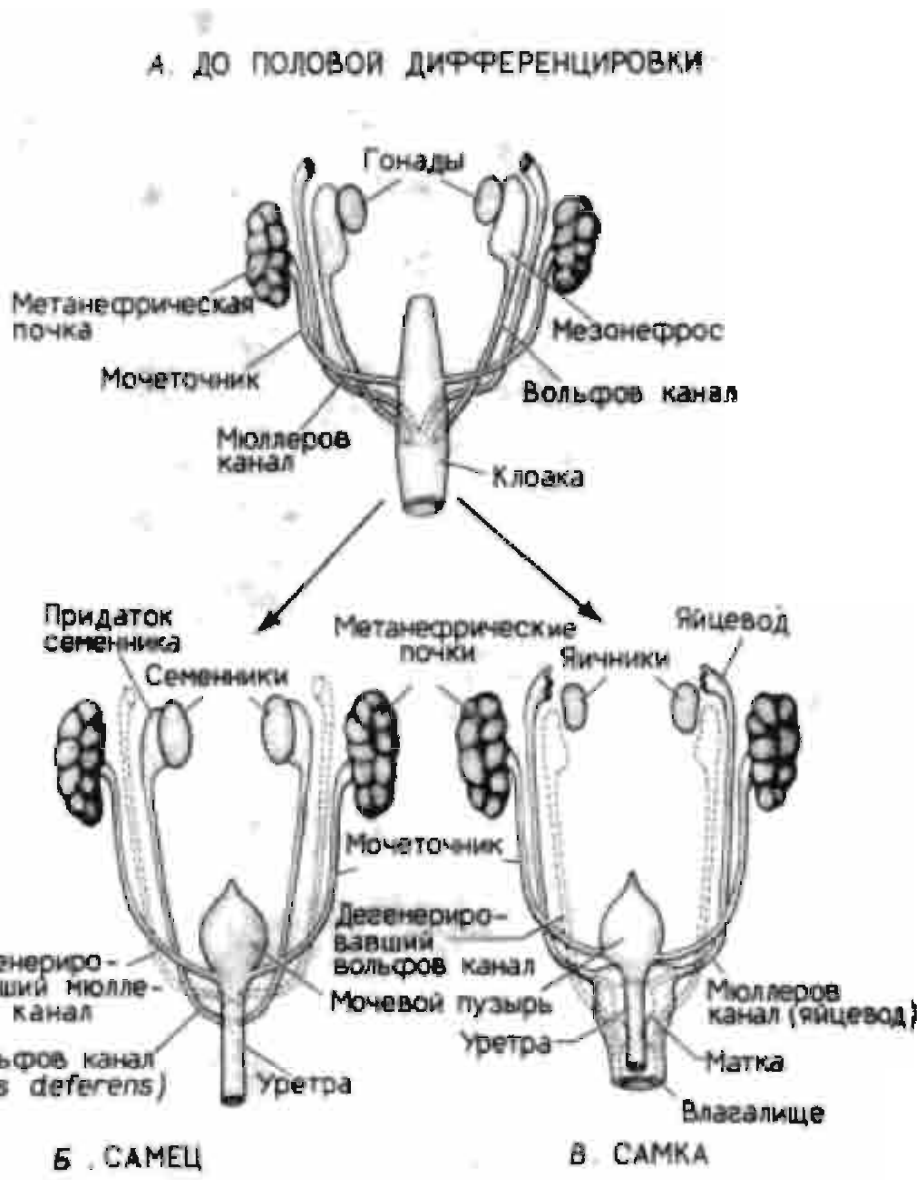


Рис. 21.3. Суммарная схема развития гонад и их протоков у млекопитающих. Обратите внимание на то, что в недифференцированной гонаде присутствуют оба канала – мюллеров и вольфов.

ГОНАДЫ		
Тип гонады	Семенник	Яичник
Половые тяжи	Медуллярный (внутренний)	Кортикальный (наружный)
ПРОТОКИ		
Остается для выведения половых клеток	Вольфов	Мюллеров
Дифференцировка	Vas deferens, придаток семенника, семенной пузырек	Яйцевод, матка, шейка матки, верхняя часть влагалища

необходима для детерминации семенников? Достаточно ли одного этого гена или в детерминации гонад участвуют и другие гены? Каким образом происходит переключение с детерминации яичника на детерминацию семенника?

Прежде всего следует отметить, что в детерминации пола участвует лишь небольшая часть Y-хромосомы. Принято считать, что у человека ген, ответственный за фактор детерминации семенника (*Tdf*), находится в коротком плече Y-хромосомы. Особи, рожденные с Y-хромосомой, представленной только коротким плечом,– мужского пола, тогда как особи, рожденные с Y-хромосомой, состоящей только из длинного плеча,– женского пола. Сочетание клинических исследований с методами гибридизации ДНК позволило идентифицировать область короткого плеча, содержащую ген *Tdf*. Специфическую для Y-хромосомы ДНК можно выделить из библиотек рекомбинантной ДНК, полученной из мужских клеток, путем скрининга ДНК, приготовленной из клеток XX и XY. При этом Y-специфические последовательности свяжутся только с ДНК, выделенной из клеток XY (рис. 21.4). Путем скрининга таких Y-специфических последовательностей на ДНК индивидуумов с недостающими частями Y-хромосомы можно определить, какая часть Y-хромосомы несет данную последовательность (Page, 1985).

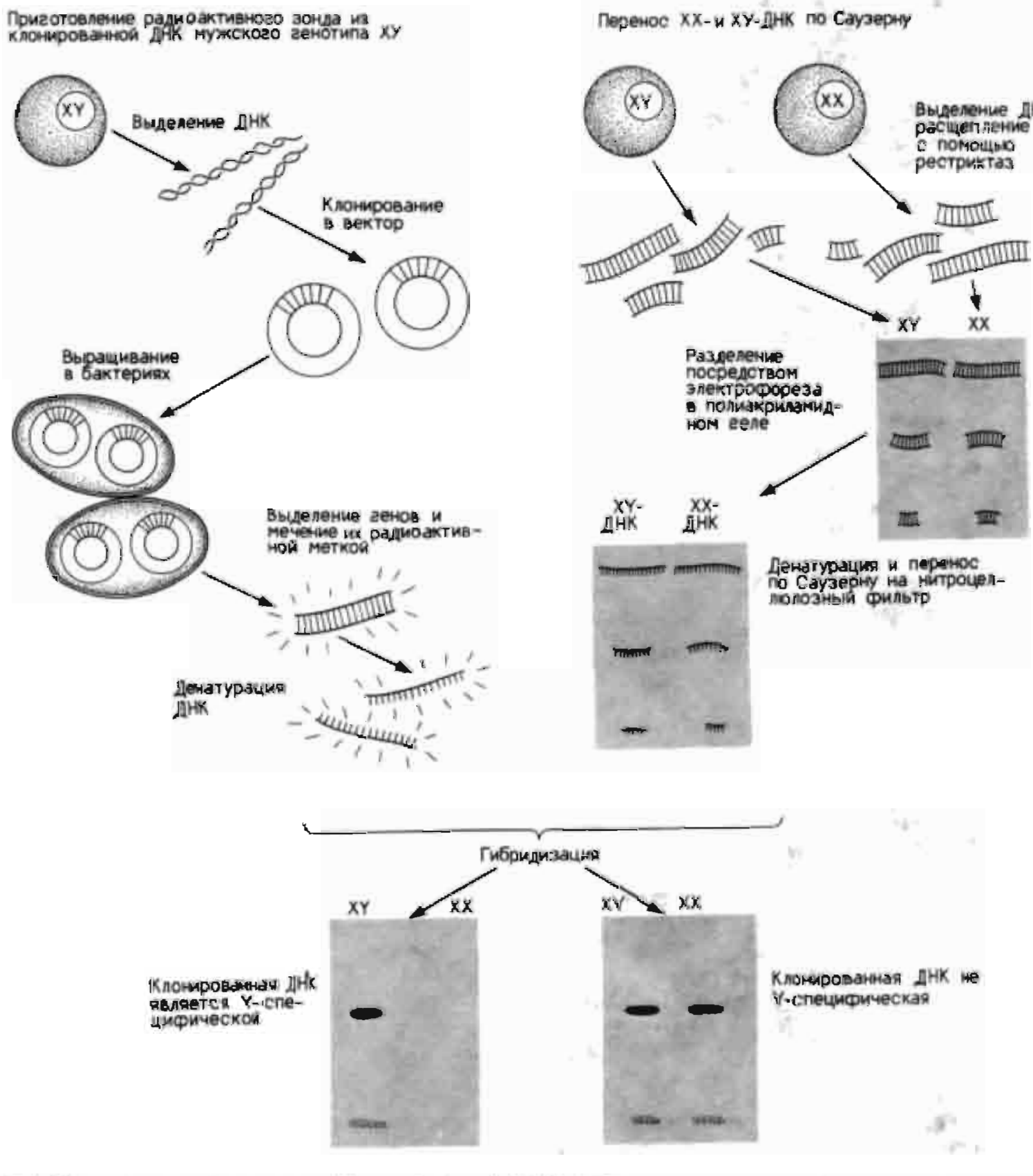


Рис. 21.4. Протокол скрининга клона Y-специфической ДНК. ДНК из мужских клеток клонировали в вирусах и выращивали на *E. coli*. Каждый клон культивировали раздельно; ДНК человека выделяли и метили радиоизотопом. Каждый фрагмент ДНК разделяли на отдельные нити и гибридизовали с ДНК мужских и женских клеток, разделенную путем электрофореза и перенесенную на фильтры по Саузерну. Фрагменты Y-специфической ДНК избирательно связываются с ДНК клеток XY, но не с XX.

В человеческой популяции имеются и мужчины XX (примерно один из 20 000 мужчин) и женщины XY. Результаты экспериментов по гибридизации ДНК (Page et al., 1985; Vergnaud et al., 1986) показали, что у мужчин XX Y-специфическая ДНК из области 1 Y-хромосомы транслоцирована в одну из их хромосом. Более того, у всех исследованных женщин XY этот участок Y-хромосомы отсутствовал (рис. 21.5). Поэтому представляется весьма вероятным, что ген фактора, детерминирующего семенники, может быть картирован в области 1 Y-хромосомы вблизи конца ее короткого плеча.

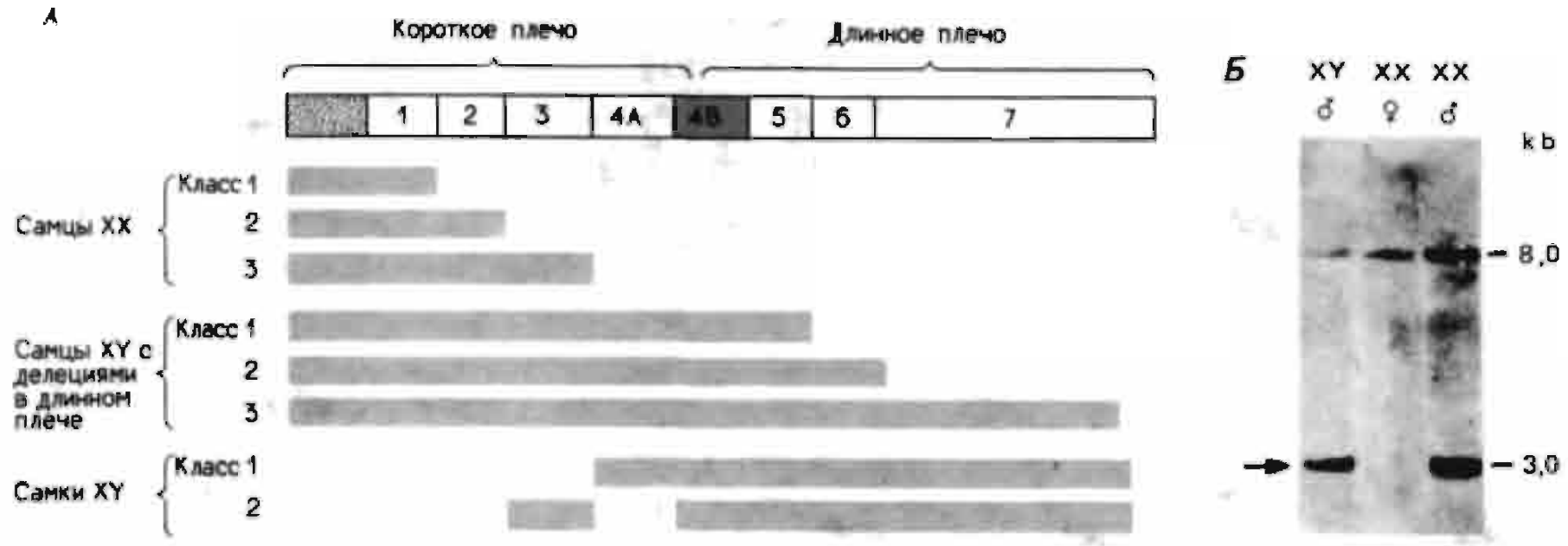


Рис. 21.5. Делеционное картирование гена фактора(ов), детерминирующего развитие семенников у человека. *А*. Y-хромосома разделена на 9 областей. Область 4В представляет собой кинетохор; область, покрытая точками, – это «псевдоаутосомный» участок, содержащий последовательности ДНК, общие с Х-хромосомой (и обусловливающие ее спаривание с Х-хромосомой в мейозе). Все самцы XX имеют ДНК из области 1, тогда как у самок XY происходит делеция этого материала из их Y-хромосом. Поскольку эти области часто слишком малы и их невозможно увидеть в микроскоп, об их наличии или отсутствии судят по результатам гибридизации ДНК (в соответствии с протоколом, приведенным на рис. 4), которые представлены на рис. *Б*, где дан фрагмент радиоактивной ДНК размером 3,0 kb из области 1 Y-хромосомы. Полагают, что именно эта Y-специфическая ДНК содержит фактор, детерминирующий семенники, так как радиоавтограмма после гибридизации по Саузерну свидетельствует о ее присутствии у самцов XX и XY и отсутствии у самок XX. (*А* – по Page, 1985; *Б* – из Vergnaud et al., 1986; фотография с любезного разрешения D. Page.)

Получены данные о том, что эта область ДНК человека гибридизуется с областью мышиной Y-хромосомы, транслоцированной у мутантов *sex reversed* (*sxr*) с Y-хромосомы на Х-хромосому (Singh, Jones, 1982; Eicher et al., 1983).

Анализ ДНК мужчин XX и женщин XY позволил еще более сузить область локализации детерминирующего семенники гена в Y-хромосоме до 35 000 пар оснований у псевдоаутосомного конца. Синклер и др. (Synclaire et al., 1990) обнаружили в этой области последовательность, специфическую для мужчин, которая может кодировать пептид из 223 аминокислот. Эта ДНК обнаружена у мужчин XY, очень редко встречается у мужчин XX и ее нет у женщин XX и XY. Если этот ген (он назван *SRY* от "sex-determining region Y") и в самом деле кодирует основной фактор детерминации семенников, то следует ожидать, что он будет активен в половом гребне непосредственно накануне или во время дифференцировки семенников. В соответствии с этим ожиданием и было обнаружено, что он экспрессируется только в это время и только в этом месте (Gubbay et al., 1990; Koopman et al., 1990). Кроме того, у некоторых женщин XY именно в этом гене наблюдали точковые мутации или мутации со сдвигом рамки считывания (Berta et al., 1990; Jäger et al., 1990).

Ген *SRY* (*SRY* – у человека, *Sry* – у мыши) в настоящее время служит лучшим кандидатом на роль гена детерминации семенников на Y-хромосоме у млекопитающих. Однако окончательное подтверждение того, что именно он является главным фактором детерминации семенника, можно было бы получить в результате инсерции ДНК *Sry* в геном яйца нормальной мыши XX. Превращение такой трансгенной мыши XX в самца указало бы на исключительную роль гена *Sry* в определении пола гонады.

Контроль детерминации пола у млекопитающих: аутосомные гены

Ген (или несколько генов?) Y-хромосомы, детерминирующий семенник, необходим, но не он один определяет развитие семенников у млекопитающих. До сих пор неизвестно, каким образом осуществляет свои функции ген детерминации семенников, располагающийся на Y-хромосоме, однако последние данные свидетельствуют о том, что его функции должны быть координированы с функциями некоторых аутосомных генов. Эйхер и Уошбери (Eicher, Washburn, 1983, 1986) обнаружили, что при введении Y-хромосомы *Mus domesticus* в инбредную линию *Mus musculus* путем скрещивания у особей с генотипом XY развивается ткань яичников (рис. 21.6). У половины этих мышей пол оказался инвертированным (их гонады были представлены только тканью яичника), у другой половины в гонадах содержалась как ткань яичников, так и ткань семенников (Eicher, Washburn, 1983,

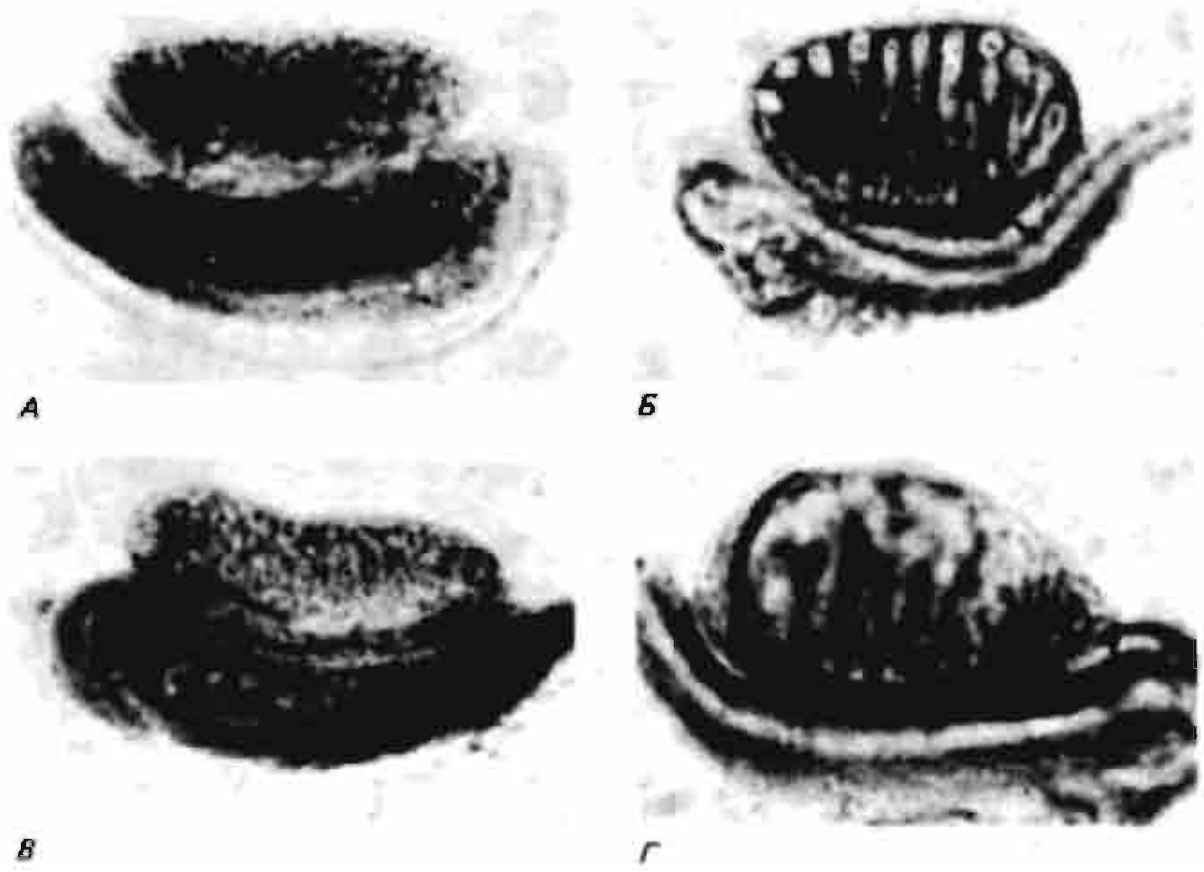


Рис. 21.6. Овариальная ткань в гонадах XY в случае, когда в геноме *Mus musculus* линии C57 содержатся Y-хромосомы *Mus domesticus*. Гонады и прилежащие мезонефросы отпрепарированы у плодов в возрасте 14,5–16 сут. *А*. Нормальный яичник плода XX. *Б*. Семенники нормального мужского плода линии C57. *В*. Яичник самки XY. *Г*. «Яичникосеменник» плода XY, состоящий из овариальной и тестикулярной тканей. (Из Eicher et al., 1982; фотография с любезного разрешения E. Eicher, L. Washburn.)

1986). Детерминирующий семенники ген Y-хромосомы (*Tdy*) каждой линии мышей может кооперироваться со своим собственным аутосомным геном, участвующим в детерминации семенников (*Tda-1*), и ни с каким другим.

Другой аутосомный ген, детерминирующий пол,–это ген *T-associated sex reversal* (*Tas*). Этот ген сегрегирует вместе с генным комплексом *Tjt* на хромосоме 17 *Mus musculus*; различные аллели этого гена обнаружены в разных инбредных линиях мышей (Washburn, Eicher, 1983). В линиях C57 и AKR *M. musculus* развивается около 50% самцов. Однако у мышей C57 Y-хромосома утрачивает способность направлять морфогенез семенников, если к ним попадет хромосома 17 из линии AKR. В таких случаях нормальная детерминация семенников нарушается, и каждая гонада представляет собой смесь из овариальной и тестикулярной тканей.

Мак-Ларен (McLaren, 1988) предположила, что один из генов, регулируемых фактором детерминации семенника,–ген антимюллеровского гормона (АМГ). Этот гормон, выделяемый клетками Сертоли, представляет собой один из первых продуктов тестикулярной ткани. Помимо хорошо известной способности вызывать дегенерацию ткани мюллерова протока (что будет обсуждаться подробнее в этой же главе), данный гормон заставляет культивируемые клетки яичника XX дифференцироваться в тестикулярную ткань (Vigier et al., 1987). Полагают, что АМГ обусловливает появление фримартинов. **Фримартины** – стерильные телята XX, чьи гонады частично или полностью маскулинизированы. Такая особь оказывается одним из членов пары близнецов, причем другой член пары содержит хромосомы XY. Поскольку общее плацентарное кровообращение объединяет этих близнецов, долгое время думали (Lillie, 1917; Wachtel et al., 1980), что какой-то гормон мужского плода вызывает маскулинизацию гонад самки. Поскольку под действием АМГ овариальные клетки крысы организуются в структуры, напоминающие семенные канальцы, этот гормон может быть причиной и появления фримартинов, и нормального морфогенеза семенников.

Модель первичной детерминации пола у млекопитающих

К настоящему времени мы не располагаем бесспорной моделью, с помощью которой можно было бы объяснить детерминацию пола у млекопитающих. На рис. 21.7 показана одна из моделей, объединяющая представления нескольких авторов (Eicher, Washburn, 1986; Burgoyne, 1989).

В основе этой модели лежит допущение, что недифференцированные гонады плода бипотенциальны и что развитие в *обоих* направлениях – мужском и женском – является активным, управляемым генами процессом (т. е. женское развитие не может рассматриваться просто как результат пассивного «невыполнения условий»). Таким образом, существуют два параллельных пути развития: один, ведущий к развитию яичников, другой – к развитию семенников. Кроме того, эта модель предполагает индукционные взаимодействия между линией поло-



Рис. 21.7. Модель генетической регуляции пола у млекопитающих. Ген *Tdy* (если он имеется) инициирует развитие семенников и не дает возможности развиваться яичникам. В отсутствие гена *Tdy* ген *Od* инициирует развитие яичника на более *поздних стадиях*. Унаследованная с аутосомой инверсия пола у мышей может быть следствием временны́х различий в функционировании генов тестикулярного пути. (Из Eicher, Washburn, 1986; Burgoyne, 1989.)

вых клеток и соматической тканью гонады, которую они заселяют. Первое свидетельство этого взаимодействия выражается в том, что первичные половые клетки дают тип гамет, совпадающий с типом гонады, в которую они мигрируют. Например, половые клетки XX, попавшие в семенник, начинают сперматогенез. Реципрокные взаимодействия выражаются в том, что ген *ZFY* (активность которого отмечена при формировании спермиев) в Y-хромосоме эпителия гонады XY не транскрибируется до тех пор, пока гонада не будет индуцирована первичными половыми клетками, заселяющими ее (Koopman et al., 1989).

Первый ген на пути развития яичников – гипотетический ген *Od* (*ovarian-determining*) – расположен на X-хромосоме или на аутосоме. Полагают, что его функция заключается в активации другого гена на пути развития яичников – *Od-1*. (Поисками этих генов никто не занимался, поскольку допущения об их существовании не требовалось в других моделях детерминации пола.) Полагают также, что этот ген активен в первичных половых клетках и вызывает развитие гонады по овариальному пути.

Первый ген на пути развития семенников называется *Testis determining-Y* (*Tdy*), т. е. детерминирующий семенники; он эквивалентен человеческому гену *TDF*. Этот ген начинает функционировать в развитии *раньше*, чем ген *Od* и выполняет две функции: 1) активирует другой ген на пути развития семенников (*Td-1*) и 2) подавляет активацию *Od*. Таким образом, в присутствии гена *Tdy* (что имеет место у индивидуумов XY) формируются семенники, а яичники развиваются в том случае, когда его нет. По-видимому, *Tda-1* и *Tas* представляют собой два гена из тех, которые функционируют на пути детерминации семенников. В соответствии с этой моделью полагают, что явление инверсии унаследованного пола, связанное с этими локусами, объясняется отсутствием координации между *Tdy* и этими аллелями. Такое отсутствие координации может касаться времени экспрессии генов. Аллель *Tdy* линии C57 может активироваться раньше, чем аллель *Tdy Mus domesticus*. Не исключено, что он не в состоянии полностью ингибировать ген *Od* и поэтому овариальная ткань не образуется. Несмотря на значительные успехи, которые были достигнуты в последние годы, анализ первичной детерминации пола у млекопитающих остается (как и в очень далекие времена) одной из самых больших нерешенных проблем биологии развития.

Вторичная детерминация пола

Гормональная регуляция полового фенотипа

Первичная детерминация пола включает формирование либо семенников, либо яичников из недифференцированной ткани гонады. Однако это еще не приводит к развитию полового фенотипа. Вторичная детерминация пола – это развитие женского или мужского фенотипов, обусловленное гормонами, которые вырабатывают яичники или семенники. И женская, и мужская детерминация пола включает два главных временны́х компонента. Первый из

этих компонентов реализуется в период органогенеза, второй (как описано в гл. 19) – в юношеский период.

Как говорилось ранее, в отсутствие гонад возникает женский фенотип. Происходит развитие мюллеровых каналов и редукция вольфова. Это можно наблюдать у людей, родившихся без функциональных гонад. У индивидуумов, клетки которых имеют только одну Х-хромосому (и не имеют Y-хромосомы), сначала происходит закладка яичников, но они атрофируются перед рождением. Под действием эстрогена, поступающего от матери и из плаценты, эти дети рождаются с женскими половыми протоками (Langman, Wilson, 1982)[1].

Формирование мужского фенотипа связано с секрецией тестикулярных гормонов, обусловливающих развитие вольфова канала и атрофию мюллерова. Первый из этих гормонов – антимюллеровский гормон (АМГ). Этот белковый по своей природе гормон, секретируемый клетками Сертоли, вызывает дегенерацию мюллерова канала. Второй гормон представляет собой стероид тестостерон, вырабатываемый клетками Лейдига. Этот гормон обусловливает дифференцировку вольфова канала в придаток семенника, семявыносящий канал и семенные пузырьки; из мочеполового бугорка под воздействием тестостерона развивается мошонка и половой член. Существование этих двух независимых систем маскулинизации демонстрируется на примере людей с синдромом нечувствительности к андрогенам. Эти XY-индивидуумы обладают геном фактора детерминации семенников, а следовательно, и семенниками, продуцирующими тестостерон и АМГ. Однако такие люди лишены цитоплазматического белка, связывающего тестостерон, и поэтому не могут реагировать на тестостерон, вырабатываемый их семенниками (Meyer et al., 1975). В то же время они реагируют на эстроген надпочечников, отчего приобретают четко выраженные женские признаки (рис. 21.8). При этом у таких людей имеются семенники, которые, не реагируя на тестостерон, реагируют на АМГ. В результате их мюллеров канал дегенерирует. Эти люди развиваются в нормальных, но стерильных женщин без матки и яйцеводов.

[1] Механизм, лежащий в основе дифференцировки мюллерова канала под действием эстрогена, не совсем понятен. Во время эмбриогенеза канал исключительно чувствителен к эстрогенным соединениям, о чем свидетельствуют тератогенные эффекты **диэтилстильбэстрола** (ДЭС). Этот синтетический эстроген в сороковые – шестидесятые годы прописывали женщинам для сохранения беременности. У дочерей, рожденных этими женщинами, с высокой частотой наблюдались аномалии мюллерова канала, которые выражались в нарушениях развития эпителия влагалища и шейки матки, строения яйцеводов и матки и в более частых по сравнению с нормой случаях рака влагалища (Robbey, 1982; Bell, 1986).

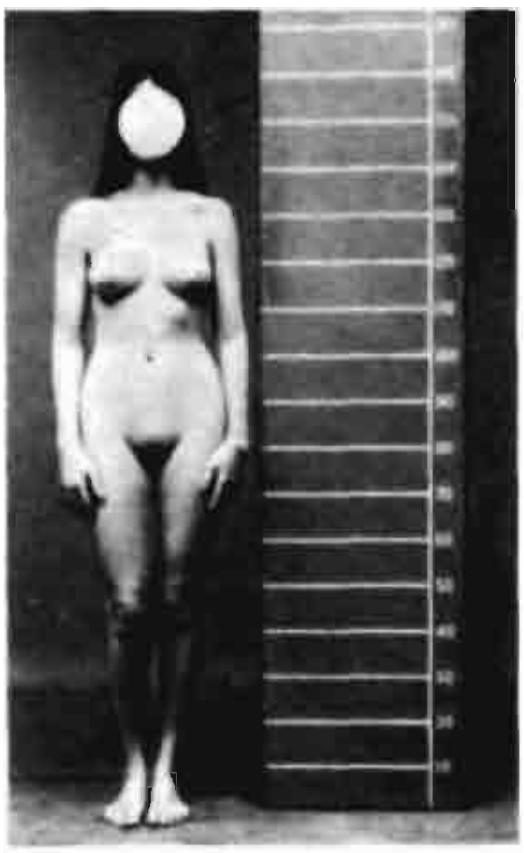


Рис. 21.8. Синдром нечувствительности к андрогенам. Несмотря на кариотип XY и присутствие семенников, у человека развиваются вторичные женские половые признаки. Однако в данном случае отсутствуют производные мюллерова канала. (Фотография с любезного разрешения C. B. Hammond.)

Итак, существуют два различных маскулинизирующих гормона – тестостерон и АМГ. Есть, однако, данные о том, что в некоторых тканях активным гормоном служит не тестостерон. В 1974 г. Сиитери и Уилсон (Siiteri, Wilson, 1974) обнаружили, что в мочеполовом синусе и бугорке тестостерон превращается в **5α-дигидротестостерон**, но в ткани вольфова канала этого не происходит. В том же 1974 г. в Доминиканской Республике была обнаружена небольшая община, обитатели которой в нескольких случаях оказались носителями генетической недостаточности по 5α-кетостероидредуктазе – ферменту, превращающему тестостерон в дигидротестостерон (Imperato-McGinley, 1974). Помимо функционирующих семенников у этих XY-индивидуумов имелся также замкнутый влагалищный карман и увеличенный клитор. Для них была характерна девическая внешность, и их воспитывали соответствующим образом. Однако по своему внутреннему строению их следовало бы отнести к мужскому полу: у них развивался вольфов канал и дегенерировал мюллеров. Таким образом, представляется вероятным, что формирование наружных половых органов находится под контролем дигидротестостерона, тогда как дифференцировка вольфова канала контролируется собственно тестостероном (рис. 21.9). Любопытно, что маскулинизация наружных половых органов становится чувствительной к тестосте-

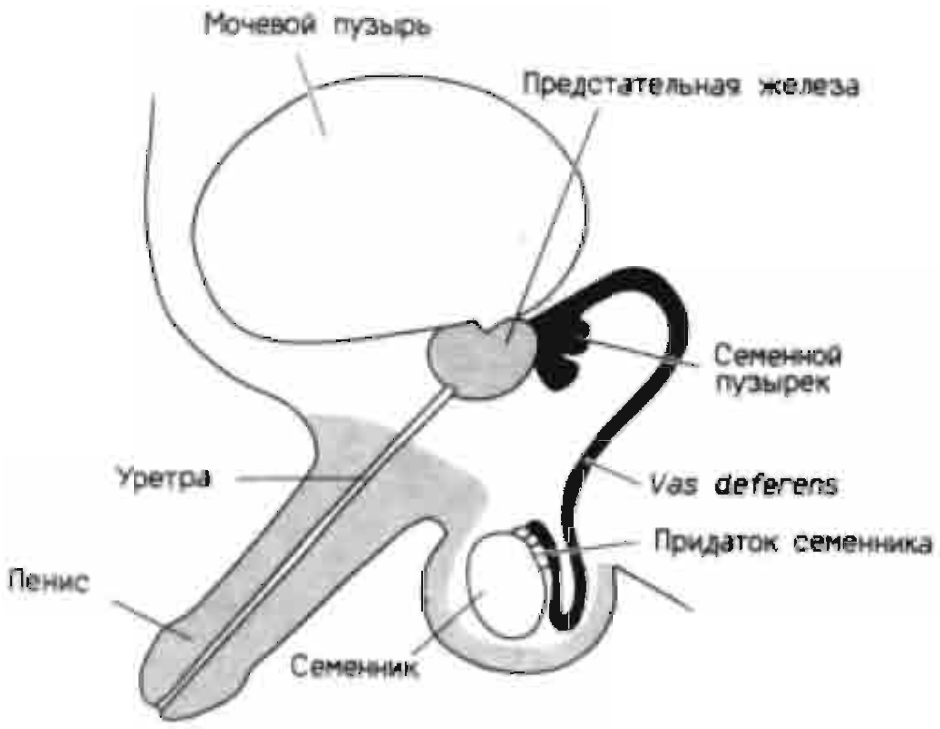


Рис. 21.9. Отделы половой системы мужского плода человека, развитие которых зависит от тестостерона (черный цвет) и дигидротестостерона (серый цвет). (По Imperato-McGinley et al., 1974.)

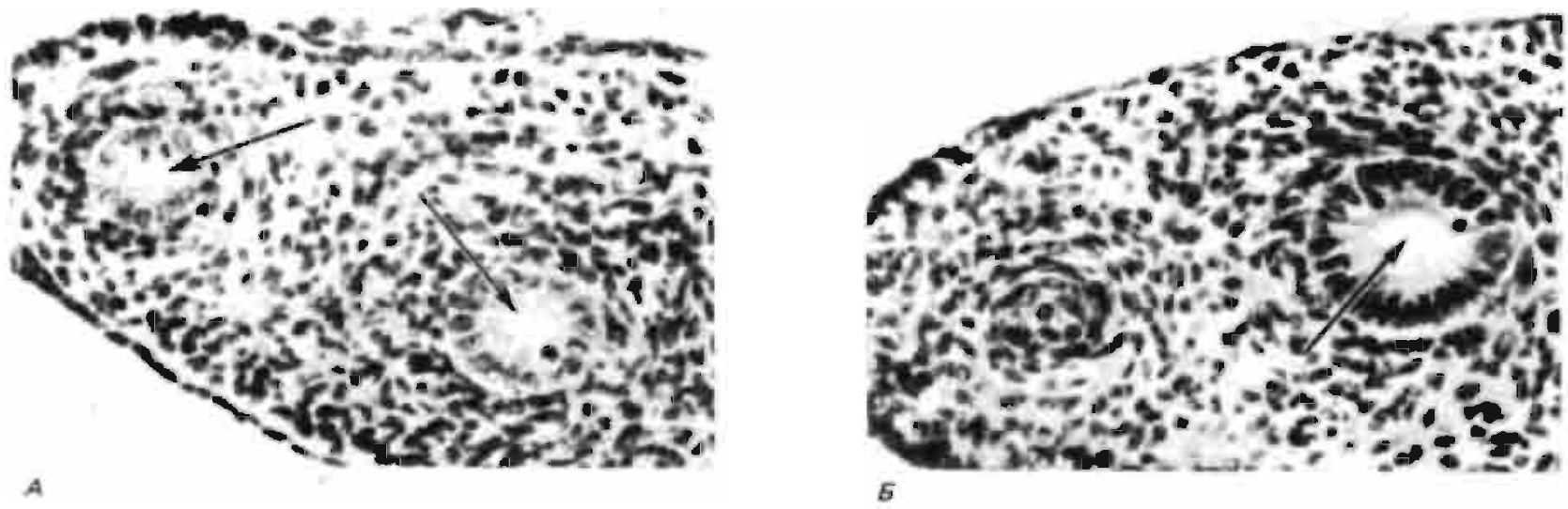


Рис. 21.10. Активность антимюллеровского фактора в переднем отделе репродуктивного тракта 14,5-суточного плода крысы через трое суток культивирования. *А.* И мюллеров канал (*стрелка влево*), и вольфов (*стрелка вправо*) открыты. *Б.* Вольфов канал (*указан стрелкой*) открыт, а мюллеров дегенерировал и закрылся. (Фотографии с любезного разрешения N. Josso.)

рону при половом созревании, что приводит к появлению явных мужских признаков у лиц, первоначально принимаемых за девочек.

Антимюллеровский гормон представляет собой гликопротеин, состоящий из 560 аминокислот (Cate et al., 1986) и вырабатываемый клетками Сертоли (Tran et al, 1977). Если фрагменты семенников плода или изолированные клетки Сертоли поместить вместе с культивируемыми кусочками ткани, содержащей части мюллерова и вольфова каналов, то мюллеров канал атрофируется, тогда как в вольфовом канале не произойдет никаких изменений (рис. 21.10). Чувствительность мюллерова канала к этому гормону сохраняется в течение короткого периода времени (рис. 21.11), и семенники прекращают секрецию этого фактора незадолго перед рождением[1].

Итак, мы видим, что как только сформируются семенники, они начинают вырабатывать два гормона, вызывающих маскулинизацию плода. Один из этих гормонов – тестостерон – может превращаться в более активную форму тканью, из которой разви-

[1] АМГ является потенциальным противоопухолевым средством. Донахью и ее коллеги (Fuller et al., 1984; Cate et al., 1986) показали, что АМГ способствует разрушению половых путей у самок мышей и у женщин. Осуществление клинических испытаний зависит от производства достаточного количества АМГ, полученного в результате клонирования его гена.

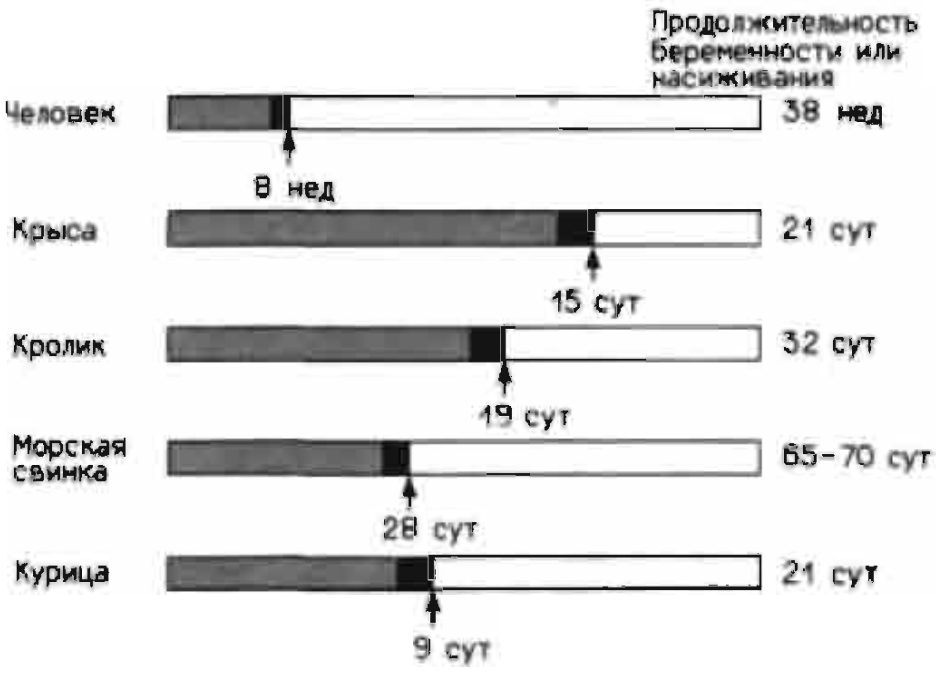


Рис. 21.11. Чувствительность мюллеровых каналов к антимюллеровскому гормону (АМГ). Области, закрашенные серым цветом, обозначают продолжительность индифферентного состояния гонады. Черные области – период, в течение которого мюллеровы каналы отвечают на воздействие АМГ. (По Josso et al., 1977.)

ваются наружные половые органы. У самок эстрогена, секретируемого яичниками плода, по-видимому, достаточно для дифференцировки мюллерова канала в матку, яйцеводы и шейку матки. Так половые хромосомы контролируют половой фенотип особи.

Центральная нервная система

Один из наиболее противоречивых вопросов, связанных с детерминацией вторичных половых признаков,– это становление поведенческих реакций, обусловленных полом. Оказалось, что в мозге у певчих птиц тестостерон регулирует увеличение числа нейронов в особых группах, специфичных для самцов. Как известно, самцы канареек или зебровых амадин обладают выразительным пением, а самки, если и поют, то очень мало. Эти песни служат для маркировки территорий и привлечения половых партнеров. Способность петь контролируется шестью различными группами нейронов (рис. 21.12). Эти группы (**ядра**) соединены друг с другом нейронами. Такие ядра у самцов канарейки в несколько раз больше, чем соответствующие ядра у самок, а у зебровых амадин самка может быть вовсе лишена одного из этих ядер (Arnold, 1980; Konishi, Akutagawa, 1985).

Тестостерон играет важную роль в контроле пения. Было показано, что у взрослых самцов зебровой амадины (Prove, 1978) существует линейная корреляция между интенсивностью пения и концентрацией тестостерона в сыворотке крови. Кроме того, обнаружено, что сезонные изменения уровня тестостерона коррелируют с сезонным

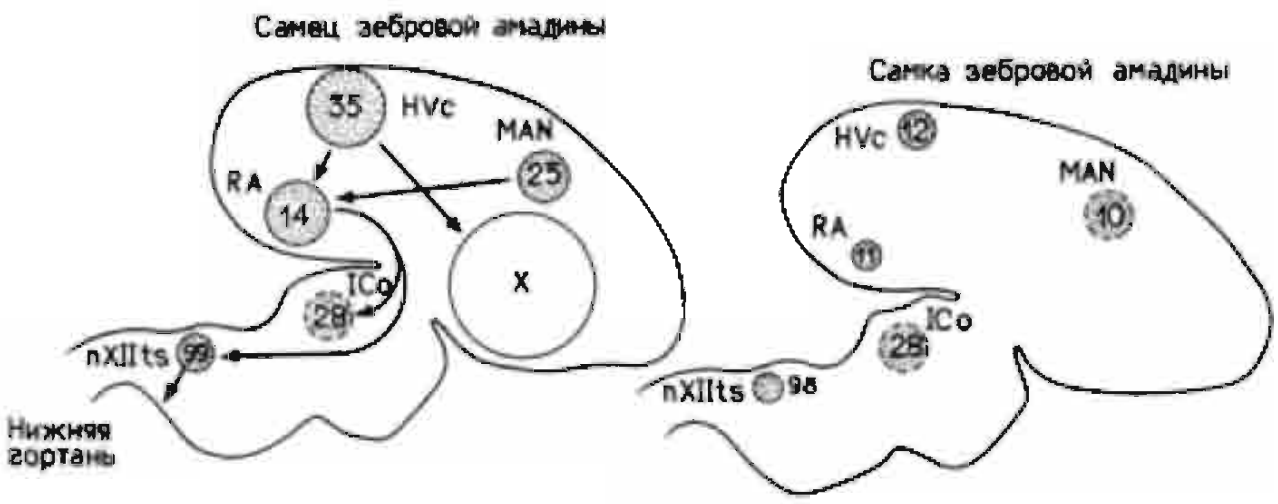


Рис. 21.12. Половой диморфизм мозга у птиц. На схеме отмечены основные нервные поля, которые предположительно контролируют песню у зебровой амадины. Специфические области отмечены окружностями, причем размеры этих окружностей пропорциональны объему, занимаемому данной областью. Изученные области представлены окружностями, изображенными штриховыми линиями. Цифры внутри кружков обозначают долю клеток (в %), включивших меченый тестостерон. Связанные с полом различия в объемах трех из этих областей (HVc, RA и nXIIts) являются статистически значимыми; область X в мозге самки зебровой амадины не обнаружена. Различия в связывании тестостерона областями HVc и MAN статистически значимы; в других отделах мозга половых различий в связывании стероидного гормона не обнаружено. Стрелками указаны пути аксонов, соединяющих эти области у самца. (По Arnold, 1980.)



Рис. 21.13. Схема, представляющая области связывания эстрогена в обобщенном мозге самки млекопитающих. (По McEwen, 1981.)

характером пения этих птиц. При снижении уровня тестостерона уменьшается не только интенсивность песни, но и размеры ядер в мозге самцов (Nottebohm, 1981). Кастрированные зяблики не поют, но после инъекции тестостерона они возобновляют пение в ноябре, хотя по законам природы они в это время года молчат (Thorpe, 1958). Инъекции тестостерона могут заставить петь самок некоторых видов птиц (Nottebohm, 1980). У таких птиц наблюдали увеличение четырех мозговых ядер, контролирующих пение, на 50–69%. С помощью радиоавтографии (Arnold et al., 1976) было выявлено, что нейроны ядер, контролирующих пение, включали меченый тестостерон, тогда как нейроны других областей тестостерона не включали. Итак, очевидно, что гормоны гонад играют важную роль в развитии отделов нервной системы, определяющих поведение, связанное с полом.

В случае млекопитающих ситуация осложняется, поскольку у этих животных трудно выделить поведенческие реакции, характерные лишь для одного пола. У крыс примером одной из таких поведенческих реакций может служить введение полового члена во влагалище самки; этот акт контролируется двигательными нейронами, обеспечивающими функционирование mm. levator ani et bulbocavernosus. И те и другие нейроны располагаются в спинальном ядре, которое может избирательно накапливать тестостерон. У самок крыс соответствующие мышцы рудиментарны и количество связанных с ними нейронов резко уменьшено (Breedlove, Arnold, 1980). Можно полагать, что тестостерон вызывает в упомянутом ядре изменения двух типов. У плодов и новорожденных крыс он предотвращает «нормальную» гибель нейронов в этом ядре. У самок в спинальном ядре утрачивается до 70% нейронов, тогда как у самцов – лишь 25%. У взрослых крыс тестостерон способствует сохранению размеров нервных клеток и их дендритов. Площадь тел нейронов и длина дендритов в этом спинальном ядре уменьшаются вдвое при кастрации взрослой крысы, но эта редукция оказывается обратимой после введения тестостерона (Nordeen et al., 1985; Kurz et al., 1986).

Тестостерон – не единственный стероид, влияющий на поведение. В мозге млекопитающих обнаружены нейроны, чувствительные к эстрогену. Они располагаются (рис. 21.13) в отделах, которые, как известно, контролируют поведение, связанное с размножением – в гипоталамусе, гипофизе и миндалинах (McEwen, 1981). Показано (Pfaff, McEwen, 1983), что эстроген изменяет электрические и химические характеристики тех нейронов гипоталамуса, хроматин которых способен связывать эстроген. Еще Терасава и Сойер (Terasawa, Sawyer, 1969) обнаружили, что электрическая активность этих нейронов у крыс варьирует в течение сезонного эстрального цикла, повышаясь во время овуляции. Кроме того, эстроген, по-видимому, стимулирует те из нейронов этой области, которые индуцируют репродуктивное поведение самок. Если крысам после овариэктомии инъецировать эстроген прямо в гипоталамус, то они принимают особую позу (**лордоз**), стимулирующую самцов к спариванию, тогда как контрольным овариэктомированным животным такой тип поведения не свойствен (Barfield, Chen, 1977; Rubin, Barfield, 1980). Полагают, что в основе механизма действия эстрогена на специфическую активность нейронов лежит повышение их проницаемости для ионов калия (Nabekura et al., 1986).

Дополнительные сведения и гипотезы

Развитие полового поведения

Известно, что воздействие гормонами в высоких дозах на крыс и мышей в плодный период развития влияет на их поведение во взрослом состоянии. Если новорожденных самцов крыс кастрировать, лишив их тем самым тестостерона в неонатальный период, то у них начинается циклическое выделение гонадотропина (характерное для самок) и по достижении половой зрелости в их поведении появляются черты, характерные для самок, такие, как лордоз (Tiefer, 1970). И напротив, если новорожденным крысам самкам ввести единственную дозу тестостерона в неонатальный период, то их эндокринная система начинает функционировать по мужскому типу и у них развивается характерный для самцов поведенческий стереотип. Таким образом, каждая новорожденная крыса появляется на свет, обладая способностью проявить либо мужской, либо женский тип поведения.

Однако, как это ни странно, мужские поведенческие реакции у крыс можно индуцировать путем однократной инъекции новорожденным самкам женского полового гормона эстрадиола[1] (Daughty et al., 1975). Это свойство эстрадиола – способствовать маскулинизации полового поведения крыс – послужило основой для создания **конверсионной гипотезы**. Согласно этой гипотезе, в мозге млекопитающих заложен женский тип поведения. Если же, однако, в критическую стадию своего развития (сразу после рождения или непосредственно перед рождением – в зависимости от вида) мозг получит эстрадиол, то произойдет дефеминизация. Клетки мозга могут либо непосредственно получать эстрадиол из кровотока, либо синтезировать его из циркулирующего в крови тестостерона. Чтобы предупредить дефеминизацию, у самок млекопитающих связывающие эстроген сывороточные белки элиминируют свободно циркулирующий в крови эстрадиол. Что касается самцов, то у них тестостерон не связывается этими белками и поэтому проникает в мозг, где превращается в эстрадиол. У новорожденных крыс такую конверсию можно наблюдать в клетках гипоталамуса и лимбической системы – известно, что оба этих отдела мозга регулируют гормональное и репродуктивное поведение (Reddy et al., 1974).

Создается впечатление, что неонатальный эстрадиол отвечает за «дефеминизацию» мозга, а действительная маскулинизация поведения, вероятно, обусловливается тестостероном или дигидротестостероном. При химическом ингибировании реакции превращения тестостерона в эстрадиол у самцов проявляются поведенческие реакции, характерные для обоих полов (McEwen et al., 1977; Vreeburg et al., 1977). Следовательно, возможно, что, как и в случае формирования мужской половой системы, развитие мужской нервной системы включает два этапа – дефеминизацию, а затем маскулинизацию.

Экстраполяция данных от крысы к человеку – весьма рискованное занятие, тем более, что пока для человека не найдено каких-либо стереотипных, связанных только с полом, поведенческих реакций. Поведение, квалифицируемое как «мужское» в одном обществе, представляется «женским» в другом (приводя в замешательство неискушенных путешественников). Появляющиеся в научно-популярной печати публикации, в которых постулируются биологически детерминированные различия между полами в способностях или поведении, вызывают резкую критику (Kolata, 1980; Jacklin, 1981; Bleier, 1984; Fausto-Sterling, 1985). Более того, признанию специфичности того или иного типа поведения для одного из полов мешает перекрывание поведенческих реакций, проявляемых каждым полом.

[1] Термины «эстроген» и «эстрадиол» часто используются как взаимозаменяемые. Однако следует иметь в виду, что эстроген относится к классу стероидных гормонов, обусловливающих установление и поддержание специфических женских признаков. Эстрадиол представляет собой один из таких гормонов, и у большинства млекопитающих (в том числе и у человека) он является наиболее сильно действующим из эстрогенов.

Хромосомная детерминация пола у *Drosophila*

И у млекопитающих, и у насекомых, таких, как *Drosophila*, пол определяется системой XX/XY. Однако механизмы определения пола у этих групп очень различны. У млекопитающих Y-хромосома играет кардинальную роль в определении мужского пола. Поэтому особи с генотипом X0 – стерильные *самки*, имеющие яичники, матки и яйцеводы (однако, если у них и образуются яйца, то количество их очень невелико). У *Drosophila* детерминация пола

Таблица 21.1. Соотношение Х-хромосомы и аутосом у различных половых фенотипов *Drosophila melanogaster* [1]

Х-хромосомы	Набор аутосом (А)	Отношение X:A	Пол
3	2	1,50	Метасамка
4	3	1,33	Метасамка
4	4	1,00	Нормальная самка
3	3	1,00	Нормальная самка
2	2	1,00	Нормальная самка
2	3	0,66	Интерсекс
1	2	0,50	Нормальный самец
1	3	0,33	Метасамец

[1] По Strickberger, 1968.

обусловлена равновесием между женскими детерминантами на Х-хромосоме и мужскими детерминантами на аутосомах (не половых хромосомах). Если в диплоидной клетке находится всего лишь одна Х-хромосома (1X:2A), то возникает самец. Если в диплоидной клетке содержатся две Х-хромосомы (2X:2A), то развивается самка. Таким образом, дрозофилы с генотипом X0 – стерильные *самцы*. В табл. 21.1 представлены различные соотношения Х-хромосом и аутосом и возникающий в результате пол.

У *Drosophila* и насекомых вообще встречаются **гинандроморфы** – особи, у которых одни части тела мужские, другие – женские (рис. 21.14; цветной рисунок на внутренней стороне обложки). Такие особи возникают в том случае, когда одно из эмбриональных ядер утрачивает Х-хромосому. Клетки, содержащие потомки такого ядра, будут не женскими (XX), а мужскими (X0). Поскольку у насекомых нет половых гормонов, модулирующих подобные явления, каждая клетка «выбирает» свой собственный пол. Клетки X0 проявляют мужские признаки, а клетки XX – женские. Эта ситуация служит прекрасным примером связи пола с Х-хромосомой. Отсюда можно вывести и другое заключение – в определении пола у дрозофилы Y-хромосома не играет роли. Скорее всего она необходима лишь для обеспечения фертильности самцов. Их Y-хромосома активируется на поздних этапах развития при формировании спермиев.

Любая теория детерминации пола у дрозофилы должна объяснить, каким образом читается отношение X:A и как эта информация передается к генам, контролирующим мужской или женский фенотипы. Пока еще неизвестны внутренние механизмы, позволяющие клеткам узнавать отношение X:A, однако исследования последних 5 лет произвели настоящую революцию в наших представлениях о детерминации пола у дрозофилы. Бóльшая часть этих исследований касается идентификации и анализа генов, необходимых для половой дифференцировки, и приуроченности функции этих генов к последовательным этапам развития.

Как и гомеозисные гены (гл. 18) и гены-переключатели (гл. 11), гены детерминации пола обусловливают выбор между двумя альтернативными путями развития. Мутации большинства из этих генов – *Sex-lethal* (*Sxl*), *transformer* (*tra*) и *transformer-2* (*tra-2*) трансформируют особей XX в самцов. У мух XX,

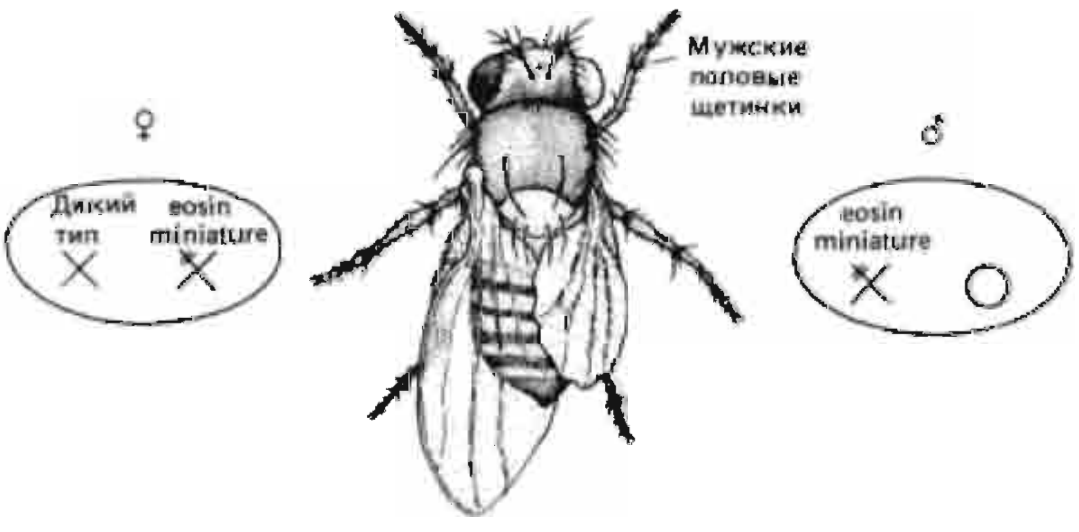


Рис. 21.14. Гинандроморф *Drosophila melanogaster*, у которого левая сторона женская (XX), а правая мужская (X0). Мужская сторона утратила Х-хромосому, несущую аллели окраски глаз и формы крыла дикого типа, в результате чего на оставшейся Х-хромосоме экспрессировались рецессивные аллели *white eye* и *miniature wing*. (По Morgan, 1919.)

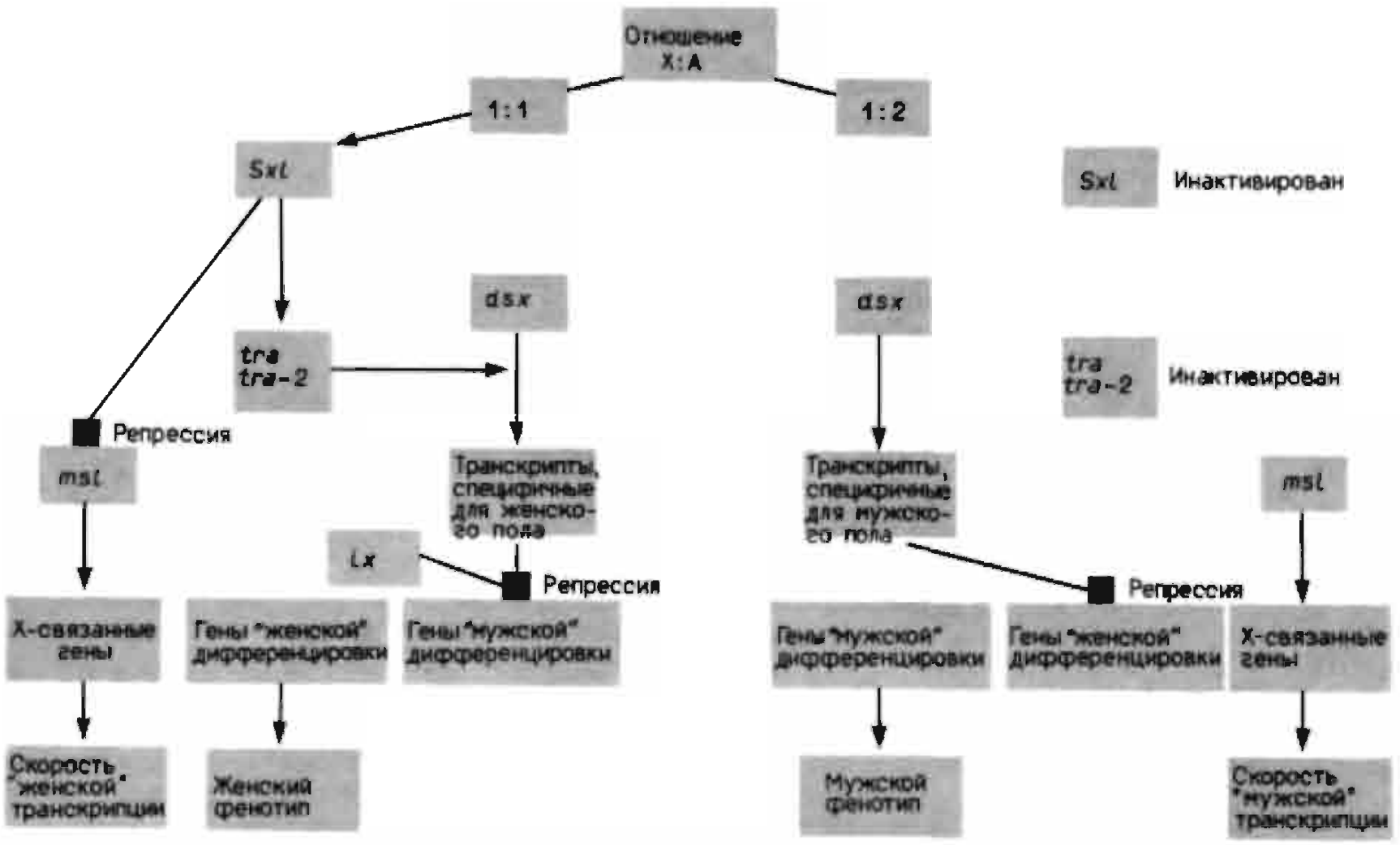


Рис. 21.15. Модель регуляторного каскада, предлагаемая для объяснения детерминации пола у *Drosophila*. Стрелки показывают активацию, а квадраты в конце линии — репрессию. Локусы *msl*, находящиеся под контролем гена *Sxl*, регулируют дозу компенсаторной транскрипции мужской Х-хромосомы. (По Baker et al., 1987.)

гомозиготных по гену *intersex* (*ix*), формируется интерсексуальный (промежуточный) фенотип, когда в одном органе можно встретить и мужскую, и женскую ткань. Ген *doublesex* (*dsx*) имеет важное значение для половой дифференцировки обоих полов. Гомозиготные рецессивные аллели *dsx* превращают как мух XX, так и мух XY в интерсексов (Baker, Ridge, 1980; Belote et al., 1985a).

Представления о роли этих генов в развитии основаны на: 1) интерпретации генетических скрещиваний, следствием которых оказываются мухи, несущие две или более мутаций, и 2) анализе последствий, к которым приводит полное отсутствие продуктов одного из этих генов. Эти исследования позволили создать модель такого регуляторного каскада (рис. 21.15).

Кульминационная роль гена *Sex-lethal* в детерминации пола

Первый этап детерминации пола у *Drosophila* заключается в прочтении информации, касающейся отношения X:A. Какие элементы Х-хромосомы будут «считываться» и как будет использоваться эта информация? Оказывается, высокие значения X:A отвечают за активацию гена *Sex-lethal* (*Sxl*), «включающего» феминизацию. При низких значениях X:A (у самцов) *Sxl* остается неактивным (Cline, 1983; Salz et al., 1987). У XX-дрозофил ген *Sxl* активен в течение первых двух часов после оплодотворения; он транскрибирует особый эмбриональный тип *Sxl*-мРНК, который обнаруживается приблизительно еще два часа (Salz et al, 1989). Коль скоро активация гена *Sxl* произошла, он останется активным, несмотря на любые дальнейшие изменения отношения X:A (Sánchez, Nöthiger, 1983). Функционирование гена *Sxl* необходимо для того, чтобы XX-зародыши стали развиваться по женскому пути, а также для поддержания необходимого уровня транскрипции обеих Х-хромосом. У XX-особей, где *Sxl* не функционирует, возникает мужской фенотип и Х-хромосомы транскрибируются значительно быстрее (так, как транскрибировалась бы единственная Х-хромосома у нормального мужского зародыша, которая должна дать столько генного продукта, сколько дают две Х-хромосомы нормальной самки). У зародышей XX эта сверхстимуляция транскрипции Х-хромосомы летальна.

Полагают, что эта секс-специфическая транскрипция стимулируется **«нумераторными элементами»** Х-хромосомы, что составляет часть «Х» отношения X:A. Клайн (Cline, 1988) показал, что два

таких нумераторных элемента представляют собой гены Х-хромосомы *sisterless-a* и *sisterless-b*. В упомянутой работе этот автор обнаружил вариант аутосомы дрозофилы, содержащий два участка Х-хромосомы, включившиеся в аутосому путем инсерции. У самцов такая хромосома обусловливала летальный исход, потому что самцы, получившие эту хромосому, активировали свой ген *Sxl* так, как если бы они унаследовали две Х-хромосомы. Активированный ген *Sxl* вызывал компенсацию дозы Х-хромосомы по женскому типу (т.е. уменьшал транскрипцию), но, поскольку у самца была только одна Х-хромосома, это приводило к летальному исходу. Так, у Клайна появилась возможность изучать нумераторные гены. Ими должны быть гены на той части аутосомы, которая произошла от Х-хромосомы и чье присутствие активировало ген *Sxl*. Используя эту методику, Клайну удалось обнаружить гены *sisterless-a* и *sisterless-b*. Обладание двумя копиями этих генов приводило к гибели зародышей XY, а одновременная делеция одной копии каждого локуса *sis* приводила к гибели самок (у этих зародышей не активировался ген *Sxl* даже несмотря на генотип XX). Следовательно, присутствие двух копий каждого из генов *sis* равноценно наличию двух копий Х-хромосомы. Гены *sis*, вероятно, являются не единственными нумераторными элементами, так как Клайн приводит случаи, когда генетический фон мухи-самца дикого типа оказывался нечувствительным к двойным дозам этих генов.

Ген *Sxl*, по-видимому, не реагирует на нумераторные элементы без материнского гена, продукт которого содержится в цитоплазме яйца. Активация *Sxl* не происходит без продукта гена *daughterless* (*da*). Активность гена *daughterless* необходима матерям самок. Если он не работает в яичниках, то яйца будут лишены этого продукта. Отсутствие белка daughterless препятствует активации гена *Sxl*. Это не влияет на зародышей XY (так как у них в любом случае не активируется *Sxl*), но окажется летальным для зародышей-самок, потому что механизм компенсации дозы вызовет более быструю, мужскую, транскрипцию обеих Х-хромосом (Cline, 1986; Cronmiller, Cline, 1987), откуда происходит и название мутации. Таким образом, вскоре после оплодотворения гены *sis-a*, *sis-b* и *da* обусловливают транскрипционную активность *Sxl* только у зародышей женского пола.

Вскоре после того как произойдет транскрипция этих генов, активируется второй промотор гена *Sex-lethal*; этот ген транскрибируется как у самцов, так и у самок. Однако анализ кДНК от мРНК *Sxl* свидетельствует о том, что мРНК *Sxl* самцов отличается от мРНК *Sxl* самок (Bell et al., 1988). Это результат дифференциального процессинга РНК. Более того, оказывается, что белок Sxl связывается с предшественником своей собственной мРНК, обеспечивая сплайсинг по женскому типу. Поскольку у самцов нет белка Sxl, их новые транскрипты Sxl проходят процессинг по мужскому типу. Мужская мРНК Sxl нефункциональна. Если специфичная для самок мРНК *Sxl* кодирует белок из 354 аминокислот, то транскрипт Sxl, специфический для самцов, после аминокислоты 48 содержит кодон, терминирующий трансляцию (УГА). Дифференциальный процессинг РНК, помещающий этот терминирующий кодон в мРНК, специфическую для самцов, представлен на рис. 21.16. У самцов сплайсинг ядерного транскрипта дает три экзона, причем

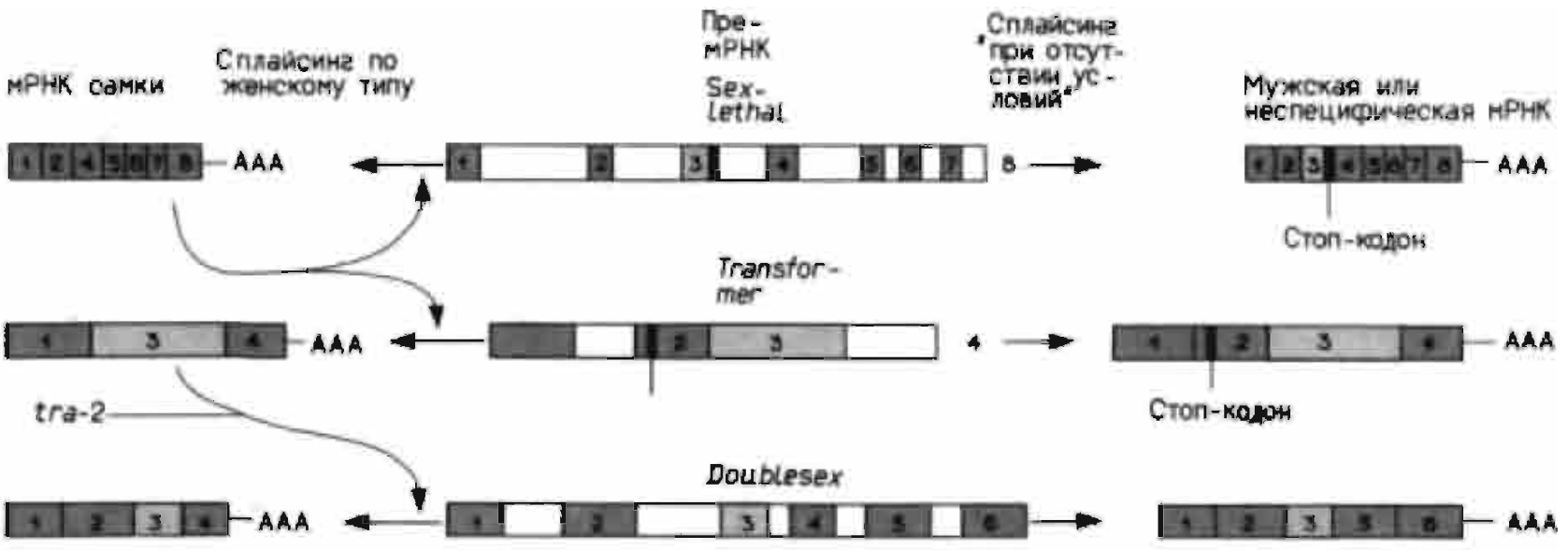


Рис. 21.16. Секс-специфический сплайсинг РНК в трех основных генах детерминации пола у дрозофилы. Пре-мРНК изображены в центральной части схемы; они идентичны в ядрах самок и самцов. В каждом случае транскрипт, специфический для самки, располагается слева, а транскрипт – результат «отсутствия условий» (будь то мужской или неспецифический) – показан справа. Экзоны обозначены цифрами, отмечено положение терминирующих кодонов и поли(А)-сайтов. (По Baker, 1989.)

терминирующий кодон находится в центральном экзоне. У самок процессинг РНК дает только два экзона, а специфичный для самцов центральный экзон вырезается в качестве большого интрона. Таким образом, мРНК, специфичная для самок, лишена терминирующего кодона.

По нуклеотидной последовательности специфического для самок транскрипта Sxl можно предсказать некоторые свойства его белка. Этот белок должен иметь две области, играющие важную роль в связывании РНК. Последние должны быть общими с ядерными РНК-связывающими белками, такими, как в мяРНП. Белл и др. (Bell et al., 1988) предположили, что для РНК-связывающего белка, кодируемого *Sxl*, необходимы две мишени. Одна из этих мишеней – сама пре-мРНК *Sxl*. Функционирование такого механизма обеспечило бы женский путь развития после того, как произошла начальная активация. Второй мишенью специфического для самого белка Sxl могла бы быть пре-мРНК следующего гена этого пути – гена *transformer*.

Гены *transformer*

Ген *Sxl* регулирует детерминацию соматического пола путем контроля процессинга транскрипта гена *transformer* (*tra*). Как показано в гл. 13, сплайсинг этого гена у самцов и у самок происходит по-разному. Как у самцов, так и у самок обнаружены и специфическая для самок мРНК, и неспецифическая мРНК. Неспецифическая мРНК *tra*, подобно мужскому транскрипту *Sxl*, несет недалеко от начала матрицы терминирующий кодон, делающий белок нефункциональным (Boggs et al., 1987). В гене *tra* второй экзон неспецифической мРНК имеет терминирующий кодон. При образовании мРНК, специфической для самок, этот экзон не используется (рис. 21.16). Каким образом самки могут образовывать транскрипты, отличающиеся от транскриптов самцов? Полагают, что специфический для самок белок гена *Sxl* связывается с некими пре-мРНК *tra*, вызывая у них процессинг, при котором удаляется второй экзон (см. гл. 13). В результате образуется белок, специфический для самок. Этот белок играет решающую роль в детерминации женского пола. Если мух XY заставить производить транскрипт, специфический для самок, то эти мухи становятся самками. Неспецифический транскрипт не оказывает воздействия ни на самцов, ни на самок (McKeown et al., 1988).

Продукт *tra*, специфический для самок, действует вместе с геном *transformer-2* (*tra-2*), способствуя созданию женского фенотипа. (Ген *tra-2* не требуется для детерминации мужского пола, но он понадобится самцам позже – при сперматогенезе.) Ген *tra-2* активен постоянно и синтезирует один и тот же продукт у самцов и у самок. Этот белок tra-2, как и специфический для самок белок Sxl, содержит РНК-связывающий домен (Amrein et al., 1988; Goralski et al., 1988). Считают, что ген *tra-2* может связываться с транскриптом гена *doublesex* только в присутствии белка tra, специфичного для самок (Baker, 1989).

Doublesex – ген-переключатель детерминации пола

Ген *doublesex* активен у самцов и самок, но его первичный транскрипт подвергается секс-специфическому процессингу (Baker et al., 1987). Мужские и женские транскрипты идентичны по первым трем экзонам. Различия между 3'-экзонами напоминают различия между двумя типами молекул IgM (гл. 13). Фрагмент, служащий экзоном в транскриптах, специфических для самок, является частью интрона транскриптов, специфических для самцов. Более того, молекулярный анализ доминантных *dsx*-мутаций показал, что они представляют собой инсерции в экзоне, специфическом для самок. При наличии доминантного аллеля *dsx* у XX-особи эта особь становится самцом.

Альтернативный процессинг РНК, по-видимому, является результатом активности генов *transformer* (рис. 21.16). Если активен только ген *tra-2*, то сплайсинг транскрипта doublesex идет по мужскому типу. Этот транскрипт производит белок, ингибирующий гены, ответственные за женские признаки клеток. Вместе с тем если ген *tra* синтезирует свой активный, специфический для самок белок, то этот белок подвергается и иному типу процессинга. Образуется специфический для самок транскрипт, продукт которого ингибирует гены, ответственные за мужские признаки. В соответствии с этой моделью (Baker, 1989) каскад генетических событий, регулирующий становление пола, сводится к тому, какой тип мРНК образуется в результате процессинга транскрипта *doublesex*. Если отношение X:A равно 1, то *Sxl* создает специфический для самок фактор сплайсинга, вызывающий сплайсинг транскрипта гена *tra* по женскому типу. Белок, специфический для самок, взаимодействует с фактором сплайсинга *tra-2*, вызывая сплайсинг пре-мРНК *doublesex* по женскому типу. Если транскрипт *doublesex* не подвергался этому воздействию, то его процессинг пойдет по типу «отсутствия условий» и даст специфическую для самца матрицу.

Гены-мишени каскада детерминации пола

У дрозофилы существует большое число белков, которые встречаются у особей одного пола и не встречаются у особей другого. У самок к этому



Рис. 21.17. Схема гермафродита и мужской особи червя *Caenorhabditis elegans*. Серым цветом выделена репродуктивная система. (Из Hodgkin, 1985.)

числу относятся белки желтка и белки яйцевой оболочки (хориона). У самцов обнаружены многочисленные белки, вызывающие поведенческие изменения у самки после спаривания и стабилизирующие сперму в женских половых путях (Wolfner, 1988). Регуляция активности генов, ответственных за синтез этих белков, осуществляется каскадом реакций, участвующих в детерминации пола. С помощью температурочувствительных (*ts*) аллелей гена *tra-2* было показано, что пути половой детерминации дрозофилы активны от стадии поздней личинки до становления взрослого организма. Аллель $tra\text{-}2^{ts}$ представляет собой температурочувствительный аллель, наличие которого при пермиссивных (низких) температурах приводит к развитию женского фенотипа, а при непермиссивных (более высоких) температурах – к развитию мужского фенотипа. Повышение температуры от пермиссивной к непермиссивной на поздних личиночных стадиях и на стадии куколки заставит личинку XX или куколку XX превратиться в самца. Кроме того, если взрослого мутанта содержать при низких температурах, то его жировое тело будет синтезировать белки желтка, которые должны поступать в ооцит. При сдвиге температуры в сторону более высокой – непермиссивной – транскрипция генов, кодирующих белки желтка, снижается (Belote et al., 1985b). Заслуживают внимания данные о том, что если взрослых мух XX $tra\text{-}2^{ts}$ содержать при непермиссивных температурах в течение нескольких дней, то в их поведении начинают появляться мужские черты (Belote, Baker, 1987). Несмотря на то что за последние полтора десятилетия наблюдается бурный рост наших знаний относительно детерминации пола у дрозофилы, приведенную выше модель нельзя считать полной. Механизмы, посредством которых прочитывается отношение X:A, осуществляется сплайсинг продукта гена *doublesex* и развиваются половые фенотипы различных клеток, до сих пор неизвестны. Используя результат секвенирования этих генов и выделения их продуктов, мы можем лучше понять, каким образом определяется пол у дрозофилы.

Гермафродитизм

Нематода *Caenorhabditis elegans* обычно представлена двумя типами особей – гермафродитами и самцами, причем гермафродиты[1], т.е. особи, имеющие и семенники, и яичники, преобладают по численности. У личинок образуются спермии, которые хранятся в течение всего времени развития организма (рис. 21.17). В яичнике взрослой особи продуцируются яйца, оплодотворение которых происходит по ходу их миграции в матку. (Гермафродиты *C. elegans* не копулируют сами с собой, как это происходит у некоторых других гермафродитных организмов.) Самооплодотворение почти всегда приводит к появлению нового поколения гермафродитов; лишь 0,2% потомства оказываются самцами. Эти самцы, однако, способны оплодотворять гермафродитов и, поскольку их сперма имеет конкурентное преимущество по сравнению с эндогенной спермой гермафродитов, соотношение полов у червей, полученных в результате такого спаривания, оказывается примерно следующим: 50% гермафродитов и 50% самцов (Hodgkin, 1985).

У *C. elegans* гермафродиты имеют генотип XX, а самцы – X0. Как и у дрозофилы, пол определяется соотношением X-хромосом и аутосом. У близкородственных видов нематод обнаружены самки XX, что свидетельствует о происхождении гермафродитов от самок. Соматические признаки самок и гермафродитов идентичны, единственное различие заключается в том, что гермафродиты на ранних стадиях онтогенеза вырабатывают спермии, а затем переключаются на продукцию яиц. У *C. elegans* даже обнаружена доминантная мутация ($tra\text{-}1^{D}$), при которой происходит трансформация особей XX или X0 в фертильных самок. В колониях с таким

[1] Термин «гермафродит» происходит от имени сына Гермеса (Меркурия) и Афродиты (Венеры). Унаследовав красоту обоих родителей, он возбудил к себе любовь нимфы Салмакийского источника. Во время купания Гермафродита в источнике нимфа обняла его, моля богов соединить их навеки. Желание ее было исполнено буквально.

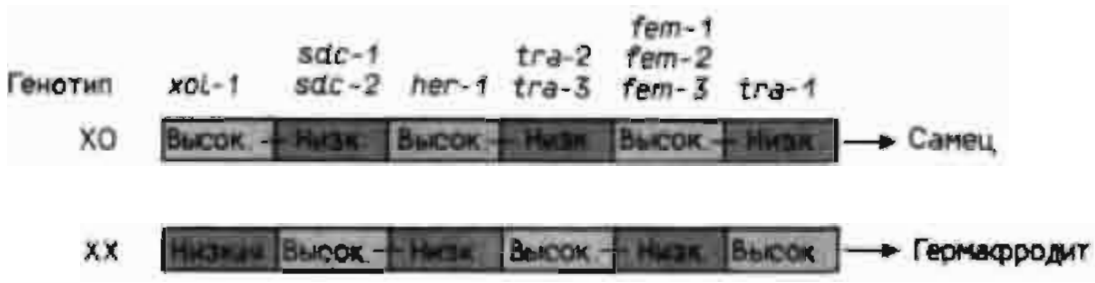


Рис. 21.18. Схематическая модель соматической детерминации пола у *C. elegans*. Полагают, что ген *sdc-1* участвует в прочтении отношения X:A. Он контролирует компенсацию дозы X-хромосомы, а также подавляет ген *her-1*, если отношение равно 1. Обозначение «высокая/низкая» отражает функциональную активность гена. Активность генов *sdc* контролирует гермафродитный тип и детерминации пола, и компенсации дозы. Активность гена *xol-1* контролирует мужской (X0) тип этих процессов. (По Hodgkin, 1985; Miller et al., 1988.)

аллелем возможно существование и функционирование трех полов (Hodgkin, 1980).

Как и у дрозофилы, детерминация пола у *C. elegans* зависит от нескольких аутосомных генов, которые прочитывают соотношение X:A и отвечают за него. Некоторые из этих генов имеют существенное значение для развития по пути гермафродитизма (гены *tra*), тогда как другие необходимы для экспрессии мужского фенотипа (гены *her*). Особи XX, гомозиготные по мутантным генам *tra*, будут трансформироваться в самцов, а мутантные аллели *her* и *fem* превратят самцов в гермафродитов. Путем создания генотипов, несущих различные комбинации этих мутаций, Ходжкину (Hodgkin, 1980) удалось сконструировать модель этого пути развития (рис. 21.18). Он обнаружил, например, что все мутации *tra* подавляют мутацию *her-1*; это указывает на более раннюю реализацию функции гена *her-1* в развитии.

Перечисленные альтернативные пути развития определяются геном *tra-1*. Если активен аллель дикого типа, то особь становится гермафродитом. Если аллель дикого типа не функционирует, то развивается особь мужского пола. Работу этого единственного гена-переключателя регулируют, по-видимому, другие гены. Первый из известных на этом пути – ген *xol-1* (X0-lethal); этот ген может отклонить развитие от пути, ведущего к гермафродитизму, вследствие чего образуется самец. Вероятно, это происходит в результате репрессии генов *sdc*, активность которых необходима для включения гена *tra-1* и развития гермафродитного организма (Miller et al., 1988). Гены *sdc-1* и *sdc-2* можно считать аналогами гена *Sxl* дрозофилы: они связаны с X-хромосомой и влияют как на детерминацию пола, так и на компенсацию дозы X-хромосомы. Полагают (Villeneuve, Meyer, 1987; Nusbaum, Meyer, 1989), что продукты гена *sdc* репрессируют активность гена *her-1* у животных с генотипом XX. Если активность *her-1* высока, то активность *tra-2* и *tra-3* низкая. Возможно, что такая комбинация активностей позволяет экспрессироваться генам *fem*, выключающим *tra-1*. При низких уровнях продукта *tra-1* соматические клетки *C. elegans* становятся мужскими. И напротив, при низкой активности *her-1* активность *tra-1* высока. Это ведет к развитию гермафродитизма.

Одна из наиболее интересных проблем, связанных с нематодой *C. elegans*, – развитие у нее гермафродитизма. Каким образом такое состояние возникло у организма, по всей вероятности обладающего мужской/женской половой системой? Какие изменения на уровне генов привели к нему и можно ли объяснить это на ином, не генетическом уровне. Недавно были идентифицированы определяющие пол гены близкородственного вида *C. ramanei* (у которого имеются и мужские, и женские особи), поэтому можно надеяться на близкое решение этой проблемы.

Если у червей и насекомых гермафродитизм – довольно обычное явление, то у позвоночных он встречается очень редко. Гермафродитизм у птиц и млекопитающих рассматривают как патологическое состояние, приводящее к бесплодию. Наиболее обычные гермафродитные позвоночные – рыбы, у которых наблюдается несколько видов гермафродитизма (Yamamoto, 1969). Некоторые рыбы являются **гонохористическими**, т. е. их пол – мужской или женский – детерминирован хромосомами. Гермафродитные виды рыб можно разделить на три группы. К первой относятся синхронные гермафродиты, у которых овариальные и тестикулярные ткани существуют одновременно, продуцируя как спермии, так и яйца. Один из таких видов – *Serranus scriba*. В природе и в условиях аквариума эта рыбка образует пары. Как только одна из рыб вымечет яйца, другая их оплодотворяет. Затем они меняются ролями и та из рыб, что была самцом, выметывает яйца с тем, чтобы они были оплодотворены спермой партнера (Clark, 1959).

У других гермафродитных видов происходит генетически запрограммированная смена пола по ходу развития. В этих случаях гонады характеризуются диморфизмом, т. е. состоят из женского и мужского отделов. На определенном этапе жизненного цикла может доминировать либо тот, либо



Рис. 21.19. Изменения гонад у гермафродитной рыбы *Sparus auratus*. *А*. Срез через гонаду во время мужской фазы развития. *Б*. Переходная фаза. *В*. Конечная, женская фаза в развитии гонады. (Фотографии с любезного разрешения семьи T. Yamamoto.)

другой. У **протогинетических** («прежде самка») гермафродитов животное начинает свой онтогенез в качестве самки, но позже становится самцом. Обратная ситуация наблюдается в случае **протандрических** («прежде самец») видов. Рис. 21.19 иллюстрирует изменения гонад у протандрической рыбы *Sparus auratus*. Сначала у нее доминирует ткань семенника, но затем после переходного периода, когда можно различить и мужскую, и женскую ткани, начинает преобладать ткань яичника.

Дополнительные сведения и гипотезы

Почему существуют самцы?

На этот вопрос ответить не так просто. Гермафродиты обладают рядом преимуществ, имеющих ценность в глазах популяционных биологов. Во-первых, у них почти все особи популяции способны выводить молодь. (Самцы представляются популяционным биологам некой экстравагантностью.) Во-вторых, одна особь способна заселить новый ареал. Единственная нематода или тля может очень быстро дать начало целой популяции. В-третьих, гермафродитный организм не затрачивает энергии на поиски полового партнера и спаривание (Maynard Smith, 1979).

Тогда чем же объяснить существование самцов? Полагают, что самцы необходимы для обеспечения новых комбинаций генов. Без них генофонд вида был бы крайне ограниченным. Ван Вален (Van Valen, 1973) считает, что виды не могут оставаться стабильными. Если они не будут изменяться, то они вымрут. Это является логическим следствием эволюции хищников и паразитов данного вида, которые постоянно совершенствуются в целях более успешного использования этого вида в качестве пищи; в отсутствие сопряженной эволюции вида-жертвы ему грозит полное уничтожение хищниками. Сформулированное правило носит название **гипотезы Красной королевы** (по имени персонажа из «Алисы в Зазеркалье», утверждавшей, что нужно бежать изо всех сил, чтобы остаться на том же самом месте). Гермафродитные виды обычно встречаются в местах обитания с незначительным числом хищников (Glesener, Tilman, 1978), что свидетельствует об их ограниченных взаимодействиях с другими организмами. Вероятно, новые комбинации генов, возникающие в результате полового размножения, в сочетании с непредсказуемостью изменений условий окружающей среды обеспечивают преимущество недостатков двуполой репродукции над эффективностью гермафродитизма (Maynard Smith, 1979; Weinshall, 1986).

Детерминация пола, зависящая от условий обитания

Зависящая от температуры детерминация пола у рептилий

Если пол большинства змей и большинства ящериц определяется половыми хромосомами при оплодотворении, то пол большинства черепах и всех видов крокодилов определяют условия среды, в которых находился развивающийся зародыш после оплодотворения. У этих рептилий решающим фактором детерминации пола служит температура в определенный период развития яйца (Bull, 1980), поэтому незначительное изменение температуры может драматически сказаться на соотношении полов. Обычно из яиц, инкубируемых при низких температурах (22–27 °С), вылупляются особи какого-то одного пола, а из яиц, инкубируемых при более высоких температурах (30 °С и выше),– особи другого пола. Лишь небольшой интервал температур позволяет вылупляться из одной и той же кладки яиц и самцам, и самкам. На рис. 21.20 представлено резкое изменение соотношения полов у некоторых черепах под действием температуры. Если яйца инкубировались при температуре ниже 28 °С, то все вылупившиеся из них черепахи оказывались самцами. При температуре инкубации выше 32 °С из каждого яйца вылуплялась самка. Таким образом, из каждой кладки яиц развиваются особи одного и того же пола. Существуют и различные отклонения от этой схемы. Так, из яиц каймановой черепахи вылупляются самки и при низких (ниже или равной 20 °С), и при высоких (выше или равной 30 °С) температурах. В промежутке между этими экстремальными температурами среди вылупляющихся особей доминируют самцы.

Период развития, в течение которого происходит детерминация пола, можно установить экспериментально путем инкубации яиц в течение некоторого времени при температуре, дающей самцов, с последующим переносом в инкубатор, установленный на температуру, дающую самок. Оказалось, что у географической и каймановой черепах этот температурный эффект приурочен к средней трети периода эмбрионального развития. Фергюсон и Джоанен (Ferguson, Joanen, 1982), изучавшие детерминацию пола у миссисипского аллигатора в полевых условиях и в лаборатории, пришли к заключению, что пол этого животного определяется между 7- и 21-ми сутками инкубации. Яйца, инкубируемые при 30 °С и ниже, дают самок, а при 34 °С и выше – самцов. Кроме того, в гнездах, устроенных на береговом валу (34 °С), развиваются самцы, а в гнездах, устроенных во влажных маршах (30 °С), выводятся самки. Таким образом, пол многих видов черепах и аллигаторов определяется температурой среды, в которой развиваются яйца.

Фергюсон и Джоанен (Ferguson, Joanen, 1982) предположили, что этот способ зависимого от температуры определения пола могла использовать еще одна близкородственная группа рептилий – динозавры. Если это так, и пол динозавров определялся температурой (с незначительно различающимися пороговыми значениями для каждого из полов), то слабое изменение температуры могло привести к тому, что из яиц вылуплялись либо только самцы, либо только самки. Эта гипотеза предлагает еще одно объяснение внезапного и избирательного исчезновения данной группы рептилий.

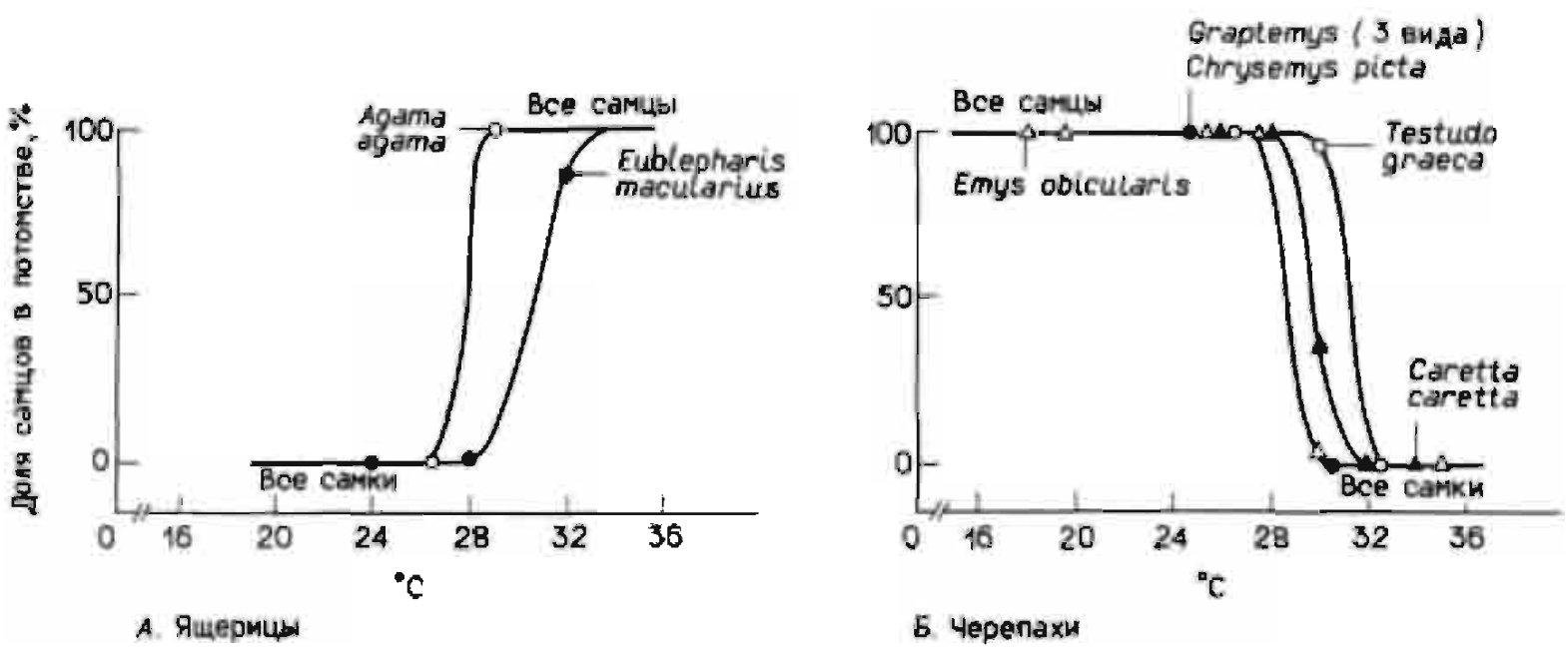


Рис. 21.20. Связь между соотношением полов и температурой инкубации у рептилий. *А*. Два вида ящериц, у которых повышенная температура приводит к развитию мужского потомства. *Б*. Семь видов черепах, у которых повышенная температура приводит к развитию женского потомства. (По Bull, 1980.)

Детерминация пола, зависящая от местоположения животного у *Bonellia vividis* и *Crepidula fornicata*

Пол эхиуриды *Bonellia* зависит от того, в каком месте осядет личинка. Самка *Bonellia* – морское животное, обитающее на каменистом грунте. Длина этого животного достигает 10 см (рис. 21.21), однако имеющийся у него хоботок может вытягиваться на расстояние более 1 метра. Этот хоботок выполняет две функции. Во-первых, он собирает пищу с поверхности скал и направляет ее в пищеварительный тракт самки. Во-вторых, если на хоботок осядет личинка, то она попадет в рот самки, затем мигрирует в матку, где дифференцируется в самца размерами 1–3 мм. Итак, если личинка осядет на поверхность скалы, она становится самкой, но та же самая личинка, осевшая на хоботок самки, станет самцом. Самец проводит в теле самки остаток жизни, оплодотворяя яйца.

Бальтцер (Baltzer, 1914) показал, что культивирование личинок *Bonellia* в отсутствие самок дает почти 90% самок. Но если эти личинки культивируются в присутствии взрослых самок или их изолированных хоботков, то 70% личинок прикрепляются к хоботку и у них развиваются мужские половые структуры. Эти данные получили подтверждение в семидесятые годы (Leutert, 1974) (рис. 21.22).

Вещество (или вещества), вызывающее маскулинизацию личинок, можно выделить из хоботков взрослых самок. Когда личинок культивируют в нормальной морской воде в отсутствие взрослых самок, они становятся самками. Добавление же в морскую воду экстракта ткани хоботка приводит к тому, что большинство личинок станут либо самцами, либо промежуточными формами – ни

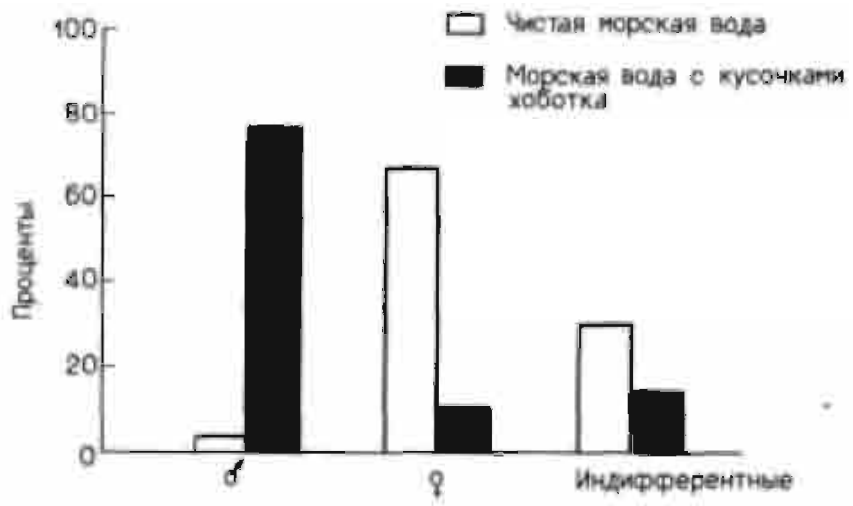


Рис. 21.22. Анализ дифференцировки *Bonellia* in vitro. Личинок *Bonellia* помещали в нормальную морскую воду и в морскую воду с кусочками женского хоботка. Большинство животных, культивированных в присутствии кусочков хоботка, стали самцами, тогда как в норме они стали бы самками. (По Leutert, 1974.)

полный самец, ни полная самка (Nowinski, 1934; Agius, 1979). Работа по очистке соединения(й), служащего аттрактантом для оседания личинок на хоботок и вызывающего маскулинизацию, еще не завершена.

Другими примерами влияния местоположения организма на определение пола служит моллюск *Crepidula fornicata*. Эти улитки заползают друг на друга, образуя пирамиду (рис. 21.23). Молодые особи всегда бывают мужскими. На более поздних стадиях развития происходит дегенерация мужской репродуктивной системы и наступает период лабильности. Следующая стадия может быть либо мужской, либо женской, что зависит от положения моллюска в пирамиде. Если он прикреплен к самке, то становится самцом. Вместе с тем присутствие многочисленных самцов приводит к тому, что

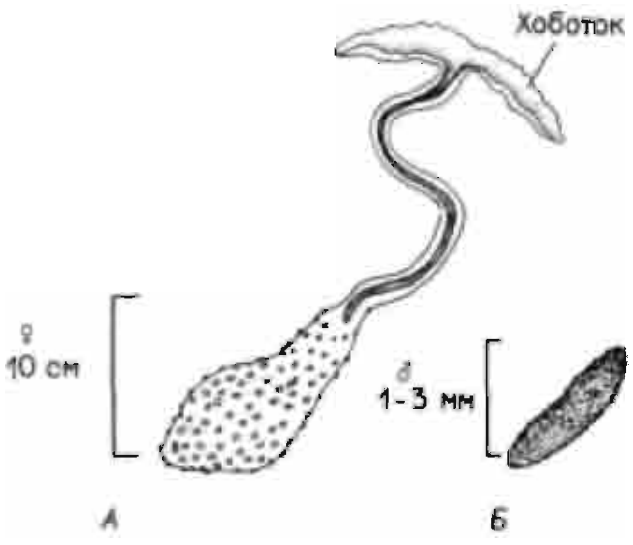


Рис. 21.21. Крайний половой диморфизм у *Bonellia vividis*. *А*. Самка длиной около 10 см с хоботком, который способен вытягиваться до одного метра. *Б*. Паразитический самец (сильно увеличен по сравнению с самкой), длина которого составляет 1–3 мм. (По Barnes, 1968.)

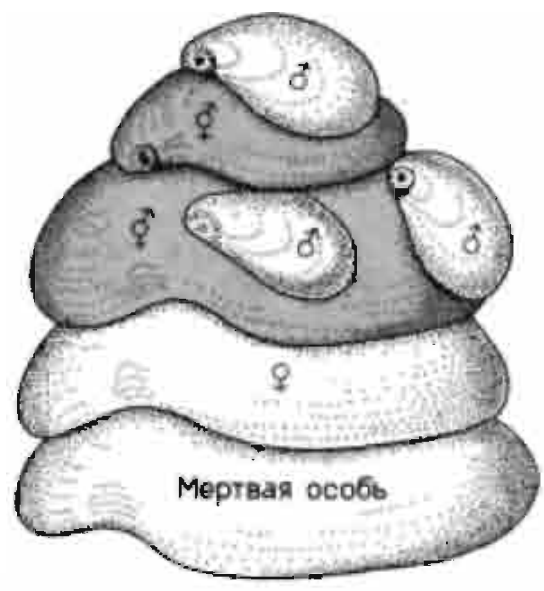


Рис. 21.23. Кластер моллюсков *Crepidula*. Две особи превращаются из самца в самку. После превращения в самок они будут оплодотворены находящимися сверху самцами. (По Coe, 1936.)

некоторые из них превращаются в самок. Однако если особь стала женской, то она никогда не трансформируется в мужскую (Coe, 1936).

Природа представляет нам целую серию вариантов, свидетельствующих о ее мастерстве. У одних видов пол определяется только хромосомами, тогда как у других устанавливается под действием окружающих условий. В пределах, ограниченных этими обширными категориями, существуют свои многочисленные варианты. Полный перечень известных механизмов детерминации пола занял бы отдельный весьма объемистый (и очень интересный) том. Но определяющий пол механизм функционирует как часть соматических физиологических механизмов, обусловливающих поддержание и размножение половых клеток. Гонады погибают со смертью тела, а находящиеся в них половые клетки способны дать начало новой жизни. К рассмотрению половых клеток мы и перейдем в следующей главе.

ЛИТЕРАТУРА

Agius L. (1979). Larval settlement in the echiuran worm *Bonellia viridis*: Settlement on both the adult proboscis and body trunk, Mar. Biol., **53**, 125–129.

Arnold A. P. (1980). Sexual differences in the brain, Am. Sci., **68**, 165–173.

Arnold A. P., Nottebohm F., Pfaff D. W. (1976). Hormone concentrating cells in vocal control and other brain regions of the zebra finch (*Poephila guttata*), J. Comp. Neurol., **165**, 487–512.

Baker B., Nagoshi R. N., Burtis K. C. (1987). Molecular genetic aspects of sex determination in *Drosophila*, BioEssays, **6**, 66–70.

Baker B. S., Ridge K. A. (1980). Sex and the single cell. I. On the action of major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*, Genetics, **94**, 383–423.

Baltzer F. (1914). Die Bestimmung und der Dimorphismus des Geschlechtes bei *Bonellia*, Sber. Phys.-Med. Ges, Mürzb., **43**, 1–4.

Barfield R. J., Chen J. J. (1977). Activation of estrous behavior in ovariectomized rats by intracerebral implants of estradiol benzoate, Endocrinology, **101**, 1716–1725.

Barnes R. D. (1968). Invertebrate Zoology, Saunders, Philadelphia.

Bell S. E. (1986). A new model of medical technology development: A case study of DES, Sociol. Health Care, **4**, 1–32.

Belote J. M., Baker B. S. (1987). Sexual behavior: Its genetic control during development and adulthood in *Drosophila melanogaster*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 8026–8030.

Belote J. M., McKeown M. B., Andrew D. J., Scott T. N., Wolfner M. F., Baker B. S. (1985a). Control of sexual differentiation in *Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **50**, 605–614.

Belote J. M., Handler A. M., Wolfner M. F., Livak K. L., Baker B. S. (1985b). Sex-specific regulation of yolk protein gene expression in *Drosophila*, Cell, **40**, 339–348.

Bleier R. (1984). Science and Gender, Pergamon Press, New York, pp. 80–114.

Breedlove S. M., Arnold A. P. (1980). Hormone accumulation in a sexually dimorphic motor nucleus of the rat spinal cord, Science, **210**, 565–566.

Bull J. J. (1980). Sex determination in reptiles, Q. Rev. Biol., **55**, 3–21.

Burgoyne P. S., Levy E. R., McLaren A. (1986). Spermatogenic failure in male mice lacking H-Y antigen, Nature, **312**, 552–555.

Cate R. L., and 18 others. (1986a). Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells, Cell, **45**, 685–698.

Cate R. L., Ninfa E. G., Pratt D. J., MacLaughlin D. T., Donahoe P. K. (1986b). Development of Müllerian inhibitory substanse as an anti-cancer drug, Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **51**, 641–647.

Clark E. (1959). Functional hermaphroditism and self-fertilization in a serranid fish, Science, **129**, 215–216.

Cline T. W. (1983). The interaction between *daughterless* and *Sex-lethal* in triploids: A novel sex-transforming maternal effect linking sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*, Dev. Biol., **95**, 260–274.

Cline T. W. (1986). A female-specific lethal lesion in an x-linked positive regulator of the *Drosophila* sex determination gene, *Sex-lethal*, Genetics, **113**, 641–663.

Coe W. R. (1936). Sexual phases in *Crepidula*, J. Exp. Zool., **72**, 455–477.

Cronmiller C., Cline T. W. (1987). The *Drosophila* sex determination gene *daughterless* has different functions in the germ line versus the soma, Cell, **48**, 479–487.

Doughty D., Booth J. E., McDonald P. G., Parrott R. F. (1975). Effects of oestradiol-17β, oestradiol benzoate, and synthetic oestrogen RU2858 on sexual differentiation in the neonatal rat, J. Endocrinol., **67**, 419–424.

Eicher E. M., Phillips S. J., Washburn L. L. (1983). The use of molecular probes and chromosomal rearrangements to partition the mouse Y chromosome into functional regions. In: A. Messer and I. H. Porter (eds.), Recombinant DNA and Medical Genetics, Academic, New York, pp. 57–71.

Eicher E. M., Washburn L. L. (1983). Inherited sex reversal in mice: Identification of a new primary sex-determining gene, J. Exp. Zool., **228**, 297–304.

Eicher E. M., Washburn L. L. (1986). Genetic control of primary sex determination in mice, Annu. Rev. Genet., **20**, 327–360.

Eicher E. M., Washburn L. L., Whitney J. B. III, Morrow K. E. (1982). *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BI/6J murine genome causes sex reversal, Science, **217**, 535–537.

Fausto-Sterling A. (1985). Myths of Gender, Basic Books, New York.

Ferguson M. W. J., Joanen T. (1982). Temperature of egg incubation determines sex in *Alligator mississippiensis*, Nature, **296**, 850–853.

Fuller A. F., Budzik G. P., Krane I. M., Donahoe P. K. (1984). Müllerian inhibitory substance inhibition of a human endometrial carcinoma cell line xenografted in nude mice, Gynec. Oncol., **17**, 124–132.

Geddes P., Thomson J. A. (1890). The evolution of Sex, Walter Scott, London.

Glesener R. R., Tilman D. (1978). Sexuality and the components of environmental uncertainty: Clues from geographic parthenogenesis in terrestrial animals, Am. Nat., **112**, 659–673.

Hodgkin J. (1980). More sex-determination mutants of *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, **96**, 649–664.

Hodgkin J. (1985). Males, hermaphrodites, and females: Sex determination in *Caenorhabditis elegans*, Trends Genet., **1**, 85–88.

Imperato-McGinley J., Guerrero L., Gautier T., Peterson R. E. (1974). Steroid 5α reductase deficiency in man: An inherited form of male pseudohermaphroditism, Science, **186**, 1213–1215.

Jacklin D. (1981). Methodological issues in the study of sex-related differences, Dev. Rev., **1**, 266–273.

Josso N., Picard J.-Y., Tran D. (1977). The anti-Müllerian hormone, Recent Prog. Horm. Res., **33**, 117–167.

Jost A. (1953). Problems of fetal endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones, Recent Prog. Horm. Res., **8**, 379–418.
Kolata G. (1980). Math and sex: Are girls born with less ability? Science, **210**, 1234–1235.
Konishi M., Akutagawa E. (1985). Neuronal growth, atrophy, and death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch brain, Nature, **315**, 145–147.
Kurz E.M., Sengelaub D.R., Arnold A.P. (1986). Androgens regulate the dendritic length of mammalian motoneurons in adulthood, Science, **232**, 395–397.
Langman J. (1981). Medical Embryology, 4th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
Langman J., Wilson D.B. (1982). Embryology and congenital malformations of the female genital tract. In: A. Blaustein (ed.), Pathology of the Female Genetal Tract, 2nd Ed., Springer-Verlag, New York, pp. 1–12.
Leutert T.R. (1974). Zur Geschlechtsbestimmung und Gametogenese von *Bonellia viridis* Rolando, J. Embryol Exp. Morphol., **32**, 169–193.
Lillie F.R. (1917). The free-martin: A study in the action of sex hormones in the fetal life of cattle, J. Exp. Zool., **23**, 371–452.
Maynard Smith J. (1979). The Evolution of Sex, Cambridge University Press, London.
McClung C.E. (1902). The accessory chromosome–sex determinat? Biol. Bull., **3**, 72–77.
McEwen B.S. (1981). Neural gonadal steroid actions, Science, **211**, 1303–1311.
McEwen B.S., Leiberburg I., Chaptal C., Krey L.C. (1977). Aromatization: Important for sexual differentiation of the neonatal rat brain, Horm. Behav., **9**, 249–263.
McKeown M., Belote J.M., Baker B.S. (1987). A molecular analysis of *transformer*, a gene in *Drosophila melanogaster* that controls female sexual differentiation, Cell, **48**, 489–499.
McLaren A., Simpson E., Tomonari K., Chandler P., Hogg H. (1984). Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen, Nature, **312**, 552–555.
Meyer W.J., Migeon B.R., Migeon C.J. (1975). Locus on human X chromosome for dihydrotestosterone receptor and androgen insensitivity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 1469–1472.
Morgan T.H. (1919). The physical Basis of Heredity, Lippincott, Philadelphia.
Nabekura J., Oomura Y., Minami T., Mizuno Y., Fukuda A. (1986). Mechanism of the rapid effect of 17β-estradiol on medial amygdala neurons, Science, **233**, 226–228.
Nordeen E.J., Nordeen K.W., Sengelaub D.R., Arnold A.P. (1985). Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus, Science, **229**, 671–673.
Nottebohm F. (1980). Testosterone triggers growth of brain vocal control nuclei in adult female canaries, Brain Res., **189**, 429–436.
Nottebohm F. (1981). A brain for all seasons: Cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain, Science, **214**, 1368–1370.
Nowinski W. (1934). Die vermännlichende Wirkung fraktionierter Darmextrakte des Weibchens auf die Larven der *Bonellia viridis*, Pubbl. Staz. Zool. Napoli, **14**, 110–145.
Page D.C. (1985). Sex-reversal: Deletion mapping of the male-determining function of the human Y chromosome, Cold Spring Harbor Symp. Quant, Biol., **51**, 229–235.
Page D.C., de la Chappelle A., Weissenbach J. (1985). Chromosome Y-specific DNA in related human XX males, Nature, **315**, 224–226.
Page D.C., and 7 others. (1987). The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein, Cell, **51**, 1091–1104.
Pfaff D.W., McEwen B.S. (1983). The actions of estrogens and progestins on nerve cells, Sciense, **219**, 808–814.
Pritchard C.A., Goodfellow P.J., Goodfellow P.N. (1987). Mapping the limits of the human pseudoautosomal region and a candidate sequence for the male-determining gene, Nature, **328**, 273–275.
Pröve E. (1978). Coursthip and testosterone in male zebra finches, Z. Tierpsychol., **48**, 47–67.
Reddy V.R., Naftolin F., Ryan K.J. (1974). Conversion of androstenedione to estrone by neural tissues from fetal and neonatal rats, Endocrinology, **94**, 117–121.
Robboy S.J., Young R.H., Herbst A.L. (1982). Female genital tract changes related to prenatal diethylstilbesterol exposure. In: A. Blaustein (ed.), Pathology of the Female Genetal Tract, 2nd Ed., Springer-Verlag, New York, pp. 99–118.
Rubin B.S., Barfield R.J. (1980). Priming of estrus responsiveness by implants of 17β-estradiol in the ventromedial hypothalamic nuclei of female rats, Endocrinology, **106**, 504–509.
Siiteri P.K., Wilson J.D. (1974). Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo, J. Clin. Endocrinol. Metab., **38**, 113–125.
Simpson E., Chandler P., Goulmy E., Disteche C.M., Ferguson-Smith M.A., Page D. (1987). Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on the human Y chromosome, Nature, **326**, 876–878.
Singh L., Jones K.W. (1982). Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) in caused by a recurrent nonreciprocal crossover involving the X and an aberrant Y chromosome, Cell, **28**, 205–216.
Steinmann-Zwicky M., Nothiger R. (1985). A small region on the X chromosome of *Drosophila* regulates a key gene that controls sex determination and dosage compensation, Cell, **42**, 877–887.
Stevens N.M. (1905). Studies in spermatogenesis with especial reference to the "accessory chromosome", Carnegie Inst. Rep. Washington, 36.
Strickberger M.W. (1968). Genetics, Macmillan, New York, p. 463.
Terasawa E., Sawyer C.H. (1969). Changes in electrical activity in rat hypothalamus related to electrochemical stimulation of adenohypophyseal function, Endocrinology, **85**, 143–149.
Thorpe W.H. (1958). The learning of song patterns by birds with especial reference to the song of the chaffinch, *Fringilla coelebs*, Ibis, **100**, 535–570.
Tiefer L. (1970). Gonadal hormones and mating behavior in adult golden hamster, Horm. Behav., **1**, 189–202.
Tran D., Meusy-Dessolle N., Josso N. (1977). Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells, Nature, **269**, 411–412.
Van Valen L. (1973). A new evolutionary law, Evol. Theor., **1**, 1–30.
Vergnaud C., and 8 others. (1986). A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization, Am. J. Hum. Genet., **38**, 109–124.
Vigier B., Watrin F., Magre S., Tran D., Josso N. (1987). Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro, Development, **100**, 43–55.
Villeneuve A.M., Meyer B.J. (1987). *sdc-1*: A link between sex determination and dosage compensation in *C. elegans*, Cell, **48**, 25–37.
Vreeburg J.T.M., van der Vaart P.D.M., van der Schoot P. (1977). Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibiting neonatal estrogen biosynthesis, J. Endocrinol., **74**, 375–382.
Wachtel S.S., Hall J.L., Müller U., Chaganti R.S.K. (1980). Serum-borne H-Y antigen in the fetal bovine freemartin, Cell, **21**, 917–926.
Washburn L.L., Eicher E.M. (1983). Sex reversal in XY mice

caused by a dominant mutation on chromosome 17, Nature, **303**, 338–340.
Weinshall D. (1986). Why is a two-environment system not rich enough to explain the evolution of sex? Am. Nat., **128**, 736–750.
Wilson E. B. (1905). The chromosomes in relation to the determination of sex in insects, Science, **22**, 500–502.
Yamamoto T.-O. (1969). Sex differentiation. In: W. S. Hoar and D. J. Randall (eds.), Fish Physiology, Vol. 3, Academic, New York, pp. 117–175.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА К 3-МУ ИЗДАНИЮ

Amrein H., Gorman M., Nöthiger R. (1988). The sex-determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein, Cell, **55**, 1025–1035.
Baker B.S. (1989). Sex in flies: the splice of life, Nature, **340**, 521–524.
Bell L. R., Maine E. M., Schedl P., Cline T. W. (1988). *Sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins, Cell, **55**, 1037–1046.
Berta P., Hawkins J. R., Sinclair A. H., Taylor A., Griffiths B. L., Goodfellow P. N., Fellous M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-datermining factor, Nature, **348**, 448–450.
Boggs R. T., Gregor P., Idriss S., Belote J. M., McKeown M. (1987). Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene, Cell, **50**, 739–747.
Burgoyne P. S., Buehr M., Koopman P., Rossant J., McLaren A. (1988). Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX/XY chimaeric mouse testis, Development, **102**, 443–450.
Cline T. W. (1983). The interaction between *daughterless* and *Sex-lethal* in triploids: A novel sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*, Dev, Biol., **95**, 260–274.
Cline T. W. (1986). A female-specific lethal lession in an X-linked positive regulator of the *Drosophila* sex determination gene, *Sex-lethal*, Genetics, **119**, 829–862.
Cline T. W. (1988). Evidense that *sisterless-a* and *sisterless-b* are two of several discrete "numerator elements" of the X/A sex determination signal in *Drosophila* that switch *Sxl* betwen two alternative stable expression states, Genetics, **119**, 829–862.
Cronmiller C., Cline T. W. (1987). The *Drosophila* sex determination gene *daughterless* has different functions in the germ line versus the soma, Cell, **48**, 479–487.
Goralski T. J., Edström J.-E., Baker B. S. (1988). The sex determination locus *transformer-2* of *Drosophila* encodes a polypeptide with similarity to RNA binding proteins, Cell, **56**, 1011–1018.
Gubbay J., and 8 others (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes, Nature, **346**, 245–250.
Jäger R. J., Anvret M., Hall K., Scherer G. (1190). A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene *SRY*, Nature, **348**, 452–454.
Koopman P., Münsterberg A., Capel B., Vivian N., Lovell-Badge A. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation, Nature, **348**, 450–452.
McLaren A. (1988). Sex determination in mammals, Trends Genet., **4**, 153–157.
Miller L. M., Plenefisch J. D., Casson L. P., Meyer B. (1988). *xol-1*: A gene that controls the male mode of both sex determination and X-chromosome dosage compensation in *C. elegans*, Cell, **55**, 167–183.
Nusbaum C., Meyer B. J. (1989). The *Caenorhabditis elegans* gene *sdc-2* controls sex determination and dosage compensation in XX animals, Genetics, **122**, 579–593.
Salz H. K., Cline T. W., Schedl P. (1987). Functional changes associated with structural alterations induced by mobilization of a P element inserted into the *Sex-lethal* gene of *Drosophila*, Genetics, **117**, 221–231.
Salz H. K., Maine E. M., Keyes L. N., Samuels M. E., Cline T. W., Schedl P. (1989). The *Drosophila* female-specific sex-determination gene, *Sex-lethal*, has stage-, tissue-, and sex-specific RNAs suggesting multiple modes of regulation, Genes Dev., **3**, 708–719.
Sánchez L., Nothiger R. (1983). Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: Production of male clones in XX-female, EMBO J., **1**, 485–491.
Sinclair A. H. and 9 others (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif, Nature, **346**, 240–244.
Villeneuve A. M., Meyer B. J. (1987). *sdc-1*: A link between sex determination and dosage compensation in *C. elegans*, Cell, **48**, 25–37.
Wolfner M. F. (1988). Sex-specific gene expression in somatic tissues of *Drosophila melanogaster*, Trends Genet., **4**, 333–337.

Глава 22

Сага о зародышевом пути

И поиски кончатся там,
Где начали их; оглянемся,
Как будто здесь мы впервые.

Т. С. ЭЛИОТ (1942)

Введение

Анализ развития животных мы начали с изучения процессов оплодотворения; заканчивая этот анализ, мы рассмотрим гаметогенез – совокупность процессов, приводящих к формированию спермия и яйцеклетки. Половые клетки обеспечивают непрерывность поколений, и прямые митотические предки наших собственных половых клеток когда-то находились в гонадах рептилий, амфибий, рыб и беспозвоночных. У многих животных, таких, как насекомые и позвоночные, наблюдается четкое и раннее обособление линии половых клеток от линии соматических клеток. У большого числа типов животных (и во всем царстве растений) четкого разделения половых и соматических клеток установить не удается. У таких видов (включающих кишечнополостных, плоских червей и оболочников) соматические клетки легко становятся половыми даже у взрослого организма. Почкование, ведущее к формированию зооидов у многих беспозвоночных,– не что иное, как свидетельство способности соматических клеток давать начало новым особям.

У организмов с достаточно ранним обособлением половых клеток последние возникают не в собственно гонадах. Их предшественники – **первичные половые клетки** (ППК) – мигрируют в развивающиеся гонады. Первый этап гаметогенеза, таким образом, включает заселение первичными половыми клетками полового гребня формирующейся гонады.

Образование половых клеток

Миграция половых клеток у амфибий

У бесхвостых амфибий – лягушек и жаб – половая (зародышевая) плазма отчетливо маркирована гранулами вблизи вегетативного полюса оплодотворенного яйца. Однако эта плазма недолго остается в области вегетативного полюса. Во время дробления она перемещается по богатой желтком цитоплазме вверх, и содержащие РНК гранулы оказываются связанными с клетками, выстилающими дно бластоцеля (рис. 22.1) (Bounoure, 1934). Как уже упоминалось в гл. 7, Блэклер проследил миграцию этих клеток в гонаду, пересаживая блоки клеток из нейрул *Xenopus laevis* одной линии в нейрулы другой. Оказалось, что первичные половые клетки *Xe-*

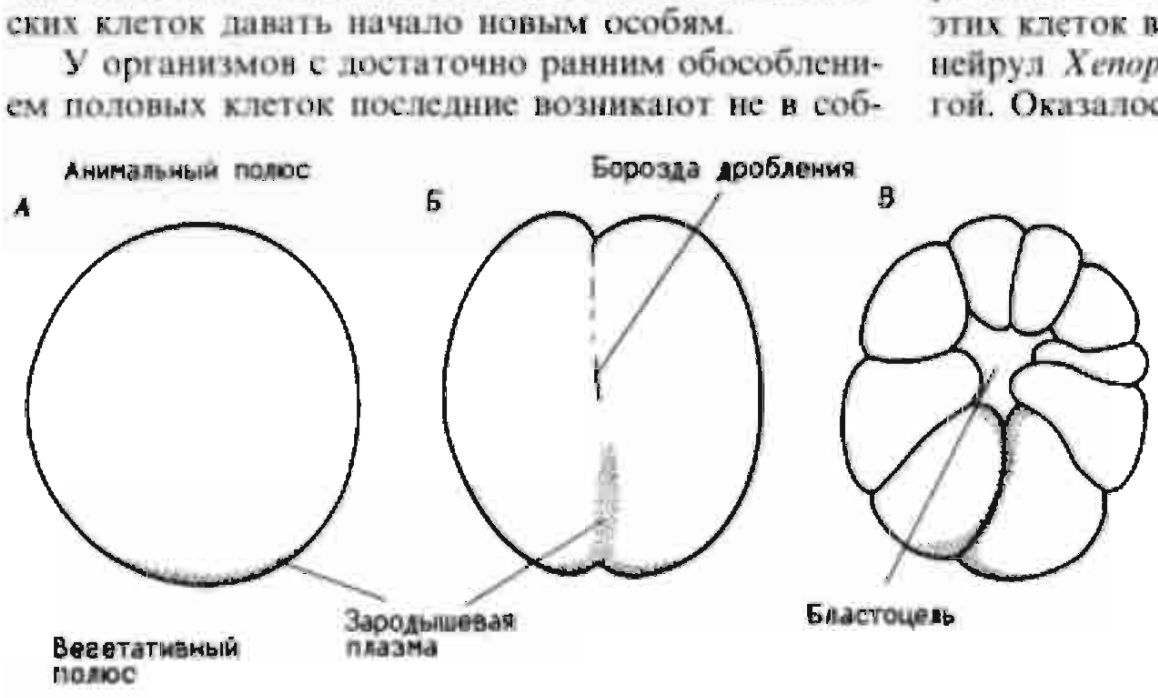


Рис. 22.1. Изменения в расположении зародышевой (половой) плазмы у раннего зародыша лягушки. Локализованная первоначально вблизи вегетативного полюса недробящегося яйца (*А*), она перемещается вдоль борозд дробления (*Б*), пока не окажется на дне бластоцеля (*В*). (По Bounoure, 1934.)



Рис. 22.2. Миграция первичных половых клеток у лягушки. На фазово-контрастной микрофотографии среза стенки тела и дорсального мезентерия зародыша *Xenopus* видны две крупные первичные половые клетки (указаны стрелками), мигрирующие вдоль дорсального мезентерия. (Из Heasman et al., 1977, фотография с любезного разрешения этих авторов.)

nopus движутся из энтодермы кишки в дорсальный мезентерий, соединяющий кишку с областью формирования мезодермальных органов. Они мигрируют по этой ткани, пока не достигнут развивающейся гонады (рис. 22.2). ППК *Xenopus* передвигаются, выпуская единственную филоподию, в которую устремляется поток содержащей желток цитоплазмы. Весьма вероятно, что в этой миграции важную роль играет контактное ориентирование, так как клетки, по которым перемещаются ППК, ориентированы в направлении их миграции (Wylie et al., 1979). Кроме того, адгезию и миграцию ППК можно ингибировать, обработав мезентерий антителами против фибронектина *Xenopus* (Heasman et al., 1981). Таким образом, можно полагать, что у этих лягушек путь, по которому мигрируют половые клетки, выстлан внеклеточным матриксом, содержащим фибронектин; волокна этого матрикса ориентированы определенным образом, направляя клеточную миграцию. По ее окончании волокна утрачивают свою полярность [1].

[1] Это справедливо не для всех бесхвостых амфибий. Так, у лягушки *Rana pipiens* половые клетки следуют по тому же пути, но скорее пассивно переносятся в гонаду, чем достигают ее благодаря своей активной миграции (Subtelny, Penkala, 1984).

В специфической миграции первичных половых клеток важную роль играют и внутриклеточные факторы. Если вегетативную половую плазму яиц лягушки облучить ультрафиолетовым светом (который разрушает РНК и дисульфидные связи белков), то миграция ППК в половой гребень ингибируется или существенно замедляется (Smith, 1966; Züst, Dixon, 1977; Ikenishi, Kotani, 1979).

Первичные половые клетки хвостатых амфибий (саламандр) имеют иное происхождение; его удалось проследить с помощью реципрокных трансплантаций до областей мезодермы, подворачивающихся через вентролатеральные губы бластопора. Помимо этого, яйца саламандр, по-видимому, вообще не содержат особой «зародышевой плазмы». Скорее всего взаимодействия дорсальных энтодермальных клеток с клетками анимального полушария создают условия, необходимые для формирования половых клеток именно в той области, которая подворачивается через вентролатеральные губы (Sutasurya, Nieuwkoop, 1974). Таким образом ППК у саламандр уже оказываются в мезодерме и им не нужно искать пути в гонаду.

Миграция половых клеток у млекопитающих

У млекопитающих первичные половые клетки мигрируют по пути, очень сходному с тем, что наблюдается у бесхвостых амфибий. Наиболее существенный прорыв в изучении путей миграции первичных половых клеток у млекопитающих произошел благодаря работам Бакстера (Baxter, 1952), который продемонстрировал, что ППК млекопитающих в больших количествах содержат щелочную фосфатазу. Реакция на присутствие этого фермента позволила отличать ППК от остальных клеток. Путь миграции ППК млекопитающих представлен на рис. 22.3. ППК мыши впервые можно увидеть в аллантоисе 7,5-суточного зародыша (Chiquoine, 1954; Mintz, 1957). Вскоре после этого они видны в основании аллантоиса и в прилегающем желточном мешке (рис. 22.4). К этому времени они уже разделились на две популяции, которые будут мигрировать либо в правую, либо в левую гонады. После этого ППК перемещаются каудально от желточного мешка через новообразованную заднюю кишку и затем вверх по дорсальному мезентерию в половой гребень (рис. 22.4, *Б*). Бóльшая часть ППК достигает развивающейся гонады к одиннадцатому дню после оплодотворения. В процессе миграции клетки делятся, так что вместо исходной популяции в 10–100 клеток в гонаде к 12-му дню оказывается до 2500–5000 ППК. Как и ППК *Xenopus*, ППК млекопитающих тесно связаны с клетками, по которым они мигрируют. По поверхностям подстилающих клеток ППК млекопитающих передви-

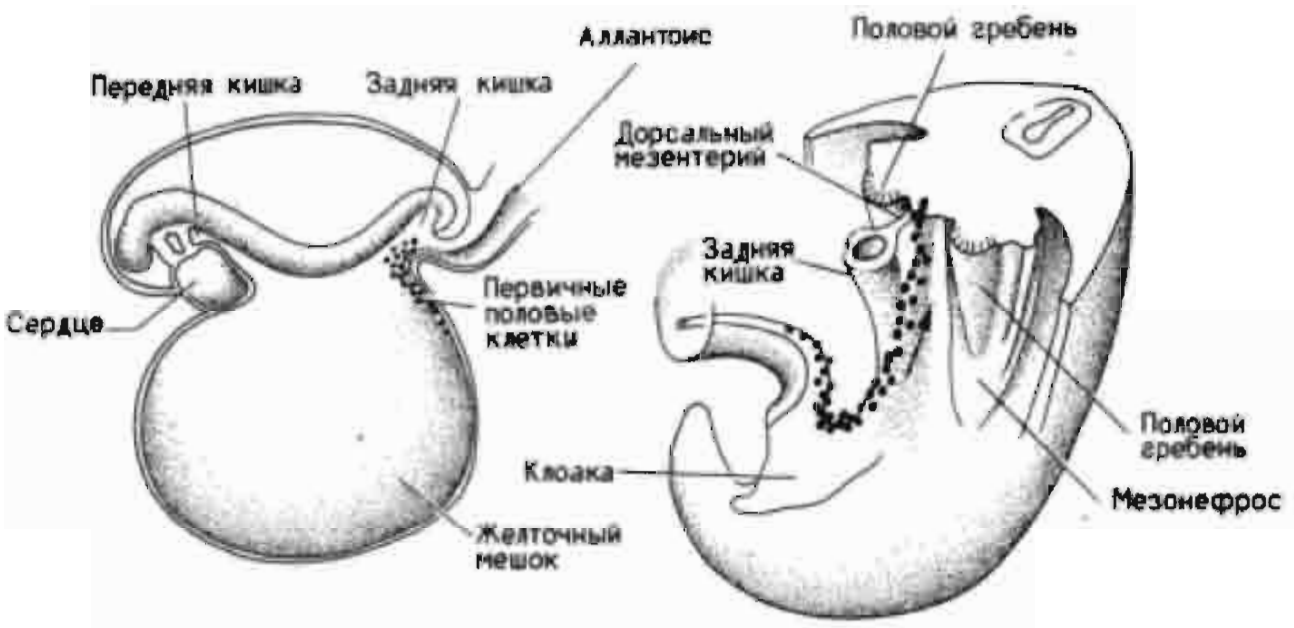


Рис. 22.3. Пути миграции первичных половых клеток у млекопитающих. *А*. Впервые первичные половые клетки обнаруживаются в желточном мешке вблизи места соединения задней кишки и аллантоиса. *Б*. Миграция первичных половых клеток по кишке и затем в дорсальном направлении по дорсальному мезентерию в половой гребень. (По Langman, 1981.)

гаются так же, образуя филоподии. Кроме того, они способны проникать через клеточные монослои и мигрировать по клеточным пластам (Stott, Wylie, 1986).

Миграция первичных половых клеток у птиц и рептилий

У птиц и рептилий ППК происходят из клеток эпибласта, мигрирующих из центральной области area pellucida в серповидную зону энтодермального слоя у передней границы area pellucida (рис. 22.5) (Eyal-Giladi et al., 1981; Ginsburg, Eyal-Giladi, 1987). Эта внезародышевая область названа **герминативным серпом**, и в ней происходит размножение первичных половых клеток. В отличие от ППК амфибий и млекопитающих ППК рептилий и птиц мигрируют главным образом с кровотоком. ППК герминативного серпа проникают в кровеносные сосуды посредством **диапедеза** (рис. 22.6, *А*) – способа движения лимфоцитов и макрофагов, позволяющего клет-

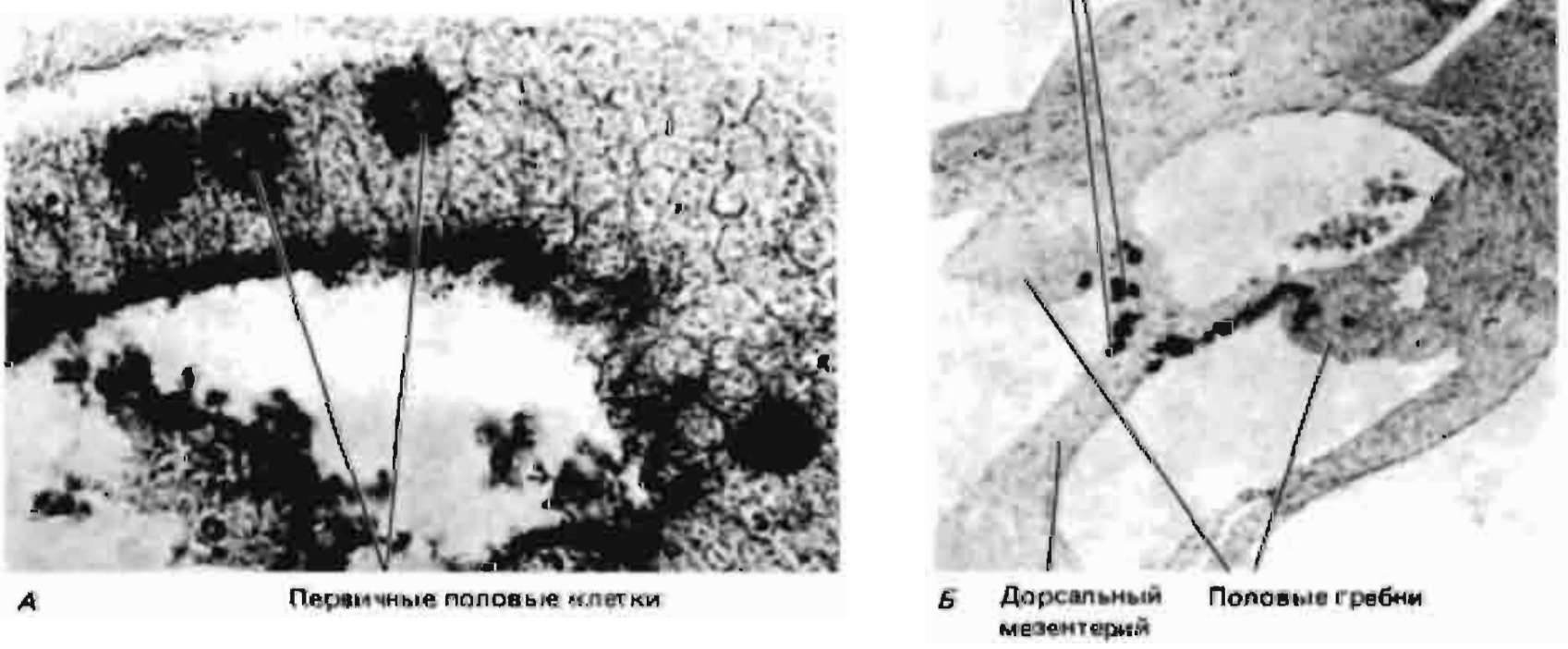


Рис. 22.4. Первичные половые клетки мыши (ППК) на разных стадиях их миграции. *А*. ППК в задней кишке мышиного зародыша (вблизи аллантоиса и желточного мешка). Видны четыре крупных ППК (темные кружки), содержащие большое количество щелочной фосфатазы. *Б*. ППК, окрашенные на щелочную фосфатазу, мигрируют вверх по дорсальному мезентерию и входят в половые гребни. (*А* – из Heath, 1978, *Б* – из Mintz, 1957; фотографии с любезного разрешения этих авторов.)

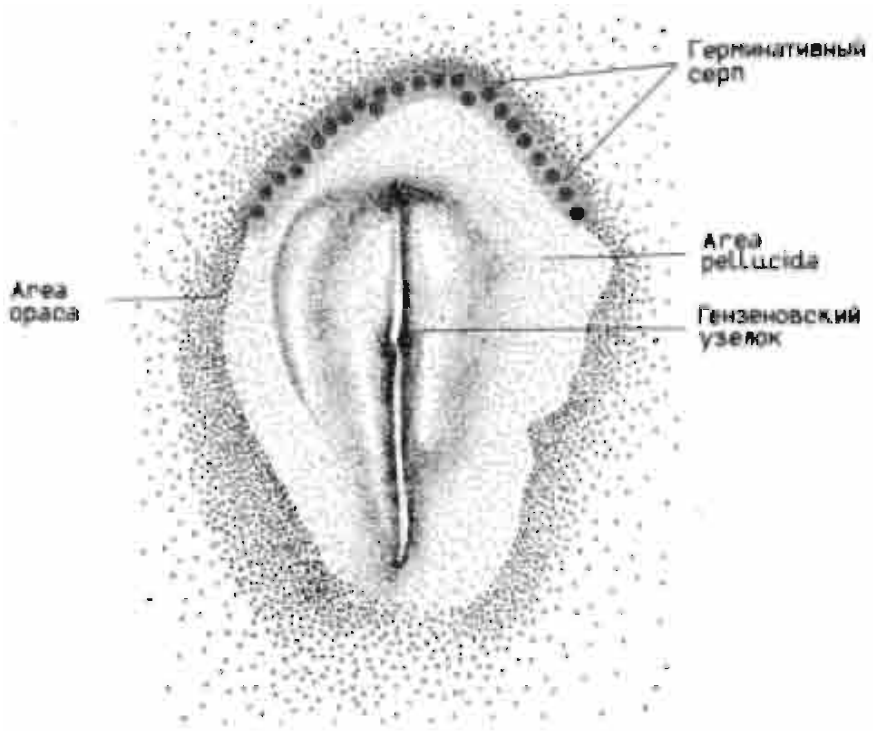


Рис. 22.5. Куриный зародыш на стадии первичной полоски с дорсальной стороны. Видна область, называемая герминативным серпом, где возникают половые клетки. (По Swift, 1914.)

кам проскальзывать внутрь кровеносных сосудов и таким же образом их покидать. Так переносимые с кровью ППК попадают в зародыш (Pasteels, 1953; Dubois, 1969). По достижении развивающейся гонады ППК должны «узнать», что им следует выйти из кровотока (рис. 22.6, *Б*). Если у куриного зародыша удалить герминативный серп и кровоток этого зародыша соединить с кровотоком нормального, то первичные половые клетки нормального зародыша будут мигрировать в обе гонады (Simon, 1960). Неизвестно, чем гонады привлекают ППК. Одно из предположений состоит в том, что развивающаяся гонада выделяет хемотактическое вещество, которое служит аттрактантом для ППК, задерживая их в капиллярах у гонад (Rogulska, 1969). (Известно, что подобные вещества, секретируемые лимфоцитами в местах инфекции, служат для привлечения макрофагов и создают условия для их выхода через стенку капилляров путем диапедеза.) Возможно также, что эндотелиальные клетки капилляров гонады несут на своей поверхности вещество, обусловливающее специфическую адгезию ППК. Используя моноклональные антитела, узнающие различные поверхностные молекулы, Аузрбах и Джозеф (Auerbach, Joseph, 1984) показали, что клеточные поверхности разных капиллярных сетей отличаются друг от друга, в частности эндотелиальные клетки капилляров яичника отличаются от клеток всех остальных капилляров, которые были изучены в этом отношении. Что бы ни представлял собою аттрактант, он не видоспецифичен. Гонада куриного зародыша будет привлекать циркулирующие клетки индейки и даже мыши (Reynaud, 1969; Rogulska et al., 1971).

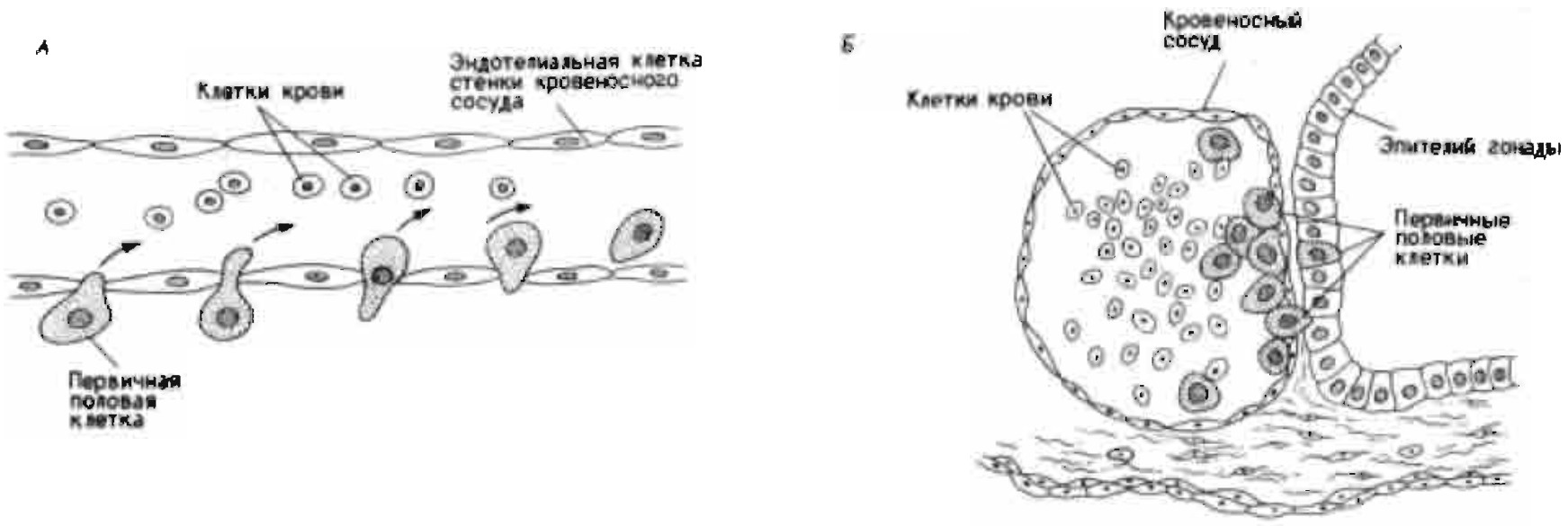


Рис. 22.6. Диапедез первичных половых клеток у куриного зародыша. *А*. Схема диапедеза – процесса проникновения ППК в желточные кровеносные сосуды. *Б*. Поперечный срез через область проспективной гонады куриного зародыша. Несколько ППК в кровеносном сосуде образуют кластер по соседству с половым гребнем. Одна ППК проходит через эндотелий кровеносного сосуда, другая уже локализована в эпителии гонады. (По Romanoff, 1960.)

Дополнительные сведения и гипотезы

Адреса-маркеры клеточной поверхности и миграция лимфоцитов

Каким образом первичные половые клетки рептилий и птиц, циркулирующие в кровотоке, «узнают», что им следует выйти из капилляров только по достижении гонады? Ответа на этот вопрос пока нет, но работы в области иммунологии позволяют сделать одно предположение. Зрелые лимфоциты – это клетки крови, мигрирующие по кровеносным сосудам к лимфоидным органам, таким, как селезенка, периферические лимфатические узлы и лимфоидная ткань, связанная с кишечником. Лимфоциты тоже каким-то образом должны узнавать, когда и где покинуть кровяное русло (экстравазировать) и войти в лимфоидный орган. Более того, лимфоциты данного типа мигрируют лишь к определенному лимфоидному органу. Механизм такого «хоминга» (от англ. "home" – дом) и органной специфичности включает способность лимфоцитов избирательно прилипать к эндотелиальным клеткам сосудов этих органов. Мы уже упоминали об эндотелии лимфоидных органов, называемых **наружными эндотелиальными венулами** (НЭВ). Его клетки располагаются непосредственно за капиллярной сетью этих органов. Моноклональные антитела, полученные против их кровеносных сосудов, способны отличать НЭВ от других лимфоидных органов. Эндотелиальные клетки периферических лимфатических узлов несут на клеточных мембранах молекулы, обусловливающие связывание и экстравазацию узнающих их лимфоцитов. НЭВ лимфоидной ткани, связанной с кишечником, несут на своих клеточных мембранах другие молекулы, и именно эти белковые молекулы необходимы для того, чтобы определенные лимфоциты прилипли к стенке кровеносного сосуда (Streeter et al., 1988a, b; Nakamache et al., 1989). Эти адгезивные белки мембран эндотелиальных клеток называют **адресинами.** Каждому адресину наружных эндотелиальных венул, по-видимому, соответствует узнающая его комплементарная молекула на поверхности лимфоцита (Gallatin et al., 1983, 1986). Кроме того, адресины могут играть важную роль в случае возникновения тканеспецифических метастазов, так как различные опухоли обладают способностью к распознаванию и экстравазации из различных капиллярных сетей (Auerbach et al., 1987).

Итак, миграция клеток к специфическим органам может быть коррелирована со специфическим узнаванием типа «клетка – клетка».

Мейоз

Оказавшись в гонаде, ППК продолжает делиться митотически, давая начало миллионам потенциальных гамет; затем число хромосом в ППК как мужских, так и женских гонад должно быть уменьшено с диплоидного до гаплоидного. В гаплоидном наборе каждая хромосома представлена одной копией, тогда как в диплоидном наборе имеются по две копии каждой хромосомы. Для осуществления подобной редукции мужские и женские половые клетки претерпевают особое деление, называемое **мейозом.**

По завершении последнего митотического деления в ядрах происходит дополнительный синтез ДНК, в результате чего вступающие в мейоз клетки содержат удвоенное по сравнению с нормальным количество ДНК. При этом каждая хромосома состоит из двух сестринских **хроматид**, прикрепленных к общей центромере. (Другими словами, хотя клетка диплоидна, она содержит четыре копии каждой хромосомы, но эти хромосомы видны как две хроматиды, связанные вместе.) Мейоз включает два клеточных деления (рис. 22.7). При первом делении гомологичные хромосомы (например, пара хромосом 3 в диплоидной клетке) сближаются и затем расходятся в разные клетки. Следовательно, при первом мейотическом делении гомологичные хромосомы распределяются между двумя дочерними клетками так, что каждая из них получает одну копию каждой хромосомы. Но поскольку они уже удвоены, следующее за первым делением второе деление мейоза разделяет сестринские хроматиды, которые расходятся в разные клетки. Таким образом, в результате мейоза каждая из четырех образующихся клеток получает единственную (гаплоидную) копию каждой хромосомы.

Первое деление мейоза начинается с длительной профазы, которая подразделяется на пять стадий. В ходе первой из них – стадии **лептотены** (стадия тонких нитей) хроматин хроматид оформляется в очень тонкие нити, не позволяющие в этом клубке идентифицировать отдельные хромосомы. А так как репликация ДНК уже произошла, то каждая хромосома представлена двумя параллельно лежащими хроматидами. На стадии **зиготены** (стадия сопряженных нитей) гомологичные хромосомы располагаются одна вдоль другой. Такое спаривание назы-

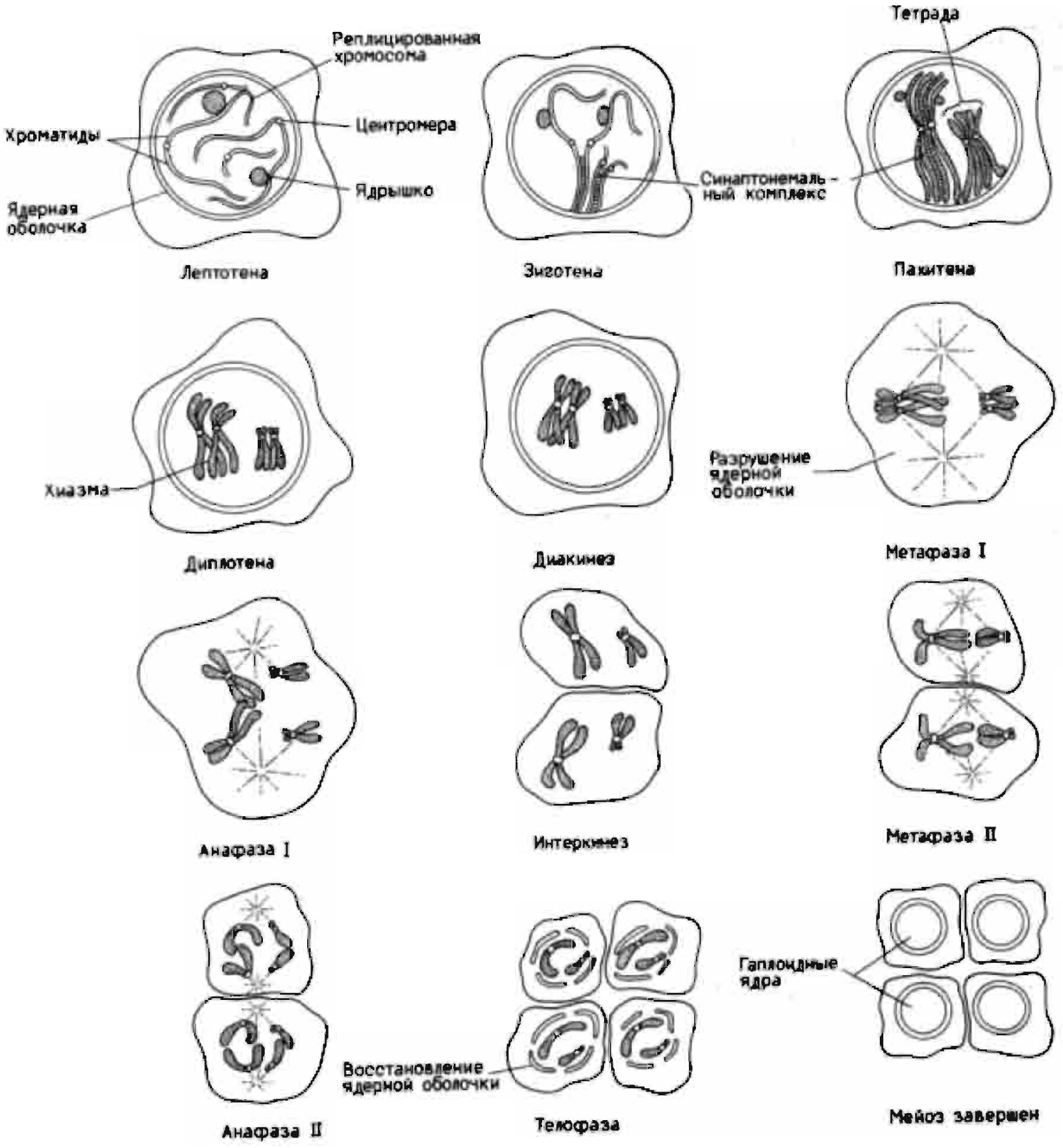


Рис. 22.7. Хромосомы во время мейоза. Стадии от лептотены до диакинеза представляют собой подстадии профазы первого деления мейоза. (По Longo, Anderson, 1974.)

вается **синапсисом**; оно служит характерной чертой мейоза и не наблюдается при митозе. Механизм, лежащий в основе узнавания каждой хромосомой своего гомолога, неизвестен, однако спаривание хромосом, по-видимому, требует присутствия ядерной мембраны и формирования белковой ленты, называемой **синаптонемальным комплексом.** Этот комплекс представляет собой структуру, напоминающую лестницу, с центральным элементом и двумя полосами по бокам (von Wettstein, 1984). Поскольку хроматин связан с этими боковыми полосами, хроматиды оказываются соединенными (рис. 22.8). Изучение ядер мейотических клеток в электронном микроскопе (Moses, 1968; Moens, 1969) свидетельствует о том, что спаренные хромосомы связаны с ядерной мембраной, а Каминге (Comings, 1968) считает, что ядерная оболочка способствует удержанию вместе гомологичных хромосом. Кон-

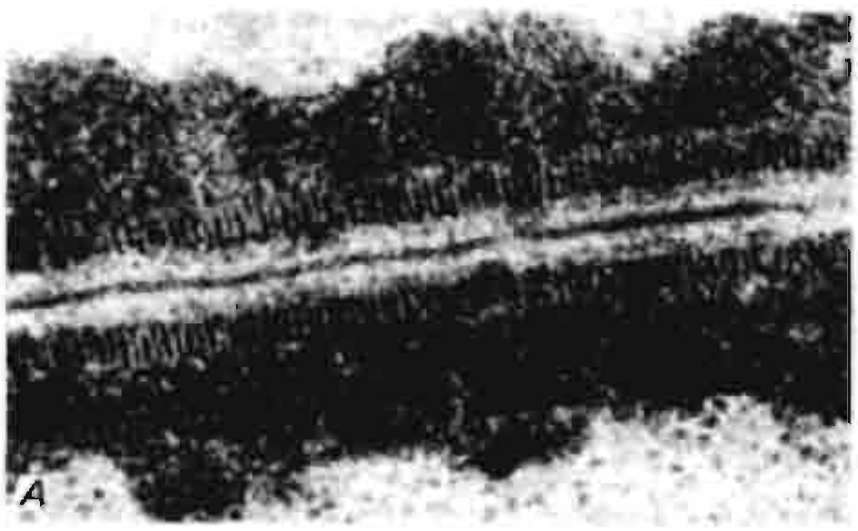


Рис. 22.8. Синаптонемальный комплекс. *А*. Гомологичные хромосомы, удерживаемые вместе на стадии пахитены мейоза в ооците *Neottiella*. *Б*. Схема, поясняющая строение синаптонемального комплекса. (*А* – из von Wettstein, 1971; фотография с любезного разрешения D. von Wettstein; *Б* – по Moens, 1974.)

фигурация, образованная четырьмя хроматидами и синаптонемальным комплексом, называется **тетрадой** или **бивалентом**.

Во время следующей стадии профазы мейоза хроматиды утолщаются и укорачиваются, в связи с чем эта стадия носит название **пахитены** (стадия толстых нитей). На этой стадии в световом микроскопе можно различить отдельные хроматиды и наблюдать кроссинговер. Во время кроссинговера (перекреста хромосом) происходит обмен генетическим материалом (гомологичными генами) между хроматидами спаренных хромосом. Кроссинговер продолжается и на следующей стадии – стадии **диплотены** (стадия двойных нитей). При этом синаптонемальный комплекс разрушается и обе гомологичные хромосомы начинают обособляться, хотя между ними часто сохраняются места сцепления, называемые **хиазмами**; полагают, что именно в этих местах и происходит кроссинговер (рис. 22.9). Для стадии диплотены характерен высокий уровень транскрипции генов. У некоторых видов хромосомы как мужских, так и женских половых клеток принимают форму «ламповых щеток», свойственную хромосомам, активно синтезирующим РНК (гл. 11). Во время следующей стадии – **диакинеза** (стадия обособления двойных нитей) центромеры расходятся, так что хромосомы остаются соединенными только в области концов хроматид. Эта завершающая стадия мейотической профазы заканчивается разрушением ядерной оболочки и миграцией хромосом к метафазной пластинке.

В течение анафазы I гомологичные хромосомы совершенно разъединены и не зависят друг от друга. За этой стадией следует стадия телофазы I, в ходе которой формируются две дочерние клетки, причем каждая включает одного партнера из пары гомологичных хромосом. После кратковременного **интеркинеза** наступает второе деление мейоза. В ходе этого деления центромеры каждой хромосомы делятся во время анафазы, вследствие чего каждая из новых клеток получает одну из двух хроматид. Весь процесс заканчивается образованием четырех гаплоидных клеток. Следует отметить, что в ходе мейоза происходит перегруппировка хромосом. Теперь каждая из четырех гаплоидных клеток имеет свой, отличный от других набор хромосом. У человека с его 23 парами различных хромосом на основе генома единственной особи может быть сформировано 2^{23} (около 10 миллионов) разнообразных типов гаплоидных клеток. Кроме того, кроссинговер, происходящий на стадиях пахитены и диплотены профазы I, еще больше увеличивает генетическое разнообразие, создавая бессчетное число различных гамет.

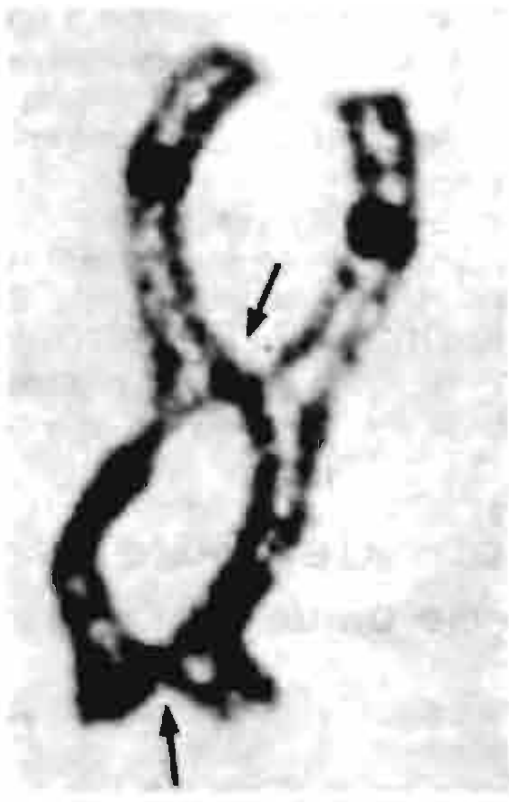


Рис. 22.9. Хиазмы в диплотенном биваленте хромосом ооцита саламандры. Центромеры видны как темные кружки; стрелки указывают на две хиазмы. (Фотография с любезного разрешения J. Kezer.)

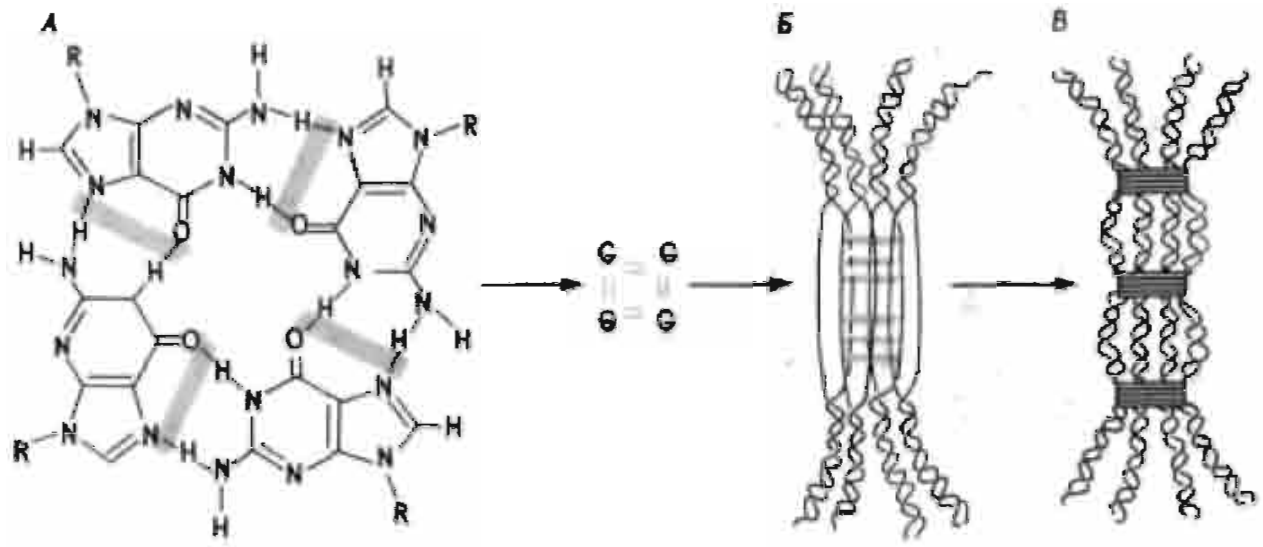


Рис. 22.10. Гипотеза Сена и Гилберта, объясняющая спаривание гомологичных хромосом в мейозе. *А*. Четыре нити ДНК могут образовать устойчивые тетрады с помощью водородных связей между четырьмя гуанозиновыми остатками. *Б*. Схема таких стабилизированных комплексов, где серыми прямоугольниками показаны области гуанозиновых тетрад. В области этих тетрад нормальные водородные связи между комплементарными нитями разорваны. *В*. Схематическое изображение четырех связанных хроматид на ядерной оболочке. (По Sen, Gilbert, 1988.)

Механизм синапсиса неизвестен. Согласно одной из гипотез, некоторые участки ДНК в процессе премейотической S-фазы могут не реплицироваться, и хромосомы в этих участках останутся спаренными благодаря комплементарным парам оснований. Именно такие последовательности были обнаружены у лилии (Hotta et al., 1984), где определенные одноцепочечные участки ДНК сохраняются при формировании синаптонемального комплекса и исчезают только при его разборке. Эта дифференциально реплицирующаяся ДНК богата гуанозином и цитозином; подобное явление поздней репликации не встречается ни до, ни после этого периода созревания половых клеток, не встречается оно и в каких-либо соматических клетках. На основе этих наблюдений Сен и Балтимор, расширив исследования, предложили модель, в которой мейотические хроматиды удерживаются вместе благодаря таким реплицирующимся с опозданием участкам спирали ДНК. Наблюдая за миграцией некоторых фрагментов ДНК в геле, Сен и Балтимор пришли к выводу о том, что богатые гуанозином последовательности при физиологических условиях замыкаются на себя с образованием четырехцепочечных структур. Химический анализ показал, что эти последовательности параллельны друг другу, а не антипараллельны, как в нормальной двойной спирали. Формирование таких четырехцепочечных параллельных витков оказывается возможным благодаря сильным водородным связям между гуанозинами (рис. 22.10). В соответствии с моделью Сена и Балтимора подобные богатые гуанозином участки в области теломер смогли бы удерживать вместе гомологичные хромосомы у ядерной оболочки (в месте, где часто наблюдается инициация синапсиса). После соединения в области теломер «пристегивание» (как в застежке «молния») гомологичных хроматид сопровождается спариванием внутренних богатых гуанозином участков. Доступность последних объясняется локальным раскручиванием в тех случаях, когда многочисленные гуанозиновые остатки оказываются на одной нити спирали. Эти области действуют как движок в застежке «молния». Таким образом, взаимодействие четырех двойных спиралей в мейозе может быть вызвано взаимодействием богатых гуанозином участков всех четырех нитей.

Дополнительные сведения и гипотезы

Важные решения: митоз – мейоз и спермий – яйцо

У многих видов половые клетки, мигрирующие в гонаду, бипотенциальны, т. е. могут дифференцироваться как в спермий, так и в яйцо в зависимости от своего окружения в гонаде. Если яичники саламандр трансформированы в семенники (в результате пересадки зрелого семенника самке), то заселившие их половые клетки прекращают свою оогенную дифференцировку и начинают развиваться как спермии (Burns, 1930; Humphrey, 1931). Показано также (Inoue, Hiroyoshi, 1986; McLaren, 1983), что у комнатной мухи и у мыши гонады могут направлять дифференцировку половых клеток.

Какие гены участвуют в явлении «трансдетерминации»? Для изучения этого вопроса в наибольшей

степени подходят животные-гермафродиты, у которых переход от производства спермиев к производству яиц является естественным физиологическим событием. В исследованиях, выполненных на *Caenorhabditis elegans*, Юдит Кимбл (Judith Kimble) и ее коллеги смогли идентифицировать два «решения» или два варианта выбора, стоящие перед презумптивными половыми клетками. Первый выбор – вступать ли им на путь мейоза или оставаться митотически делящимися стволовыми клетками. Второй выбор – становиться ли мейотической клетке яйцом или спермием. Оказалось, что выбор митоз – мейоз контролируется единственной неделящейся клеткой, которая располагается в конце каждой гонады, она названа **дистальной верхушечной клеткой.** Предшественники половых клеток вблизи этой клетки делятся митотически, образуя фонд половых клеток, но по мере своего смещения от дистальной верхушечной клетки они вступают в мейоз. Если дистальную верхушечную клетку разрушить лазерным лучом, то к мейозу переходят *все* половые клетки, а если дистальную верхушечную клетку помещать в различные области гонады, то вблизи ее нового положения образуются стволовые клетки половой линии (рис. 22.11; Kimble, 1981; Kimble, White, 1981). Можно полагать, что дистальная верхушечная клетка секретирует некое вещество, поддерживающее клетки в состоянии митоза и ингибирующее их мейотическую дифференцировку.

Мы пока не знаем, каким образом дистальная верхушечная клетка взаимодействует с презумптивными половыми клетками, однако Остин и Кимбл (Austin, Kimble, 1987) обнаружили мутацию, обусловливающую фенотип, формирующийся в результате удаления дистальной верхушечной клетки. Все предшественники половых клеток нематод, гомозиготных по рецессивной мутации *glp-1*, переходят к мейозу, не оставляя митотической популяции. Вместо 1500 половых клеток, обычно обнаруживаемых на четвертой личиночной стадии гермафродитного развития, эти мутанты дают 5–8 спермиев. Предшественники половых клеток у генетических химер, у которых в мутантной личинке имеются предшественники половых клеток дикого типа, способны реагировать на дистальные верхушечные клетки и проходить митозы. Если же, однако, в личинке дикого типа обнаруживаются предшественники половых клеток мутанта, то последние все вступают в мейоз. Таким образом, создается впечатление, что ген *glp-1* отвечает за способность половых клеток реагировать на сигнал от дистальной верхушечной клетки [1].



Рис. 22.11. Регуляция выбора митоз – мейоз дистальной верхушечной клеткой яйцесеменников *C. elegans*. *А.* Раннее развитие интактной гонады, где можно выделить области митозов (клетки обозначены серым цветом) и мейозов. *Б.* Гонада после удаления лазером дистальной верхушечной клетки. Все предшественники половых клеток вступают в мейоз.

Приступив к мейозу, клетки тем не менее оказываются перед выбором между дифференцировкой в спермии или яйца. Обычно в каждом яйцесеменнике наиболее проксимальные половые клетки становятся спермиями, а наиболее дистальные (ближе к верхушке) – яйцами (Hirsh et al., 1976). Генетика этого переключения в настоящее время изучается. Как уже обсуждалось в предыдущей главе, гены детерминации пола дают либо соматических самок с функциональным гермафродитизмом, либо соматических самцов. Некоторые мутации могут изменять эти фенотипы. Так, гомозиготы по мутации *tra-1* представляют собой самцов, продуцирующих спермии, а гомозиготы по мутации *fem-1* представляют собой продуцирующих яйца самок (рис. 22.12). Двойные мутанты, гомозиготные по *tra-1* и по *fem-1*, формируют уникальный фенотип: соматически они самцы, но по половой линии – самки (Doniach, Hodgkin, 1984). На основе этого можно предположить, что *tra-1* является геном первичной детерминации пола соматических тканей, а гены *fem* отвечают за выбор спермий – ооцит.

В лаборатории Ходжкина (1985) и в лаборатории Кимбл (1986) недавно было выделено несколько генов, необходимых для выбора пути развития половых клеток. На рис. 22.13 представлена схема предполагаемого функционирования этих генов. Совместное действие генов *fem* активирует ген *fog-1*. Этот ген в половых клетках гомозигот подавляет

[1] От гена *glp-1*, по-видимому, зависит целый ряд индукционных взаимодействий у *C. elegans*. Вы, без сомнения, вспомните, что в гене *glp-1* нуждается бластомер АВ, чтобы получить индуцирующие сигналы от бластомера EMS для формирования мышц глотки (гл. 7, рис. 7.17).

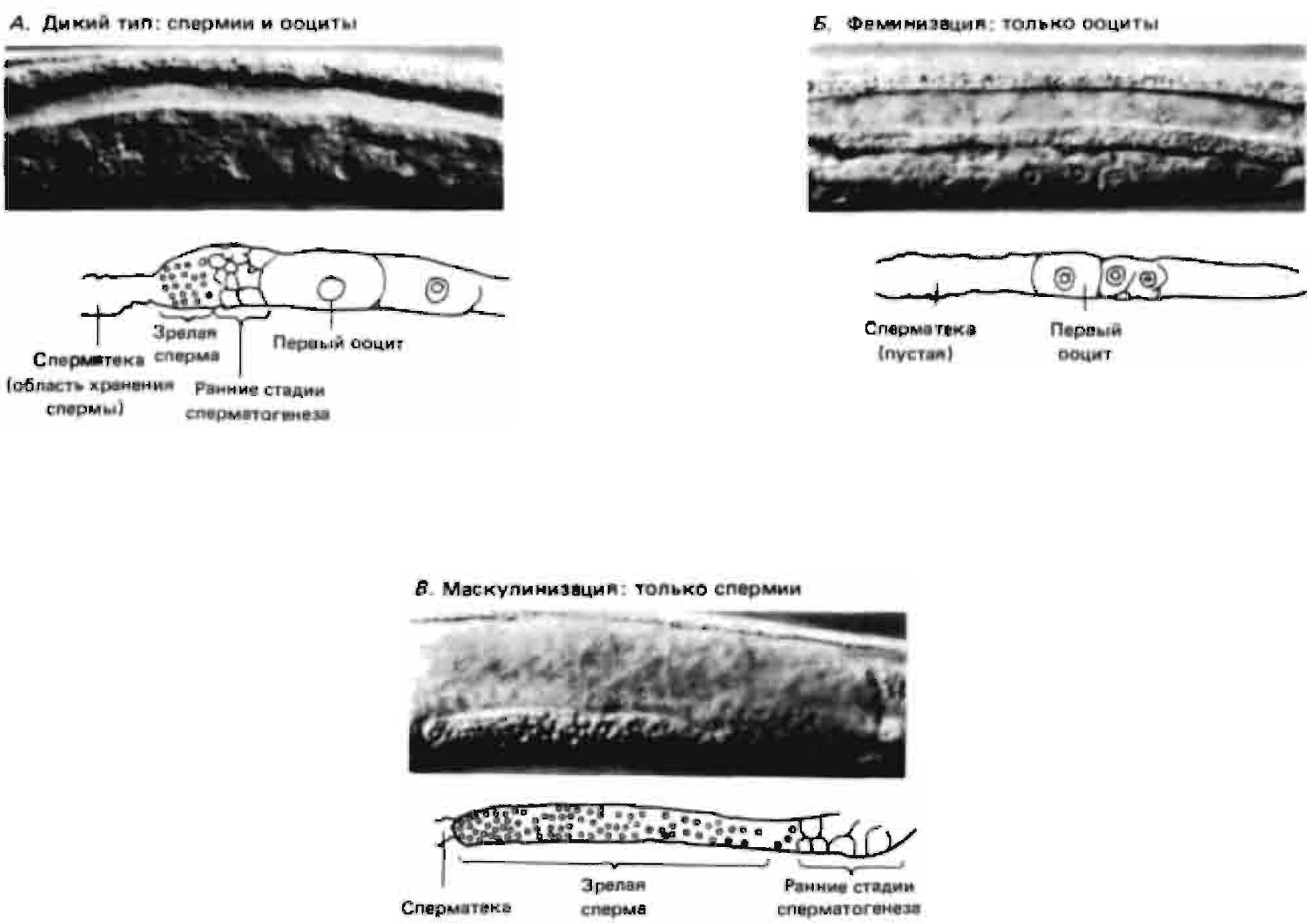


Рис. 22.12. Гонады дикого типа и мутантные у *Caenorhabditis elegans*. *А*. Гермафродит дикого типа сначала продуцирует спермии, а затем яйца. *Б*. Самка, возникшая в результате мутации *fem-1*. Видны только яйца. *В*. Самцы, возникшие в результате мутации *tra-1*, продуцируют только спермии. (Фотографии с любезного разрешения J. Kimble.)

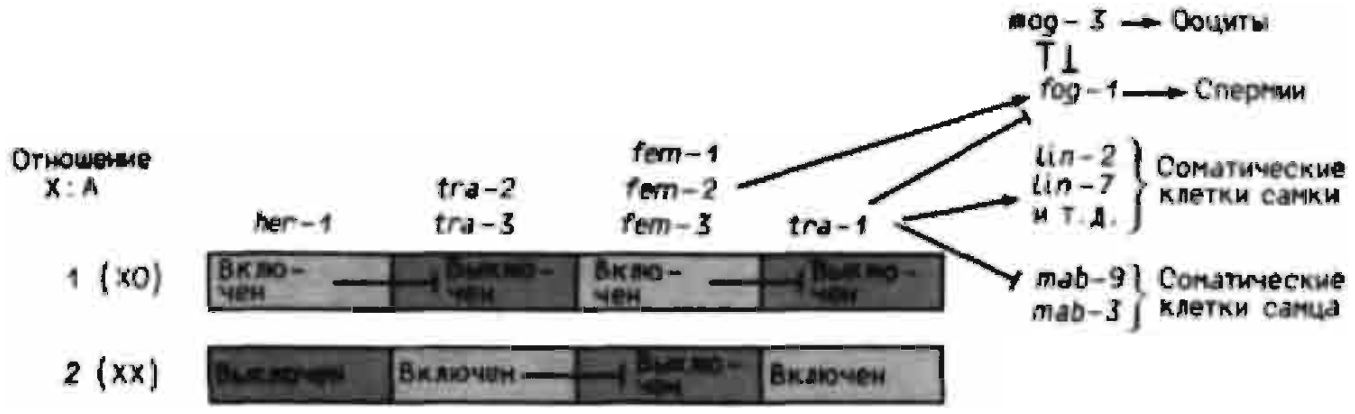


Рис. 22.13. Модель гонадной детерминации пола у нематоды *C. elegans*, основанная на анализе мутаций. Стрелками обозначена положительная регуляция, линейками – отрицательная. Если активны гены *fem*, то в половых клетках экспрессируется ген *fog-1*. Это приводит к подавлению активатора ооцита *mog-3* и к дифференцировке половой клетки в спермий. Напротив, если активируется ген *tra-1*, то подавляется ген *fog-1*, что дает возможность экспрессироваться ооцитспецифическим генам. (По Hodgkin et al., 1985.)

сперматогенез у гермафродитов XX (отсюда его название "*fog*" – от "*f*eminization *o*f *g*erm line" – т. е. феминизация половой линии). Аллель дикого типа гена *fog-1* активирует гены, необходимые для сперматогенной дифференцировки половых клеток, и подавляет активность гена *mog-3* дикого типа (чье отсутствие вызывает маскулинизацию половой линии; отсюда и название гена *mog-3* *m*asculinization *o*f *g*erm line). Если же, однако, активен ген *tra-1* (чего следует ожидать у гермафродитов), гены *fog-1* инактивируются, что приводит к разрешению экспрессии ооцит-специфического гена *mog-3*. Таким образом, пол половой клетки обычно коррелирован с соматическим полом, и половая клетка *Caenorhabditis* дикого типа может стать либо спермием, либо яйцом.

Сперматогенез

Оказавшись в половом гребне мужских зародышей, первичные половые клетки позвоночных включаются в состав половых тяжей. Здесь они остаются до созревания; к этому времени в половых тяжах формируются полости и тяжи превращаются в семенные канальцы, эпителий которых дифференцируется в клетки Сертоли. Клетки Сертоли снабжают развивающиеся спермии питательными веществами и осуществляют защитную функцию; **сперматогенез** – мейотические деления, приводящие к образованию спермиев, – происходит в карманах-углублениях поверхности клеток Сертоли (рис. 22.14). Процесс превращения ППК в спермии подробно изучен у целого ряда организмов, но здесь мы рассмотрим сперматогенез у млекопитающих. По достижении гонады ППК делятся и образуют **сперматогонии типа A_1**. Эти клетки характеризуются меньшими по сравнению с ППК размерами и овальным ядром, хроматин которого ассоциирован с ядерной мембраной. Сперматогонии типа A_1 располагаются вблизи наружной базальной мембраны половых тяжей. Полагают, что, завершив созревание, эти сперматогонии делятся с образованием еще одного сперматогония A_1 и новой, бледнее окрашивающейся клетки – **сперматогония типа A_2**. Следовательно, каждый сперматогоний типа A_1 является стволовой клеткой, способной как к самовоспроизводству, так и к образованию клетки нового типа. Сперматогонии A_2 делятся, давая начало сперматогониям A_3, которые в свою очередь дают начало сперматогониям типа A_4, а эти последние – **промежуточным сперматогониям.** Промежуточные сперматогонии делятся, формируя **сперматогонии типа B**, митотическое деление которых приводит к образованию **первичных сперматоцитов (сперматоцитов первого порядка)** – клеток, вступающих в мейоз.

Анализируя рис. 22.15, мы обнаруживаем, что в ходе сперматогониальных делений цитокинез не доходит до конца. В результате незавершенных делений клетки формируют синцитий, в котором они сообщаются друг с другом посредством цитоплазматических мостиков диаметром 1 мкм (Dym,

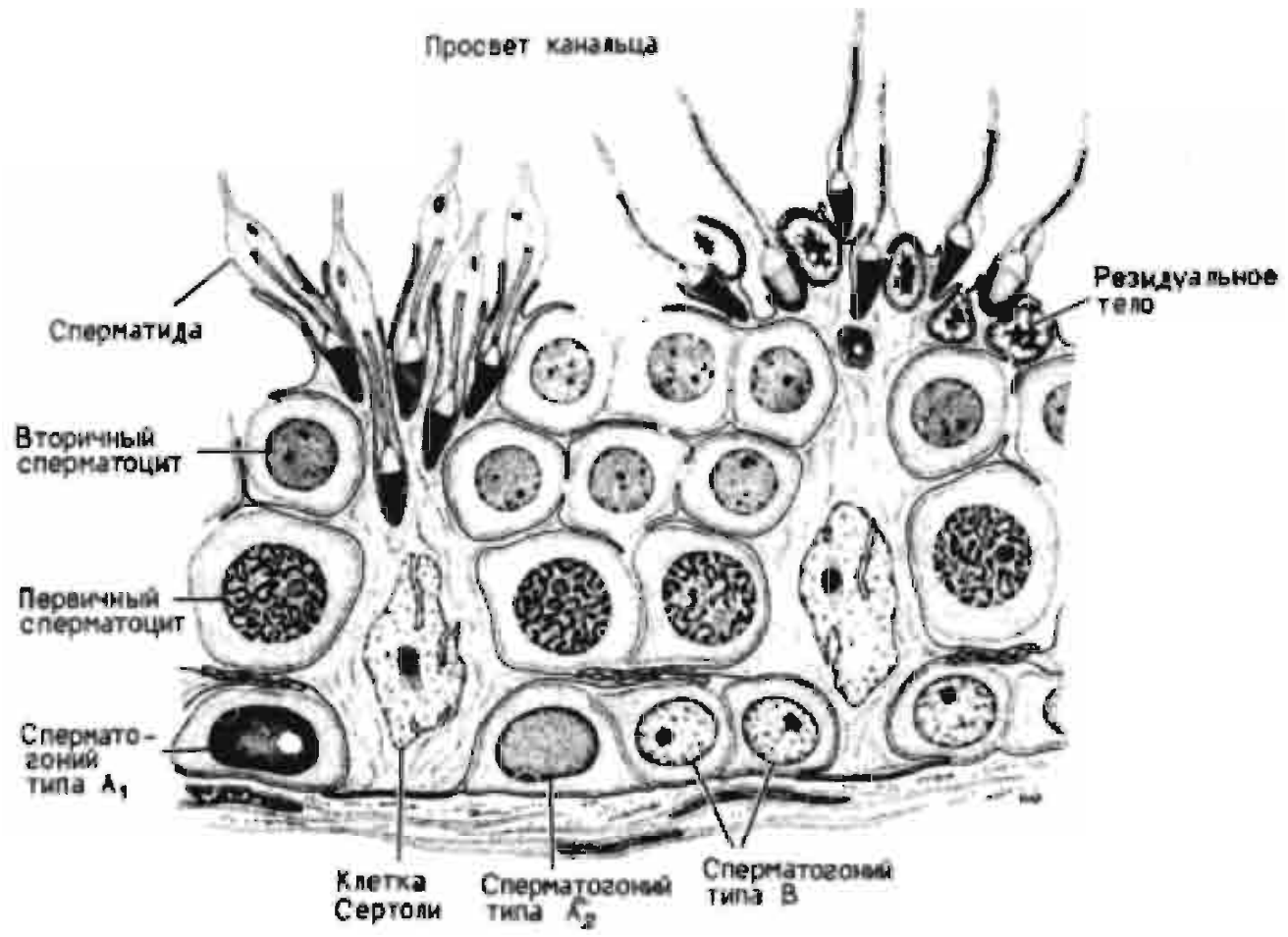


Рис. 22.14. Схематический рисунок среза через семенной каналец, на котором представлены отношения между клетками Сертоли и развивающимися спермиями. По мере созревания сперматогенные клетки смещаются к просвету семенного канальца. (По Dym, 1977.)

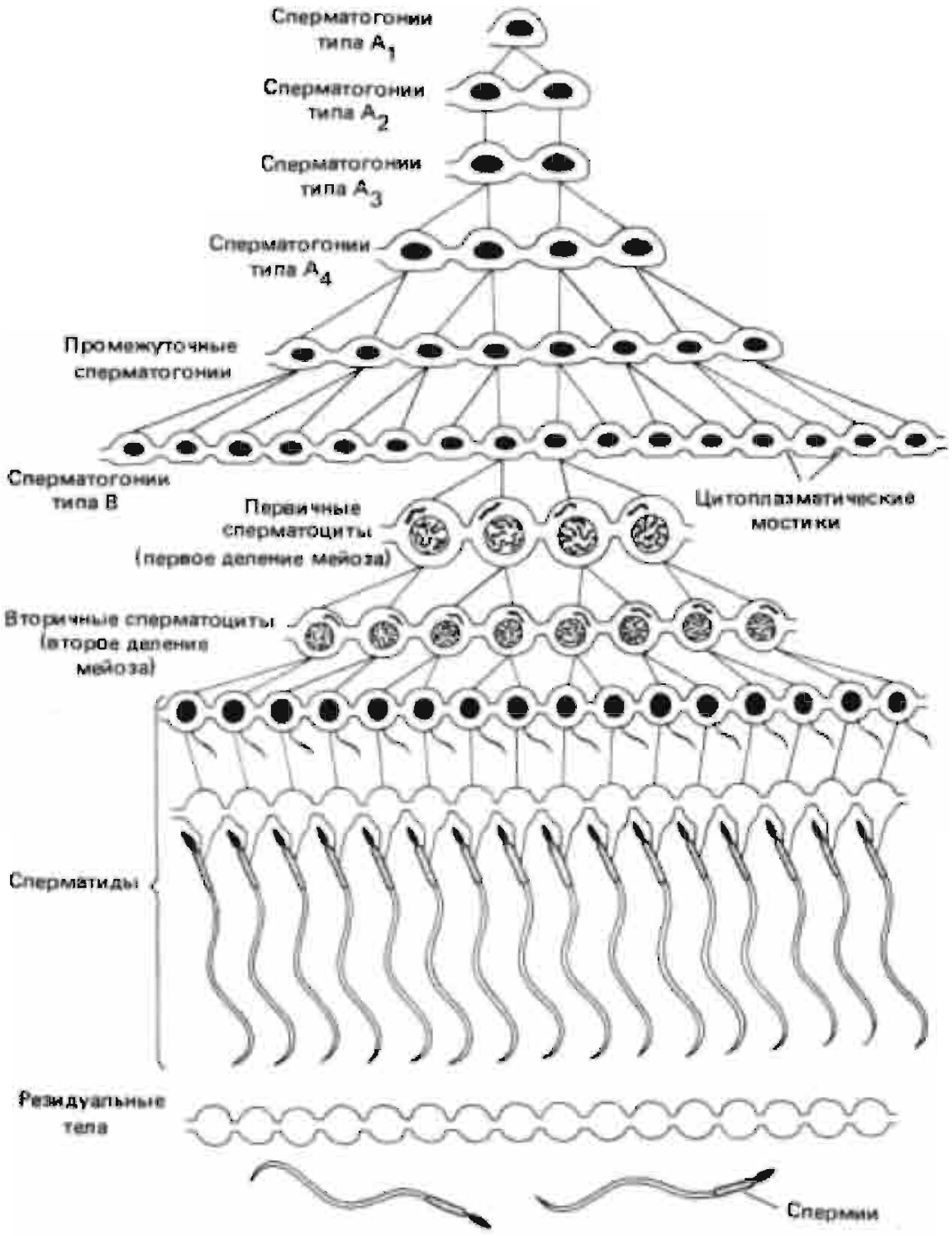


Рис. 22.15. Формирование синцитиальных клонов мужских половых клеток. (По Bloom, Fawcett, 1975.)

Fawcett, 1971). Последовательные деления дают клоны взаимосвязанных клеток, и, поскольку ионы и молекулы с легкостью проходят через межклеточные мостики, каждая когорта созревает синхронно.

Каждый первичный сперматоцит, пройдя первое деление мейоза, образует два **вторичных сперматоцита (сперматоциты второго порядка)**, которые завершают второе деление мейоза. Образовавшиеся в результате гаплоидные клетки называют **сперматидами**; они по-прежнему соединены цитоплазматическими мостиками, в них содержатся гаплоидные ядра, но функционально сперматиды диплоидны, так как генный продукт одной клетки может свободно диффундировать в цитоплазму соседей (Braun et al., 1989a). По мере того как сперматогонии типа A_1 проходят путь до образования сперматид, клетки все более удаляются от базальной мембраны семенного канальца к его просвету (рис. 22.14). Таким образом, клетки каждого типа могут быть обнаружены в определенном слое стенки канальца. Сперматиды локализованы на границе просвета; здесь они утрачивают свои цитоплазматические связи и дифференцируются в спермиальные клетки.

Спермиогенез

Гаплоидные сперматиды представляют собой округлые безжгутиковые клетки, совершенно не похожие на зрелые спермии позвоночных. Следующий этап созревания спермиев – **спермиогенез** (или **спермателиоз**) – дифференцировка спермиальной клетки. Для того чтобы произошло оплодотворение, спермий должен встретить яйцо и соединиться с ним, поэтому в процессе спермиогенеза спермий претерпевает дифференцировку, позволяющую ему приобрести способность к движению и взаимодействию

с яйцом. Процесс дифференцировки спермия млекопитающих представлен на рис. 2.2. Ее первый шаг заключается в образовании акросомного пузырька из аппарата Гольджи. Акросома образует шапочку, прикрывающую ядро спермия. Когда она сформируется, ядро поворачивается так, что акросомная шапочка оказывается обращенной к базальной мембране семенного канальца. Такой поворот необходим, поскольку у противоположного конца ядра из центриоли начинает формироваться жгутик, направленный в просвет канальца. На последней стадии сперматогенеза ядро уплощается и конденсируется, остатки цитоплазмы («цитоплазматическая капля») отбрасываются, и митохондрии образуют кольцо вокруг основания жгутика. Сформировавшийся спермий выходит в просвет канальца.

У мыши все развитие от стволовой клетки до сперматозоида длится 34,5 сут. Сперматогониальные стадии продолжаются 8 сут, мейоз длится 13 сут и спермиогенез занимает еще 13,5 сут. У человека развитие спермиев завершается через 74 сут. Поскольку сперматогонии типа A_1 служат стволовыми клетками, сперматогенез может продолжаться постоянно. Каждый час в семеннике человека образуется около 100 млн. спермиев, а при каждой эякуляции выделяется около 200 млн. спермиев. Неиспользованные спермии либо резорбируются, либо выносятся из тела с мочой.

Экспрессия генов при сперматогенезе

Транскрипция генов при сперматогенезе происходит преимущественно на стадии диплотены профазы мейоза. Ее наблюдали у многих организмов, но наилучшим образом она документирована в случае транскрипции Y-хромосомы у *Drosophila hydei*. Транскрипция этой хромосомы играет существенную роль в контроле спермиогенеза. Если вспомнить функции Y-хромосомы у *Drosophila*, это не покажется удивительным, поскольку в данном случае Y-хромосома не участвует в детерминации пола. Она необходима для формирования жизнеспособной спермы. Различия между дрозофилой XY и дрозофилой X0 состоят в том, что последняя стерильна. Обе самцы. У *Drosophila hydei* Y-хромосома образует пять выступающих петель ДНК (рис. 22.16). В случае делеции любой из этих петель ДНК хвост спермия оказывается аномальным, причем будут присутствовать все составные части спермия, но они не будут организованы должным образом (Hess, 1973). Отсюда можно заключить, что Y-специфическая ДНК, синтезированная в профазе мейоза, утилизируется позже – при спермиогенезе.

Гены, специфически транскрибируемые в процессе сперматогенеза,– это чаще всего гены, продукты которых необходимы для обеспечения подвижности спермия или для связывания его с яйцом. У *Drosophila melanogaster* один из таких специфически транскрибируемых генов – ген тубулина β2. Эта изоформа β-тубулина обнаружена только при сперматогенезе; она отвечает за формирование мейотических веретен, аксонемы и микротрубочек, ассоциированных с удлиняющимися митохондриями [1]. Хойл и Рэфф (Hoyle, Raff, 1990) показали, что другая изоформа β-тубулина – β3-тубулин (в норме экспрессирующийся в мезодермальных клетках и эпидермисе) не может заменить β2-тубулин. Когда они слили 5′-регуляторную область β2-тубулинового гена с кодирующими последовательностями гена β3-тубулина, ген β3-тубулина получил возможность экспрессироваться в развивающемся спермии. Его экспрессия в отсутствие гена β2-тубулина не позволяла сперматогенным клеткам пройти мейоз, сформировать аксонему и оформить ядро. Происходило только удлинение митохондрий. Это свидетельствует о важности спермий-специфической транскрипции изоформ тубулина и о том, что любой другой β-тубулин не может обеспечить формирования митотического веретена и аксонемы спермия.

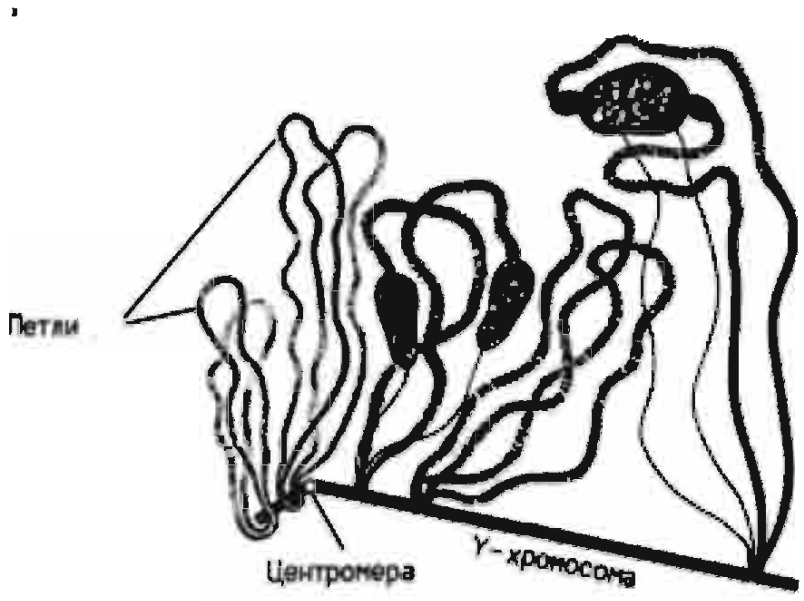


Рис. 22.16. Схема организации Y-хромосомы *Drosophila hydei* на стадии хромосом типа ламповой щетки. Отчетливо видны пять петель. (По Hess, 1973.)

Гены, продукты которых необходимы для связывания спермия с внеклеточным матриксом яйца, также транскрибируются во время сперматогенеза. Так, ген биндина у морского ежа транскрибируется на относительно поздних стадиях сперматогенеза, и его мРНК транслируется в биндин вскоре после ее синтеза (Nishioka et al., 1990). Биндин накапливается в пузырьках, которые сливаются, образуя единственный акросомный пузырек зрелого спермия. На

[1] Образование аксонемы спермия у дрозофилы – непростая задача. Хвост спермия имеет в длину 2 мм, т. е. равен длине всей мухи-самца. Еще более удивительно, что в яйцо входит весь спермий (Karr, 1988).



Рис. 22.17. Определение локализации биндина в акросоме спермия с помощью антибиндиновых антител, меченных золотом. Атомы золота позволяют выявить антитела, которые на электронно-микроскопическом снимке имеют вид черных точек. Этот спермий все еще находится в семеннике морского ежа. (Фотография с любезного разрешения D. Nishioka.)

рис. 22.17 представлена локализация белка биндина в акросомном пузырьке спермия, еще находящегося в семеннике.

Как и в ооците, в сперматиде может накапливаться мРНК, которая используется позже. У птиц и млекопитающих во время сперматогенеза синтезируется специфическая форма лактатдегидрогеназы – ЛДГ-Х. (Этот белок позволяет развивающемуся спермию утилизировать пируват в качестве альтернативного источника энергии.) Матричная РНК для этого белка может быть обнаружена в цитоплазме сперматоцита во время профазы мейоза (Blanco, 1980). Кроме того, у многих видов на последних этапах сперматогенеза в ядре появляются небольшие белки, называемые **протаминами.** Они содержат около 32 аминокислот, которые, за исключением четырех или пяти, являются аргининовыми остатками. Они замещают ядерные гистоны, заставляя ДНК принять компактную, почти кристаллическую организацию (Marushige, Dixon, 1969). ДНК, комплементарная к протаминовой мРНК лосося, может выявить последовательности протаминовой мРНК в первичном сперматоците. Эти мРНК, однако, хранятся в рибонуклеопротеиновых частицах. Только на стадии сперматиды примерно спустя месяц после своего синтеза протаминовая мРНК транслируется в белок (Iatrou et al., 1978). Регуляция этой мРНК, по-видимому, контролируется ее 3'-нетранслируемой областью. Если эту область поместить в другую мРНК, то она придаст новой мРНК регуляторные свойства протаминовой мРНК (Braun et al., 1989b). Таким образом, как и ооцит, синтезирующий РНК на стадии диплотены и хранящий ее для более позднего использования, спермий также может накапливать мРНК для более поздней трансляции.

Имеются данные о том, что помимо транскрипции генов во время профазы мейоза происходит также транскрипция некоторых генов в сперматидах (см. обзор Palmiter et al., 1984). Такие данные для **экспрессии гаплоидного гена** были получены в результате изучения гетерозиготных мышей, у которых наблюдаются две различающиеся популяции спермиев – одна популяция, экспрессирующая мутантный фенотип, и другая, экспрессирующая признаки дикого типа. Если бы синтез РНК или белка происходил на диплоидной стадии существования клеток, то все спермии имели бы один и тот же фенотип.

У некоторых видов спермии несут важную для развития информацию, которая не может быть компенсирована яйцом. Мы уже обсуждали хромосомы млекопитающих, у которых ДНК яйца и спермия отличается по характеру метилирования (гл. 2 и 12). Известны и гены с отцовским эффектом. Так, гомозиготные рецессивные аллели самца вызывают аномалии развития у зародыша даже при условии, что самка гомозиготна по аллелю дикого типа, тогда как реципрокное скрещивание, в котором используется отец дикого типа и гомозиготная по мутантному аллелю мать, приводит к развитию нормальных зародышей. Один из таких генов с отцовским эффектом – это ген *spe-11* у *C. elegans*. Спермии,

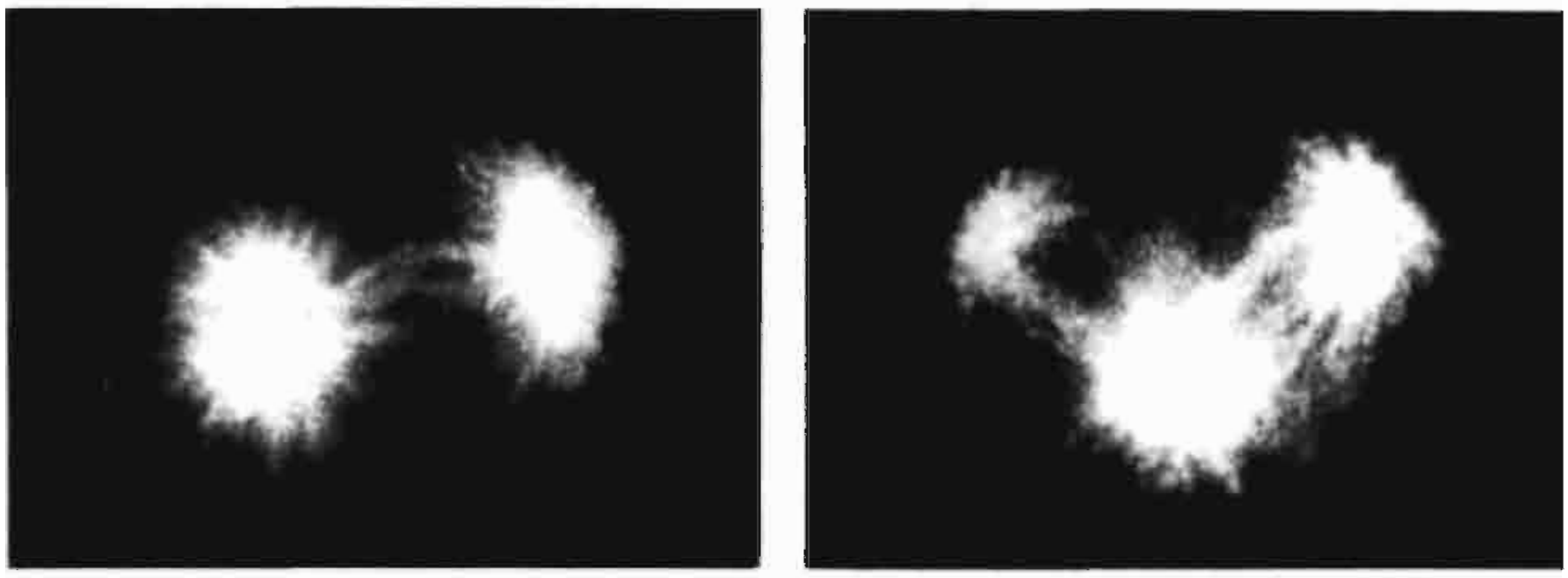


Рис. 22.18. Иммунофлуоресцентная микрофотография митотических веретен первого деления дробления зародыша *C. elegans*. *А*. Спермий принадлежит самцу дикого типа. *Б*. Спермий получен от самца, гомозиготного по гену отцовского эффекта *spe-11*. Вместо обычного двухполюсного митоза образуются три центриоли, организующие микротрубочки. (Из Hill et al., 1989; фотография с любезного разрешения S. Strome.)

содержащие мутантный аллель в этом локусе, не способны к прямому перемещению хромосом, ориентирующему митотическое веретено у зародыша, что свидетельствует о влиянии этой мутации на область организации микротрубочек – центриоли (рис. 22.18; Hill et al., 1989).

И наконец, гаплоидный геном конденсирован вследствие того, что гистоны замещены протаминами или специально модифицированными гистонами. Многие гистоны спермия модифицируются на стадии поздней сперматиды во время сперматогенеза. Эти модификации (такие, как дефосфорилирование N-концевых участков некоторых гистонов) вызывают конденсацию хроматина. Конденсация приводит к сильному подавлению транскрипции. В результате транскрипция мужского генома не возобновляется, пока он не реактивируется в какой-то момент развития (Poccia, 1986; Green, Poccia, 1988).

Оогенез

Оогенный мейоз

Оогенез – дифференцировка яиц – отличается от сперматогенеза в нескольких отношениях. Если гамета, сформированная в результате сперматогенеза, по существу является подвижным ядром, то гамета, сформированная в процессе оогенеза, обладает всеми факторами, необходимыми для инициации и поддержания метаболизма и развития. Следовательно, помимо гаплоидного ядра в оогенезе возникает запас цитоплазматических ферментов, матриц, органелл и метаболических субстратов. Таким образом, если дифференцировка спермия направлена на приобретение подвижности, то развитие ооцита приводит к исключительно сложной организации цитоплазмы. В отличие от спермия, дифференцировка которого завершается после делений мейоза, рост ооцита происходит прежде всего во время растянутого периода профазы мейоза.

Механизмы оогенеза характеризуются значительно большим разнообразием, чем механизмы сперматогенеза. И это не удивительно, если учесть громадное разнообразие типов размножения у животных разных видов. У одних видов, таких, как морские ежи и лягушки, самка выметывает единовременно сотни или тысячи яиц, тогда как у других видов, например у человека и большинства млекопитающих, в процессе индивидуальной жизни образуется совсем немного яиц. У видов, продуцирующих тысячи яиц, оогонии служат стволовыми самовоспроизводящимися клетками, активными в течение всей жизни организма. У более экономно размножающихся видов деление оогониев приводит к образованию ограниченного числа клеток – предшественников яиц. У плода человека со второго по седьмой месяц беременности происходят быстрые деления около тысячи оогониев, что приводит к образованию приблизительно 7 млн. половых клеток (рис. 22.19). Однако после седьмого месяца эмбрионального развития число половых клеток резко падает. В течение этого периода погибает бóльшая часть оогониев, а оставшиеся вступают в профазу первого деления мейоза (Pinkerton et al., 1961). Эти клетки, названные **первичными ооцитами**, проходят профазу первого деления мейоза до стадии диплотены и на время прекращают свое развитие. Остановка на стадии профазы первого деления мейоза

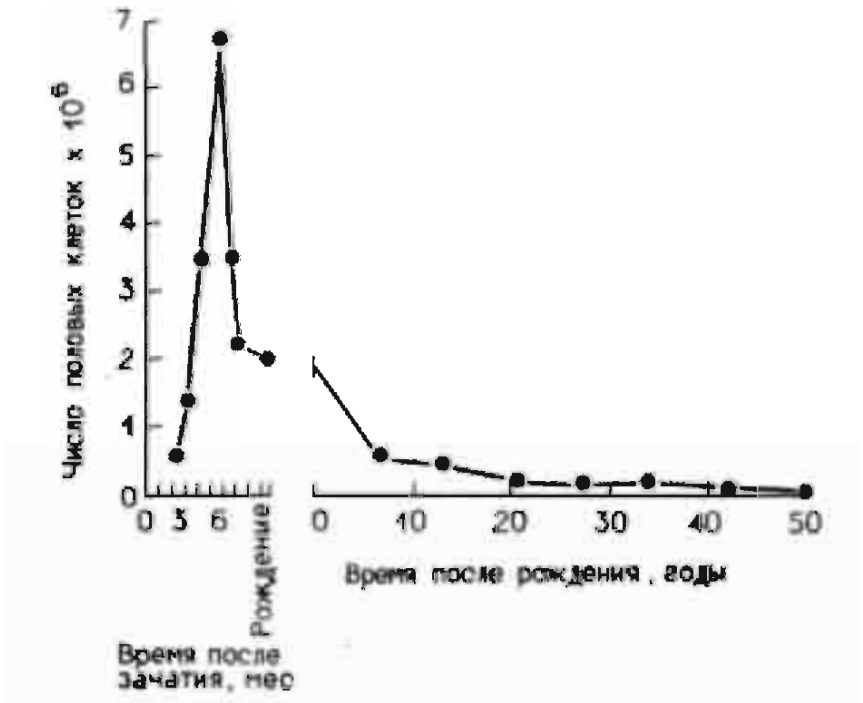


Рис. 22.19. Изменение числа половых клеток в яичнике человека. (По Baker, 1970.)

длится до полового созревания. С его началом группы ооцитов периодически возобновляют мейоз. Так, у женщин мейоз начинается на эмбриональной стадии развития и затем сигнал к возобновлению мейоза не поступает примерно до 12-летнего возраста. В действительности же некоторые ооциты оказываются блокированы в мейотической профазе почти до 50 лет. Как следует из рис. 22.19, первичные ооциты продолжают погибать даже после рождения. Из миллионов первичных ооцитов, имеющихся в яичнике при рождении, лишь около 400 созревает в течение жизни женщины.

Оогенный мейоз отличается от сперматогенного мейоза и по расположению метафазной пластинки. Когда первичный ооцит делится, его ядро, называемое **зародышевым пузырьком**, разрушается, и метафазное веретено мигрирует на периферию клетки. Во время телофазы одна из дочерних клеток практически не содержит цитоплазмы, тогда как другая получает почти все компоненты клетки (рис. 22.20). Меньшая клетка называется **первым полярным тельцем**, а бóльшая – **вторичным ооцитом**. Во время второго деления мейоза происходит такой же неравный цитокинез. Бóльшая часть цитоплазмы остается в зрелой яйцеклетке (**яйце**), а **второе полярное тельце** получает немного больше материала, чем гаплоидное ядро. Таким образом, оогенный мейоз служит сохранению объема цитоплазмы ооцита в единственной клетке, не допуская ее равного распределения между четырьмя клетками.

У некоторых видов животных мейоз претерпевает очень значительные модификации, давая в результате диплоидные гаметы, которые для своего развития не нуждаются в оплодотворении. Такие животные называются **партеногенетическими**. У плодовой мухи *Drosophila mangabeirai* одно из полярных телец ведет себя как спермий, «оплодотворяя» ооцит после второго деления мейоза. У других насекомых (таких, как *Moraba virgo*) и у ящерицы *Cnemidophorus uniparens* число хромосом в оогониях удваивается перед началом мейоза, и, следовательно, при уменьшении их числа вдвое восстанавливается диплоидный набор. В половых клетках кузне-

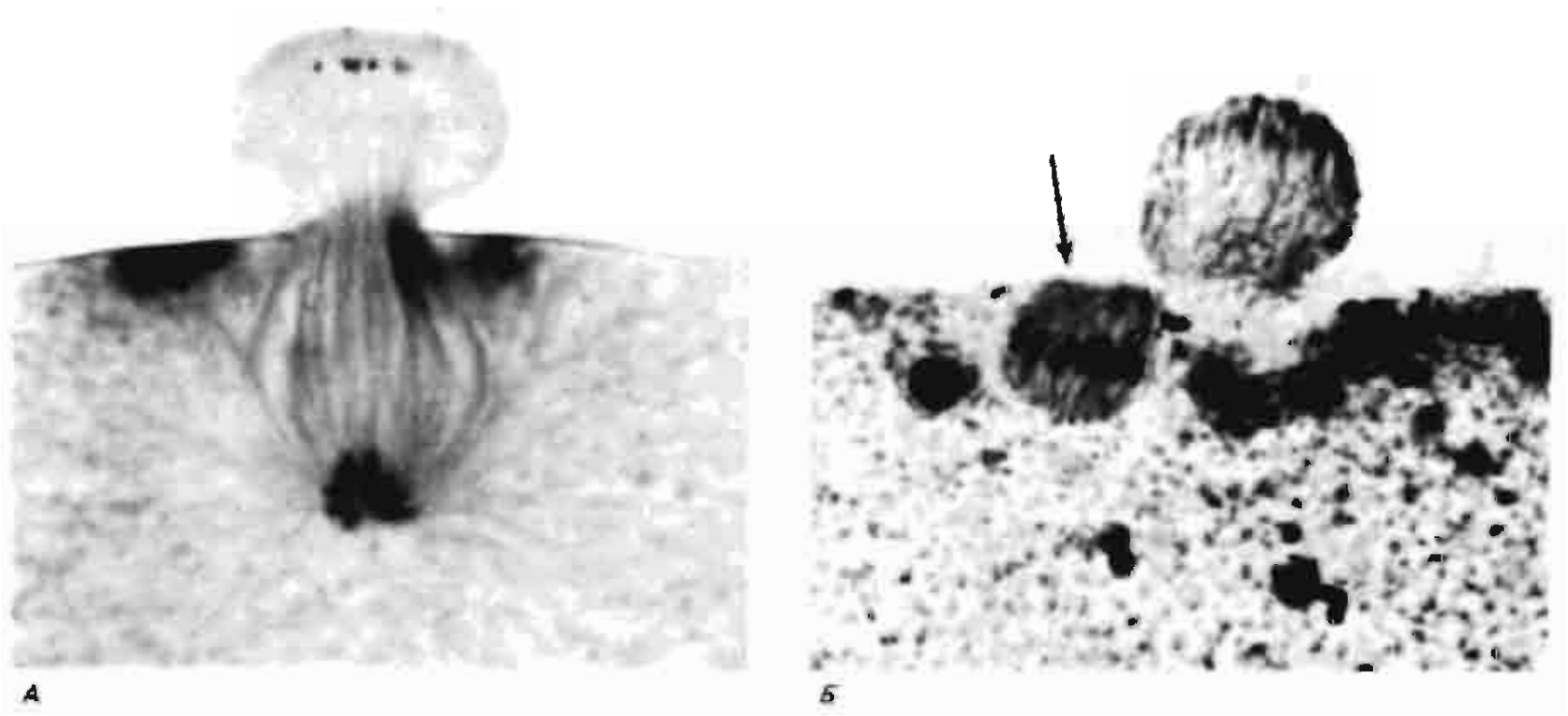


Рис. 22.20. Формирование полярного тельца в ооците сига (*Coregonus*). *А*. Анафаза первого деления мейоза, при котором происходит отделение первого полярного тельца вместе с его хромосомами. *Б*. Метафаза (внутри ооцита; стрелка) второго деления мейоза; рядом сохраняется первое полярное тельце. Первое полярное тельце может разделиться снова, а может и не делиться. (Из Swanson et al., 1981; фотография с любезного разрешения C. P. Swanson.)

чика *Pycnoscelus surinamensis* мейоз вообще не происходит; у этого вида в результате двух митотических делений образуются диплоидные яйца (Swanson et al., 1981). В приведенных выше примерах вид представлен только самками. У других видов гаплоидный партеногенез широко используется не только как способ размножения, но и как механизм детерминации пола. У перепончатокрылых (пчелы, осы и муравьи) неоплодотворенные яйца развиваются в самцов, а оплодотворенные, ставшие диплоидными, яйца дают самок. Гаплоидные самцы способны продуцировать сперми, лишившись первого деления мейоза, вследствие чего после второго деления мейоза образуются две спермиальных клетки.

Таблица 22.1. Клеточные компоненты, запасенные в зрелом ооците *Xenopus laevis*

Компонент	Приблизительное превышение соответствующего количества в клетках личинки
Митохондрии	100 000
РНК-полимеразы	60 000–100 000
ДНК-полимеразы	100 000
Рибосомы	200 000
тРНК	10 000
Гистоны	15 000
Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты	2500

Из Laskey, 1974.

Созревание ооцитов у амфибий

Яйцо обладает потенциальной способностью к развитию, и у некоторых видов, как уже было упомянуто, оплодотворение даже не обязательно. Материал, накопленный в цитоплазме ооцита, включает источники энергии и органеллы (желток и митохондрии), ферменты и предшественники синтеза ДНК, РНК и белка, запас информационных РНК, структурные белки и морфогенетические детерминанты. Частичный перечень веществ, запасенных в цитоплазме ооцита, представлен в табл. 22.1. Этот материал накапливается главным образом во время мейотической профазы I, которая часто подразделяется на **превителлогенную** (*от греч.*– перед формированием желтка) и **вителлогенную** (желтокобразующую) фазы.

Яйца рыб и амфибий происходят от популяции оогониальных стволовых клеток, способных ежегодно давать новую генерацию ооцитов. У лягушки *Rana pipiens* оогенез длится 3 года. В течение первых двух лет происходит очень медленное увеличение размеров ооцита. В течение третьего года быстрое накопление желтка приводит к тому, что ооцит приобретает характерные для него размеры (рис. 22.21). Созревание ооцитов осуществляется партиями: первая генерация созревает вскоре после метаморфоза, следующая – годом позже.

Вителлогенез происходит по достижении ооцитом стадии диплотены профазы мейоза. Эта стадия характеризуется также появлением в ядре хромосом типа ламповых щеток, на которых идет активный синтез РНК (гл. 11). Желток представляет собой не

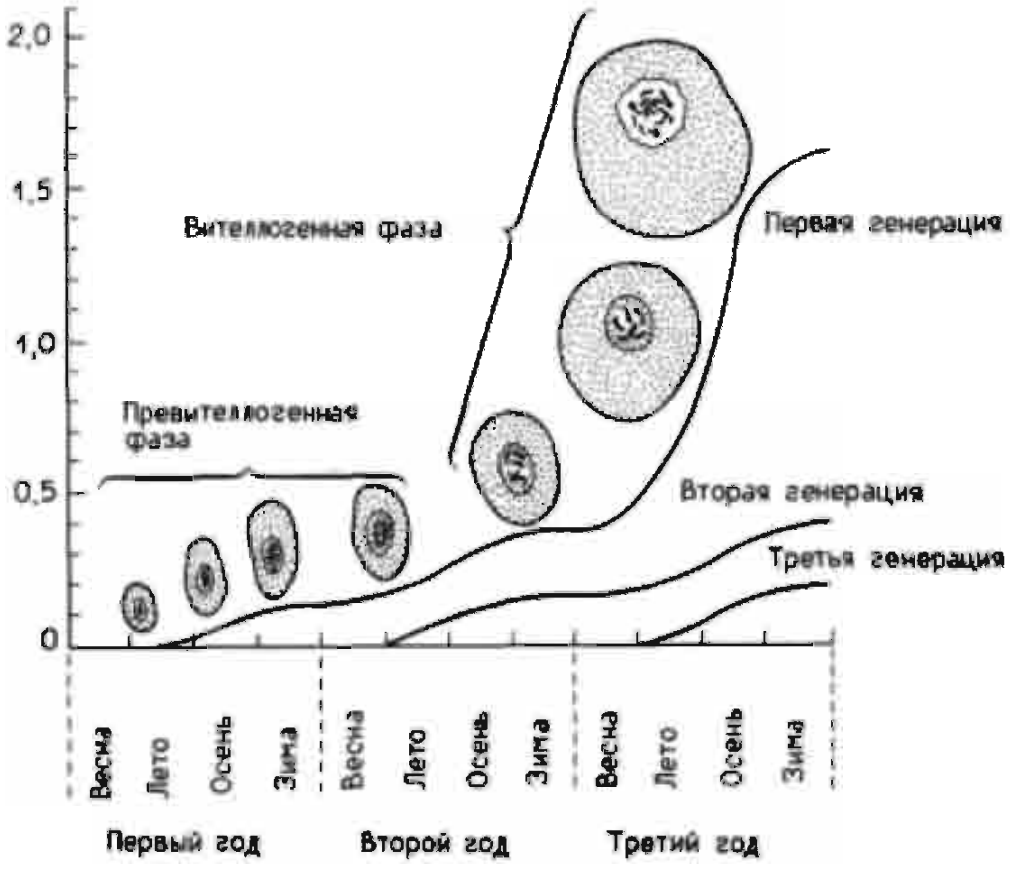


Рис. 22.21. Рост ооцитов лягушки. В течение первых трех лет жизни формируются три генерации ооцитов. На графике прослежен рост ооцитов первой генерации. (По Grant, 1953.)



Рис. 22.22. Желточная пластинка ооцита амфибии. (Фотография с любезного разрешения L. K. Opresko.)

какое-то одно вещество, а смесь продуктов, используемых для питания зародыша. Основной компонент желтка – белок с молекулярной массой 470 000 дальтон, называемый **вителлогенином.** Он синтезируется не в ооците лягушки (как бóльшая часть белков желтка у таких организмов как кольчатые черви или речной рак), а в печени и в яичник доставляется с кровью (Flickinger, Rounds, 1956). Этот крупный белок проходит между фолликулярными клетками яичника и включается в ооцит путем **микропиноцитоза** – отшнуровывания внутрь клетки одетых мембраной пузырьков в основании микроворсинок (Dumont, 1978). В зрелом ооците вителлогенин расщепляется на два меньших белка – высокофосфорилированный **фосвитин** и липопротеин **липовителлин**. Оба белка совместно упакованы в ограниченные мембраной **желточные пластинки** (рис. 22.22). Гликогеновые гранулы и липохондриальные включения служат соответственно местами хранения углеводных и липидных компонентов желтка.

Бóльшая часть яиц характеризуется высокой степенью асимметрии, и именно во время оогенеза происходит спецификация их анимально-вегетативной оси. Данилчик и Герхарт (Danilchik, Gerhart, 1987) показали, что, несмотря на повышение концентрации желтка в ооците *Xenopus* примерно в десять раз в направлении от анимального к вегетативному полюсу зрелого яйца, включение вителлогенина одинаково по всей поверхности ооцита. Различия в концентрации желтка обусловлены его перемещением *внутри* ооцита, и это зависит от места вхождения белков желтка. Если желточные пластинки формируются в будущем анимальном полушарии, то они перемещаются внутрь, к центру клетки. Что же касается вегетативных желточных пластинок, то они не изменяют своего положения, оставаясь в течение длительного времени на периферии и постепенно увеличиваясь в размерах. Они медленно смещаются от кортекса вглубь, а их место занимают новые желточные пластинки, образующиеся у поверхности. В результате этого дифференциального внутриклеточного транспорта в вегетативном полушарии количество желтка возрастает до тех пор, пока здесь не сосредоточится около 75% желтка зрелого ооцита *Xenopus* (рис. 22.23). Механизм такой транслокации пока остается неизвестным.

По мере отложения желтка расположение органелл также становится асимметричным. Из аппарата Гольджи формируются кортикальные гранулы; их положение сначала не упорядочено, и они рассеяны по всей цитоплазме ооцита, но затем мигрируют к периферии клетки. К этому времени приурочена

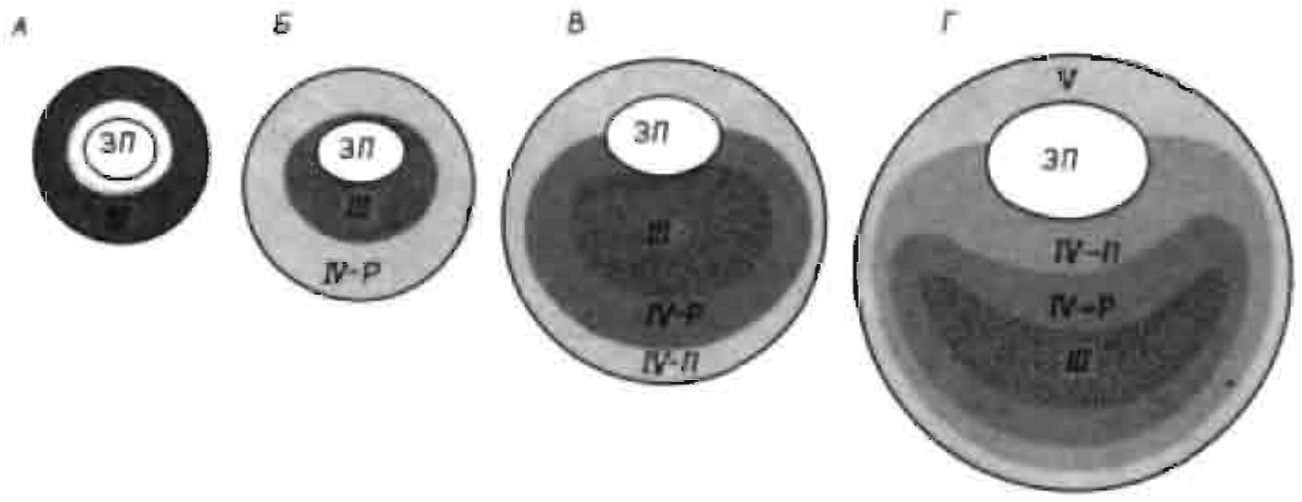


Рис. 22.23. Установление анимально-вегетативной полярности в распределении желточных пластинок в ооците *Xenopus*. *А*. У ооцитов поздней стадии III (600 мкм) желточные пластинки поступают в клетку равномерно по всей поверхности. По мере роста ооцита (*Б* – *В*) пластинки с будущего анимального полюса смещаются к вегетативному, а пластинки вегетативного полюса своего положения не меняют. Все больше желтка поступает в яйцо по всей площади поверхности. К концу вителлогенеза (*Г*) все наиболее ранние пластинки (III) оказываются в вегетативном полушарии, где теперь сосредоточено около 75% желтка ооцита. Время поступления желтка в пластинки ооцита обозначено разной интенсивностью серого цвета и римскими цифрами: *III* – пластинки стадии III; *IV-Р* – пластинки ранней стадии IV; *IV-П* – пластинки поздней стадии IV; *V* – пластинки стадии V. *ЗП* – зародышевый пузырек. (По Danilchik, Gerhart, 1987.)

репликация митохондрий; делясь, они дают начало миллионам этих органелл, которые будут во время дробления распределяться между разными клетками. (У *Xenopus* новые митохондрии не образуются до начала гаструляции.) Ближе к концу вителлогенеза цитоплазма ооцита становится стратифицированной (многослойной). Кортикальные гранулы, митохондрии и пигментные гранулы обнаруживаются на периферии клетки, образуя кортикальный слой ооцита. Во внутренней цитоплазме возникают четкие градиенты. Если желточные пластинки все более концентрируются у вегетативного полюса ооцита, то гликогеновые гранулы, рибосомы, митохондрии и эндоплазматический ретикулум обнаруживаются все ближе к анимальному полюсу. Даже специфические мРНК, запасенные в цитоплазме, локализуются в определенных местах ооцита (гл. 7).

Точный механизм установления этих градиентов пока неизвестен, однако использование ингибиторов позволяет заключить, что в локализации специфических мРНК и морфогенетических факторов важную роль играет цитоскелет. Было показано (Yisaeli et al., 1990), что Vg1-мРНК транслоцируется в вегетативный кортекс путем двухступенчатого процесса (см. рис. 7.9). Во время первой фазы для перемещения Vg1-мРНК в вегетативное полушарие необходимы микротрубочки. Во время второй фазы с помощью микрофиламентов происходит заякоривание Vg1-мРНК в кортексе.

У *Xenopus* стадия лептотены мейоза длится всего лишь 3–7 сут, зиготена занимает от 5 до 9 сут и пахитена продолжается около 3 нед. Стадия диплотены, однако, может длиться годы. Даже если это и так, вителлогенез занимает только часть диплотены, и сигнал к разрушению ядра (зародышевого пузырька) возникает лишь после завершения вителлогенеза. Регуляция этих событий контролируется гормональными взаимодействиями со стороны гипоталамуса, гипофиза и фолликулярных клеток яичника (рис. 22.24). Получив информацию о том, что брачный сезон уже начался, гипоталамус секретирует рилизинг-фактор гонадотропного гормона, воспринимаемый гипофизом. Гипофиз отвечает выделением гонадотропинов в кровь. Эти последние стимулируют фолликулярные клетки к секреции эстрогена, а эстроген инструктирует печень, которая начинает синтезировать и выделять вителлогенин. После стимуляции эстрогеном печеночные клетки резко изменяются (рис. 22.25). Эти изменения обычно наступают во время сезона спаривания, но если эстроген инъецировать взрослым лягушкам (неважно – самцам или самкам) в любое время года, то эти изменения произойдут и будет выделяться вителлогенин (Skipper, Hamilton, 1977).

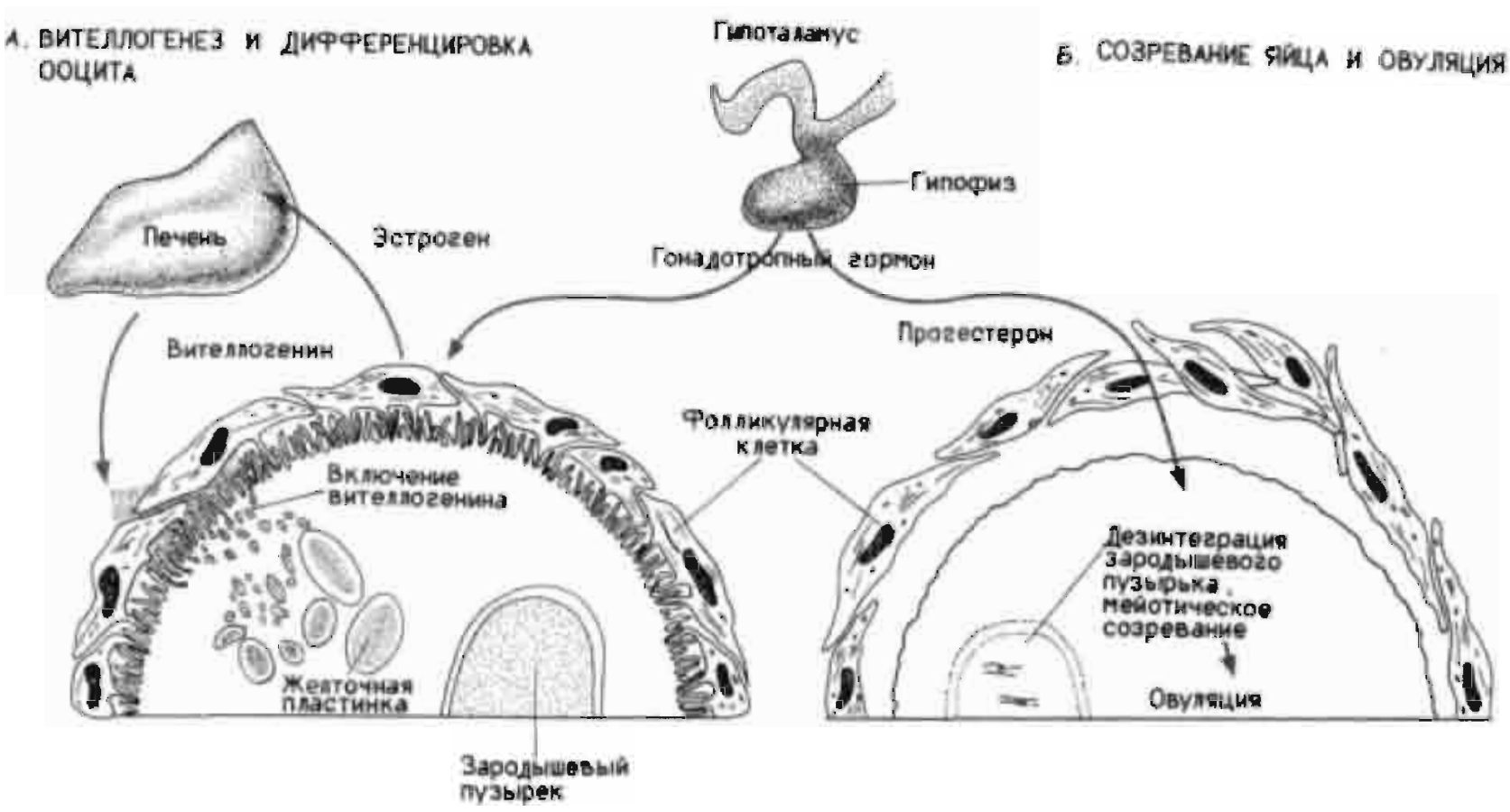


Рис. 22.24. Регуляция роста ооцита и созревания яйца у амфибий, осуществляемая с помощью эстрогена и прогестерона. *А*. Гонадотропный гормон стимулирует фолликулярные клетки к образованию эстрогена, который заставляет печень секретировать вителлогенин. Этот белок поглощается ооцитом. *Б*. После вителлогенеза под действием того же гонадотропного гормона фолликулярные клетки секретируют прогестерон. За 6 ч стимуляции прогестероном зародышевый пузырек дезинтегрируется, что служит началом событий, ведущих к овуляции. (По Browder, 1980.)

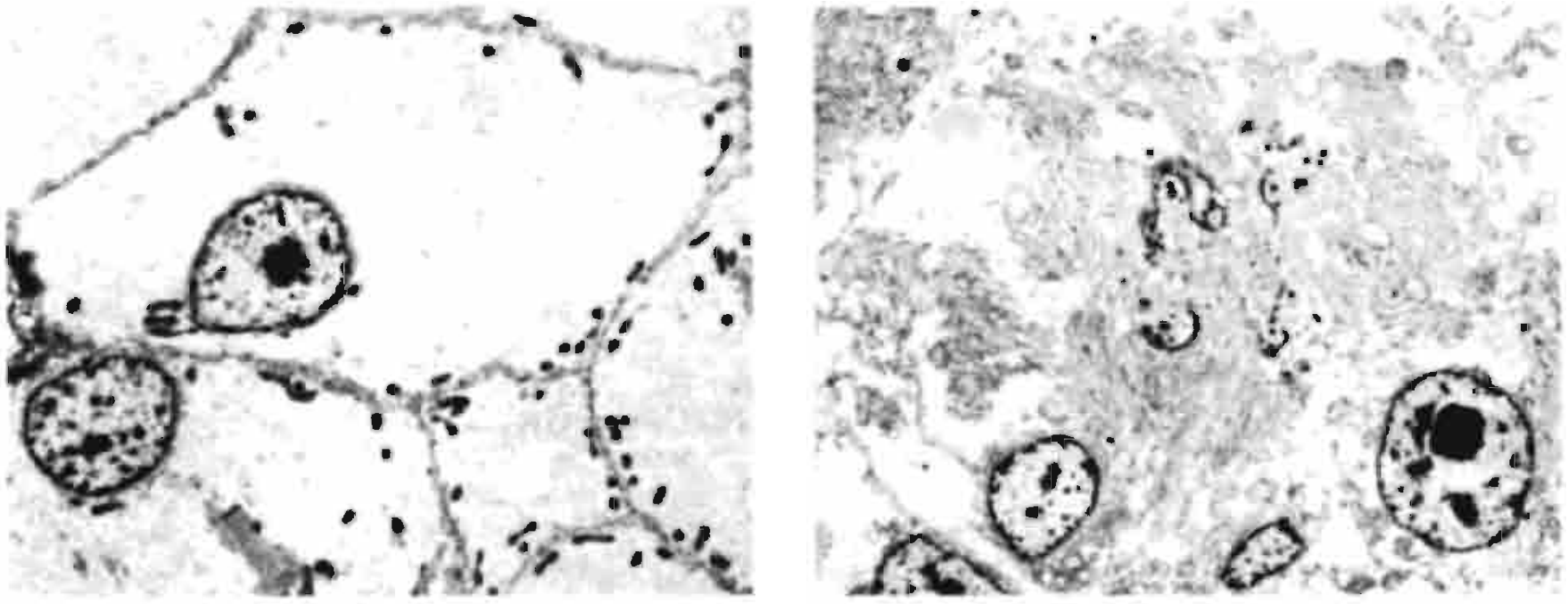


Рис. 22.25. Действие эстрогена (эстрадиола) на ультраструктуру печеночных клеток *Xenopus laevis*. *А*. Гепатоциты до инъекции эстрогена. *Б*. После инъекции эстрогена в гепатоцитах наблюдается мощное развитие гранулярного эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, необходимых для синтеза и секреции вителлогенина. (Из Skipper, Hamilton, 1977; фотографии с любезного разрешения авторов.)

Эстроген индуцирует вителлогенин и на уровне транскрипции, и на уровне трансляции. Перед выделением эстрогена в печени не выявляются мРНК вителлогенина. После введения гормона каждая клетка содержит около 50 000 молекул вителлогениновой мРНК, что составляет примерно половину общей клеточной мРНК. Транскрипционная активация генов вителлогенина в норме дала бы не более 1500 таких молекул мРНК на клетку. Кроме того, эстроген также специфически стабилизирует эти матрицы, каким-то образом продлевая время их полужизни с 16 ч до 3 нед. Поскольку этот эффект отмечен в отсутствие синтеза новых белков, он представляется прямым следствием воздействия эстрогена. Таким образом, эстроген контролирует накопление вителлогенина путем транскрипционной и трансляционной регуляции генов (Brock, Shapiro, 1983).

Блокирование мейоза и выход из блока

Ооциты амфибий могут годами оставаться на диплотенной стадии профазы мейоза. Для возобновления мейоза первичному ооциту амфибий требуется прогестерон. Этот гормон секретируется фолликулярными клетками в ответ на гонадотропные гормоны, выделяемые гипофизом. В течение 6 ч после стимуляции прогестероном происходит **дезинтеграция зародышевого пузырька** (ДИЗП), исчезновение микроворсинок, дезинтеграция ядрышек, сокращение и миграция хромосом типа ламповых щеток к анимальному полюсу, чтобы там разделиться. Вскоре после этого происходит первое деление мейоза, и зрелое яйцо выделяется из яичника в ходе процесса, называемого **овуляцией.** Овулировавшее яйцо находится в метафазе второго деления мейоза.

Каким образом прогестерон побуждает яйцо выйти из состояния покоя и возобновить мейоз? Чтобы понять механизм этой активации, необходимо кратко остановиться на модели деления ранних бластомеров, представленной в гл. 3. За возобновление мейоза отвечает фактор, стимулирующий созревание (ФСС). Он характеризуется циклической активностью, которая наиболее высока во время деления клетки и не выявляется в интерфазе. ФСС представляет собой протеинкиназу, регулируемую белком циклином. Трансляция циклина происходит во время интерфазы, а по окончании деления клетки он быстро разрушается. Циклин активирует ФСС. Если по окончании деления клетки циклин не разрушается, то ФСС сохраняет свою активность, и клетка блокируется в метафазе. Как только циклин разрушится, ФСС становится неактивным, и клетка возвращается в интерфазу. Масуи (Masui, 1974) обнаружил, что цитоплазма овулировавшего яйца амфибий может вызывать задержку деления других клеток в метафазе. Этот автор пришел к заключению, что цитоплазма овулировавших яиц содержит **цитостатический фактор** (CSF), блокирующий деление клетки в метафазе.

Цитостатический фактор сравнительно недавно был выделен. Результаты, полученные в работе Сагаты и др. (Sagata et al., 1988), свидетельствуют о том, что прогестерон стимулирует мейоз благодаря тому, что вынуждает ооцит транслировать осо-

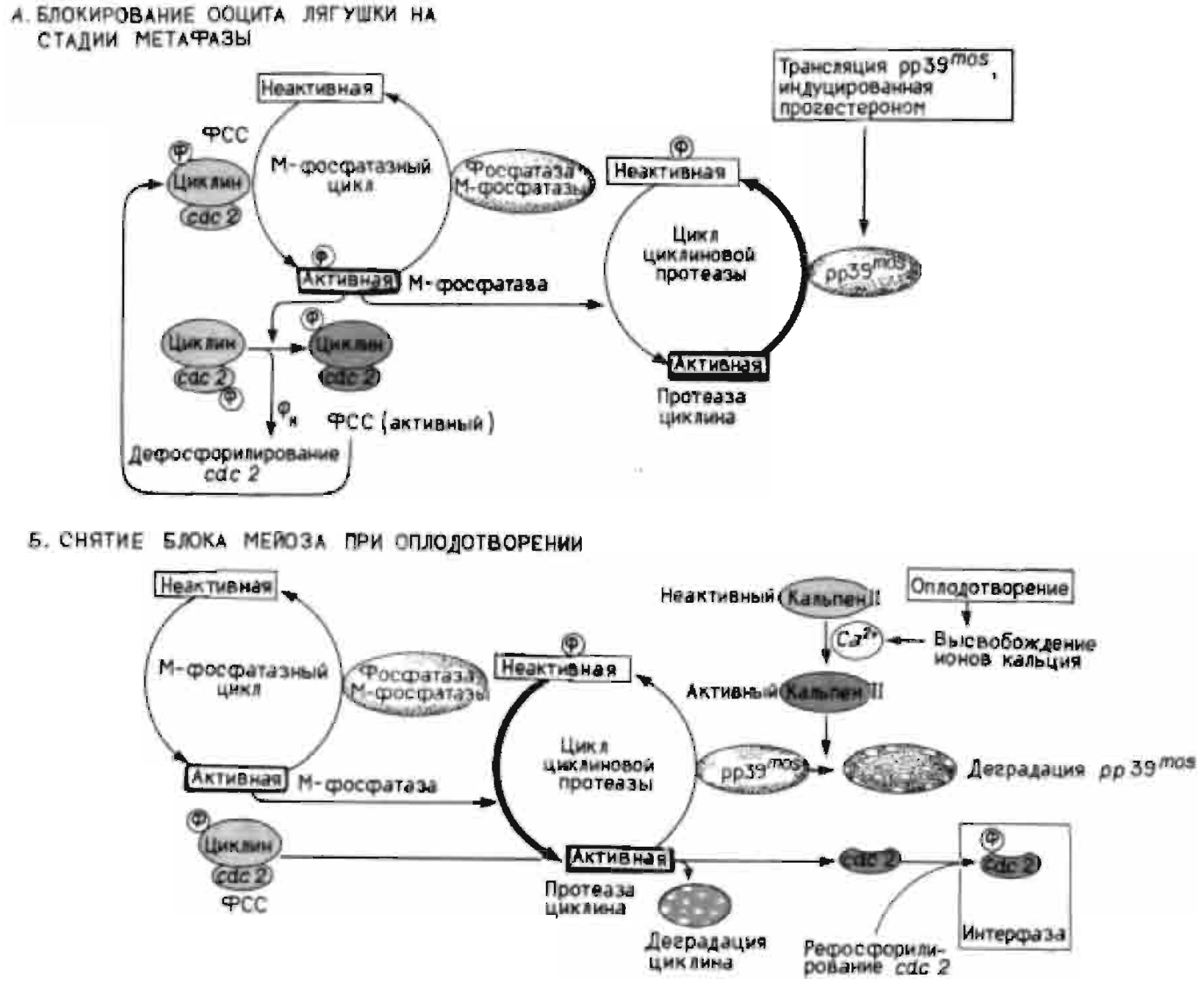


Рис. 22.26. Гипотетическая модель регуляции блока мейоза в ооцитах лягушки и выхода из блока при оплодотворении. *А*. Во время метафазы мейоза прогестерон индуцирует трансляцию белка $pp39^{mos}$ (правая часть схемы). Это инактивирует протеазу циклина, что предотвращает деградацию циклина. Циклин остается связанным с белком cdc-2, и ФСС сохраняет активность. В результате клетка задерживается в метафазе. *Б*. При оплодотворении высвобождаются ионы кальция, активирующие кальпен II – протеазу, специфически расщепляющую $pp39^{mos}$. Деградация $pp39^{mos}$ приводит к тому, что протеаза циклина активируется М-фосфатазой. Следствием этой активации оказывается деградация циклина и инактивация ФСС. Клетка возвращается в интерфазу. Таким образом, представляется вероятным, что клеточная регуляция осуществляется по плану Руба Гольдберга. (По Hunt, 1989.)

бую материнскую мРНК, хранящуюся в цитоплазме. Эта запасенная матрица кодируется протоонкогеном *mos*[1] и транслируется в фосфопротеин **$pp39^{mos}$** с молекулярной массой 39 000 дальтон. Этот белок выявляется только при созревании ооцита и быстро разрушается после оплодотворения. За это краткое время своего существования он выполняет важнейшую роль в пробуждении яйца. Если трансляцию $pp39^{mos}$ ингибировать (инъецировав в ооцит несмысловую мРНК *mos*), то $pp39^{mos}$ не образуется, дезинтеграции зародышевого пузырька не происходит и процесс созревания ооцита не возобновляется. Стимулировав реинициацию мейоза, он затем удерживает хромосомы в метафазе до оплодотворения. В последующих экспериментах было показано, что если в один из двух первых бластомеров только что разделившегося яйца лягушки инъецировать мРНК *c-mos*, то инъецированный бластомер приостановит митоз на стадии метафазы (Sagata et al., 1989). Более того, если антитела к белку $pp39^{mos}$ инкубировали с гомогенатами яиц лягушки, то эти гомогенаты утрачивали свою CSF-активность. Следовательно, CSF – это, по всей вероятности, короткоживущий белок $pp39^{mos}$.

Следующий вопрос касается механизма, с помощью которого $pp39^{mos}$ и циклин вызывают возобновление мейоза и его остановку в метафазе.

[1] У *Xenopus* это клеточный гомолог вирусного онкогена вируса мышиной саркомы Молони – *v-mos* (гл. 20).

Основное теоретическое предположение заключается в том, что белок pp39^{mos} действует посредством ингибирования деградации циклинового компонента ФСС. Полагают, что это осуществляется посредством фосфорилирования специфической протеазы, которая в противном случае вызывала бы деградацию циклина. Если циклин не будет деградировать, то ФСС стабилизируется (рис. 22.26). В результате клетка вступает в метафазу, и до тех пор пока ФСС не будет разрушен, она останется в метафазе.

Деградация ФСС происходит при оплодотворении и связана с деградацией белка pp39^{mos}. Но каким образом последний деградирует при оплодотворении? По-видимому, это происходит в результате активации протеазы, специфически расщепляющей pp39^{mos} (Watanabe et al., 1989). Во время оплодотворения из эндоплазматического ретикулума высвобождаются ионы кальция, активирующие Ca^{2+}-зависимую протеазу кальпен II, которая специфически воздействует на pp39^{mos}. На рис. 22.27 показано увеличение концентрации pp39^{mos} после получения прогестерона и ее быстрое снижение при активации кальпена II. Так, полагают, происходит возобновление мейоза под действием прогестерона и завершение его при оплодотворении.

Транскрипция генов в ооцитах

Изменения в транскрипции генов ооцита мы уже обсуждали (см. гл. 11 и 12). Характер транскрипции рРНК и тРНК представлен на рис. 22.28. Транскрипция начинается в раннем (стадия I; 25–40 мкм) ооците на стадии диплотены мейоза. В это время транскрибируются все рибосомные и транспортные РНК, необходимые для синтеза белка вплоть до наступления стадии средней бластулы, а также вся материнская мРНК, предназначенная для раннего развития зародыша. У *Xenopus* эта стадия длится месяцами. По достижении определенных размеров хромосомы зрелого (стадия VI) ооцита конденсируются, и активная транскрипция прекращается. Состояние «зрелого ооцита» также продолжается месяцами. После гормональной стимуляции первое деление мейоза завершается, и происходит овуляция. мРНК, запасенные ооцитом, соединяются с рибосомами для инициации синтеза белка. В течение нескольких часов начинается второе деление мейоза, и происходит оплодотворение вторичного ооцита. Активная транскрипция генов не начнется до стадии средней бластулы (Davidson, 1986).

В отличие от ситуации у морских ежей, размеры и сложность ооцитных популяций мРНК у которых возрастают по мере созревания ооцита (Hough-Evans et al., 1977), размеры и сложность ооцитных популяций мРНК у лягушки остаются относительно постоянными (Perlman, Rosbash, 1978; Dolecki, Smith, 1979). Увеличение размеров, по-видимому, сбалансировано процессом деградации даже на стадии ламповых щеток. Кроме того, прогестерон инициирует в цитоплазме ооцита трансляцию запасенных мРНК. Итак, если у морского ежа трансляция материнских матриц инициируется оплодотворени-

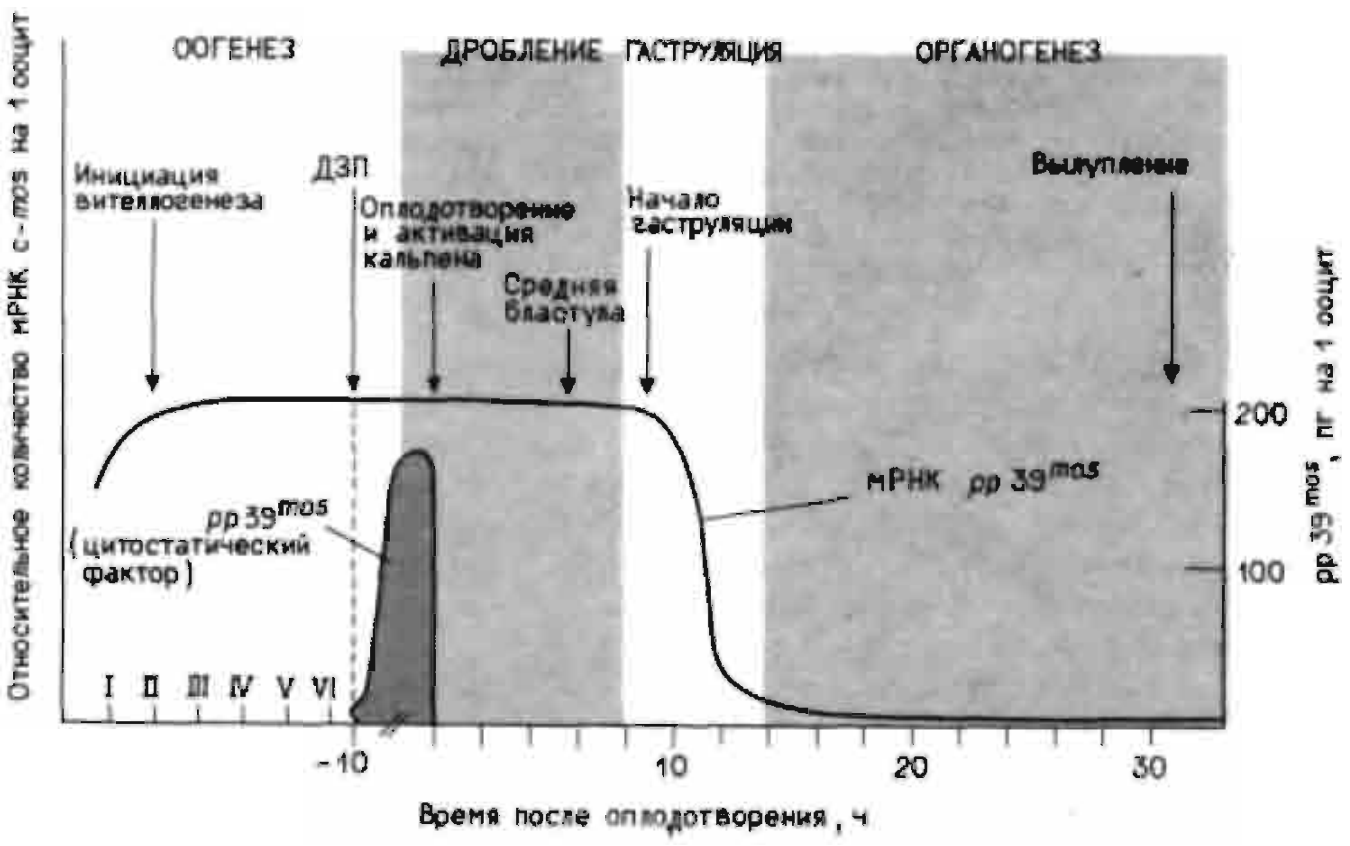


Рис. 22.27. Экспрессия мРНК *c-mos*, pp39^{mos} и кальпена II в ходе раннего развития *Xenopus laevis*. (По Watanabe et al., 1989.)



Рис. 22.28. Относительные скорости синтеза ДНК, тРНК и рибосомных РНК во время оогенеза у амфибий в течение последних трех месяцев перед овуляцией. (Из Gurdon, 1976.)

ем, то у лягушки эта трансляция инициируется прогестероном незадолго до овуляции.

Было показано (Fox et al., 1989), что, как и в случае некоторых сперматических матриц, некоторые мРНК ооцита лягушки могут быть активированы путем добавления поли(А)-остатков к их 3'-концам. Вскоре после индуцированного прогестероном разрушения зародышевого пузырька набор цитоплазматических мРНК получает фрагменты поли(А) длиной от 50 до 300 оснований. Затем эти матрицы транслируются и деградируют. Сигнал к присоединению поли(А) представляет собой *а*) добавление канонической последовательности поли(А) ААУААА и *б*) специфическую последовательность УУУУУАУ в нетранслируемой 3'-области. Эта последовательность может сообщить любой матрице способность стать полиаденилированной и транслироваться при созревании ооцита, индуцированном прогестероном. Подобная ситуация может иметь место и при созревании яиц млекопитающих. Матрица для активатора плазминогена – протеазы, вероятно обусловливающей высвобождение яйца млекопитающих при овуляции, – сохраняется в нетранслируемом состоянии у первичных ооцитов с блокированным мейозом. При возобновлении мейоза 3'-конец этой мРНК полиаденилируется и матрица начинает транслироваться (Vassalli et al., 1989).

Мероистический оогенез у насекомых

Для некоторых насекомых характерен **мероистический** оогенез, при котором между клетками, продуцируемыми оогонием, сохраняются цитоплазматические мостики. У *Drosophila* каждый оогоний в результате четырех делений дает клон из 16 клеток, связанных друг с другом **кольцевыми каналами**. Образование таких взаимосвязанных клеток (называемых **цистоцитами**) предполагает высокую степень упорядоченности клеточных делений (рис. 22.29). Превратиться в ооцит могут только две клетки, а именно те, которые имеют четыре цитоплазматических мостика; однако и из этих двух клеток в ооцит превращается лишь одна, в другой мейоз начинается, но до конца не доходит. Таким образом, из 16 цистоцитов яйцом становится только один. Все остальные клетки превращаются в **питающие**. Будущим ооцитом оказывается клетка, занимающая задний конец яйцевой камеры, в которой заключен 16-клеточный клон.

Ооциты мероистических насекомых не проходят стадии активной транскрипции, и у них не образуются хромосомы типа ламповых щеток. Данные радиоавтографии свидетельствуют о том, что синтез РНК происходит главным образом в питающих клетках, из которых она активно транспортируется в цитоплазму ооцита. Это можно видеть на рис. 22.30. Если яйцевые камеры комнатной мухи инкубировать с радиоактивным цитидином, то ядра питающих клеток будут интенсивно включать метку. После переноса клеток на нерадиоактивную среду и последующей инкубации их в этой среде в течение 5 ч можно наблюдать, как меченая РНК из питающих клеток переходит в ооцит (Bier, 1963). Оогенез длится всего лишь 12 сут, следовательно, в это время питающие клетки должны иметь очень высокую метаболическую активность. Их транскрипционная эффективность достигается благодаря тому, что они становятся политенными. Вместо двух копий каждой хромосомы в результате последовательных репликаций образуется 512 копий. Известно, что из 15 питающих клеток в цитоплазму ооцита поступает и матричная, и рибосомная РНК, а также целые рибосомы. мРНК не связываются с полисомами, а это предполагает, что они не

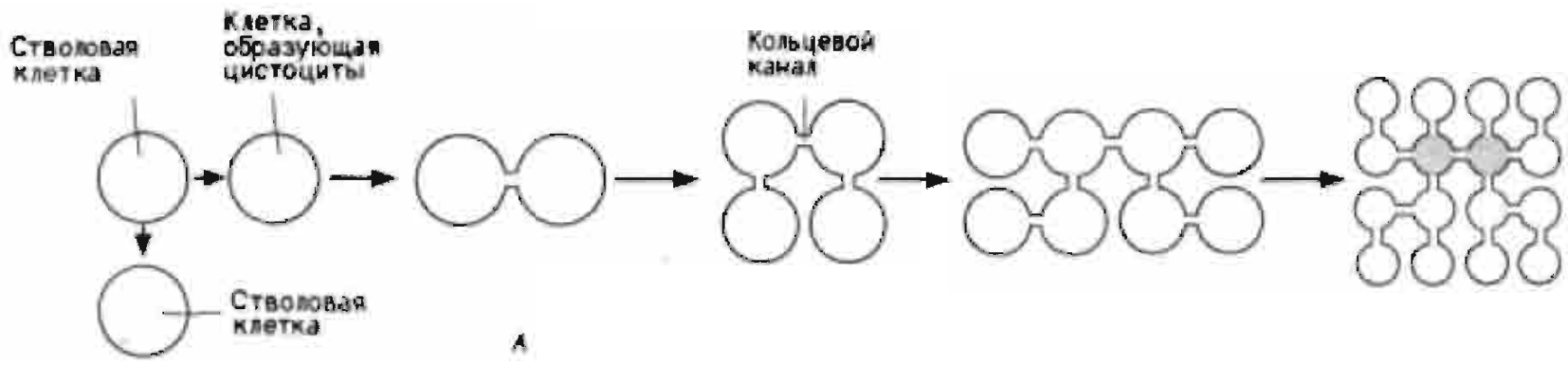


Рис. 22.29. Формирование 16 взаимосвязанных цистоцитов у *Drosophila*. *А*. Клетки представлены схематически так, как если бы они делились в одной плоскости. Стволовая клетка делится с образованием другой стволовой клетки и клетки, коммитированной к образованию цистоцитов. Только один из 16 цистоцитов станет ооцитом, другие будут питающими клетками, соединенными с ооцитом кольцевыми каналами (цитоплазматическими мостиками). *Б*. Трехмерное изображение ооцита и 15 питающих его клеток. (А – по Koch et al., 1967.)

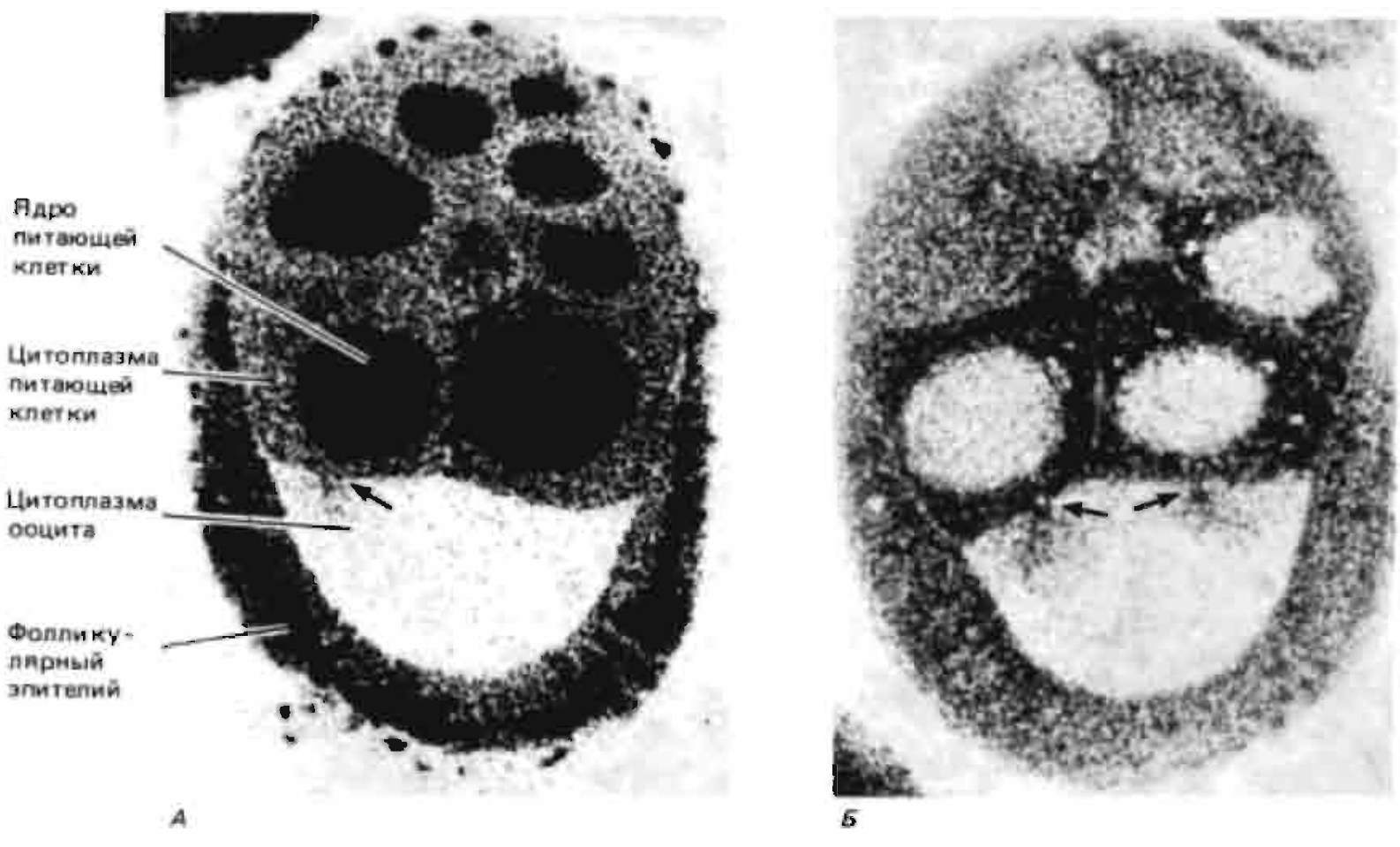




Рис. 22.30. Транспорт мРНК из питающих клеток в ооциты мухи. *А–Б*. Радиоавтографы фолликулярной клетки комнатной мухи (*Musca domestica*) после инкубации с ^{3}H-цитидином. *А*. Яйцевая камера, фиксированная сразу после введения метки. Ядра питающих клеток интенсивно метятся, что свидетельствует о синтезе в них новой РНК. Ооцит остается немеченым, за исключением того места, куда через цитоплазматический мостик (*стрелка*) попадает некоторое количество РНК из питающей клетки. *Б*. Такая же яйцевая камера, фиксированная спустя 5 ч. Метка вышла из ядер питающих клеток в цитоплазму. Более того, можно видеть, что радиоактивная РНК проходит в цитоплазму ооцита через два канала между ооцитом и питающими клетками. *В*. Радиоавтограф яйцевой камеры *Drosophila* (стрелка), окрашенной радиоактивным зондом к мРНК гена *bicoid*. Эта матрица транспортируется из питающей клетки (*слева*) и остается на переднем конце ооцита (меньший более темный овал). (*А*, *Б* – из Bier, 1963; с любезного разрешения D. Ribbert; *В* – из Stephanson et al., 1988; с любезного разрешения E. C. Stephanson.)

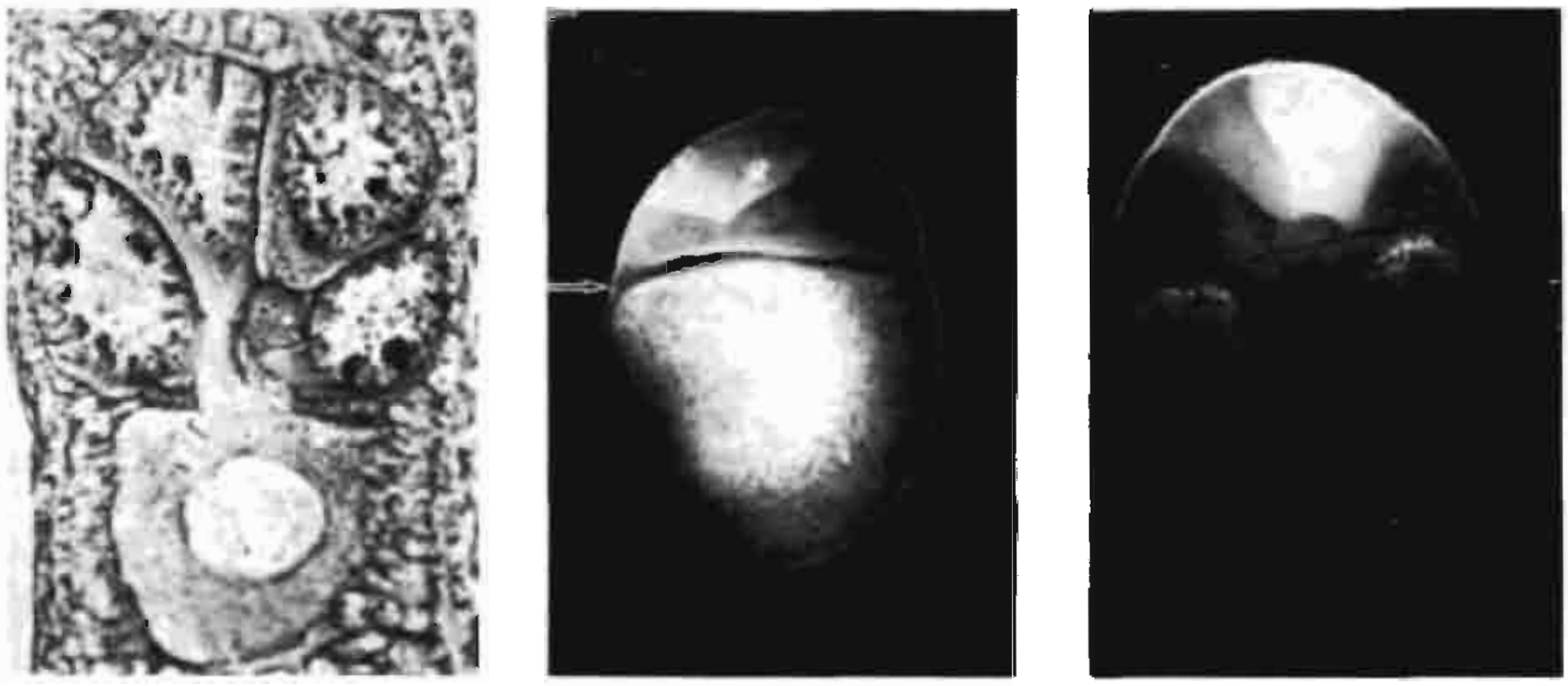


Рис. 22.31. Направленное перемещение макромолекул в клетках яйцевой камеры. *А.* Яйцевая камера бабочки *Hyalophora cecropia* с ооцитом и четырьмя питающими клетками. Срез прошел так, что виден мостик, соединяющий одну из питающих клеток с ооцитом. *Б.* Флуоресцентная микрофотография ранней вителлогенной яйцевой камеры, фиксированной через 1 ч после того, как в одну из питающих клеток был инъецирован метилкарбоксилированный и меченный флуоресцеином лизоцим. Модифицированный таким образом белок проходит через межклеточный мостик в ооцит (*стрелка*). *В.* То же самое, что и на *Б*, но в питающую клетку была инъецирована основная форма меченного флуоресцеином лизоцима (неметилкарбоксилированная). Белок в ооцит не транспортируется. (Из Telfer et al., 1981; фотографии с любезного разрешения W. H. Telfer.)

принимают немедленного участия в синтезе белка (Paglia et al., 1976; Telfer et al., 1981).

Мероистический яичник ставит нас перед рядом интересных проблем. Если все его клетки соединены таким образом, что белки и РНК могут свободно перемещаться между ними, то чем объяснить их различную судьбу в ходе развития? Почему одна клетка должна стать ооцитом, а другие – «синтезирующими РНК фабриками»? Почему поток белков и РНК происходит лишь в одном направлении? Один из возможных ответов на эти вопросы заключается в том, что в яйцевой камере существует электрический градиент, препятствующий диффузии одних молекул и облегчающий диффузию других. Некоторыми авторами (Woodruff, Telfer, 1980; Woodruff R. I. et al., 1988) было показано, что такой градиент действительно существует и что он ингибирует движение большей части белков, облегчая направленное движение кислых макромолекул. Такой «электрофорез in vivo» представлен на рис. 22.31. Если в кислый фермент ввести флуоресцирующую метку и инъецировать этот фермент в питающие клетки, то можно видеть, что белок мигрирует из питающей клетки в цитоплазму ооцита. Но если тот же самый меченый белок посредством небольших химических модификаций сделать основным, то он останется в той питающей клетке, в которую был инъецирован. Таким образом, свободного обмена регуляторными молекулами между взаимосвязанными клетками не происходит, а некоторые белки и нуклеиновые кислоты характеризуются однонаправленным транспортом.

Три основных желточных белка дрозофилы образуются не в ооците, а в жировом теле и яичнике (Bownes, 1982; Brennen et al., 1982). Известно, что гормональный контроль над синтезом желтка осуществляется ювенильным гормоном эклизоном и нейросекреторным гормоном мозга. Полагают, что гормон мозга в ответ на сигнал со стороны среды обитания [1] стимулирует corpora allata к секреции ювенильного гормона (рис. 22.32). Ювенильный гормон 1) регулирует поглощение желточных пептидов на поверхности ооцита; 2) стимулирует синтез белков желтка в яичнике (последние идентичны тем, которые образуются в жировом теле) и 3) заставляет фолликулы яичника и другие абдоминальные

[1] Таким сигналом для *Drosophila* служит, по-видимому, фотопериод. Для обычного комара – это насыщение кровью жертвы. Кусаются только самки комара, которые не производят вителлогенина, пока не примут определенную дозу пищи. Некий фактор крови стимулирует мозг комара к высвобождению ювенильного гормона и фактора, стимулирующего corpus cardiacum. Этот последний фактор вызывает выделение нейросекреторного гормона, регулирующего развитие яйца (НГРЯ). НГРЯ стимулирует яичник к секреции эклизона, который совместно с ювенильным гормоном заставляет жировое тело синтезировать вителлогенин (Hagedorn, 1983; Borovsk et al., 1990).

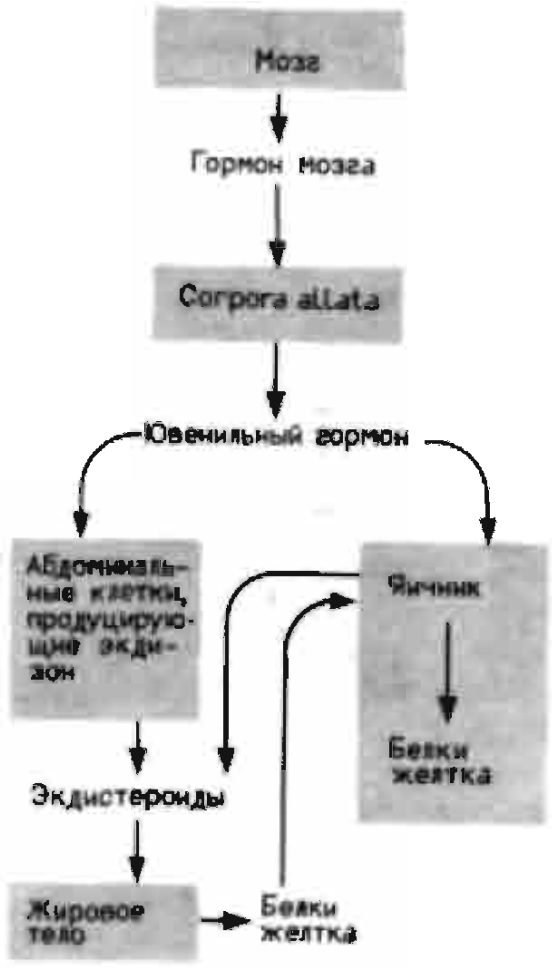


Рис. 22.32. Схема гормональной регуляции синтеза белков желтка у *Drosophila melanogaster*. В ответ на гормон, выделяемый мозгом, прилежащие тела (corpora allata) продуцируют ювенильный гормон (ЮГ), который стимулирует яичник к синтезу белков желтка и экдистероидов. Кроме того, ЮГ индуцирует экдистероидный синтез в абдоминальных клетках. Экдистероиды стимулируют жировое тело к синтезу белков желтка, которые транспортируются в яичник. (По Bownes, 1982.)

клетки секретировать экдизон. Экдизон, превращаясь в активную форму – 20-гидроксиэкдизон, – стимулирует жировое тело к образованию белков желтка точно так же и с тем же результатом, что эстрадиол, стимулирующий печень у амфибий. Сходным образом введение экдизона взрослым самцам приводит к тому, что в их жировых телах будут секретироваться белки желтка (Postlethwait et al., 1980). Хотя желток в яйцах дрозофилы занимает центральное положение, для них также характерна полярность. Как уже обсуждалось ранее (гл. 7 и 18), переднезадняя ось зародыша создается распределением материнских продуктов в цитоплазме ооцита. Например, ген *bicoid* должен экспрессироваться у матери для того, чтобы ее потомство имело головы. (У потомства, полученного от матерей, не имеющих этого гена, на обоих концах развиваются хвосты.) Ген *bicoid* транскрибируется в ходе оогенеза питающими клетками и его мРНК накапливается на переднем конце ооцита (рис. 22.30, *B*; Frigerio et al., 1986; Stephanson et al., 1988). Утечка некоторого количества цитоплазмы из переднего конца яиц дикого типа приводит к развитию зародышей с редуцированными головными структурами.

Приняв факт существования такой полярности у яиц *Drosophila*, мы останавливаемся перед следующими вопросами: каким образом поддерживается эта полярность? Что препятствует матрицам *bicoid* диффундировать по всему ооциту? Что заставляет компоненты полярных гранул локализоваться у заднего конца? В *bicoid*-мРНК присутствует компонент *cis*-бикоидной локализации. По-видимому, *bicoid*-мРНК связывается с передними компонентами яйца посредством своей 3′-нетранслируемой области. Этот конец матрицы путем спаривания оснований замыкается на себя с образованием характерной вторичной структуры. Если эту последовательность придать другим мРНК, то они также будут локализованы на переднем полюсе яйца *Drosophila* (MacDonald, 1990).

Кроме того, было показано (Fröhnhöfer, Nüsslein-Volhard, 1987; Manseau, Schübach, 1989), что два других материнских гена – *swallow* и *exuperantia* – необходимы для удержания *bicoid*-мРНК у переднего полюса, а полярные гранулы – у заднего. Эти гены отвечают за *trans*-компоненты бикоидной локализации. У яиц, образованных матерями, несущими любую из этих мутаций, *bicoid*-мРНК смещаются ближе к заднему концу яйца, а продукт гена *vasa* – компонент полярных гранул – не локализуется у заднего конца. Яичник *Drosophila* должен не только производить цитоплазматически поляризованный продукт, но и синтезировать некоторые компоненты ооцита, обеспечивающие эту полярность.

Оогенез у человека

Созревание яиц и овуляция у млекопитающих следуют по одному из двух основных путей в зависимости от вида животного. Овуляция первого типа стимулируется самим физическим актом спаривания. Физическое раздражение шейки матки вызывает выделение гонадотропинов из гипофиза. Эти гонадотропины служат сигналом для яиц, которые в ответ на него возобновляют мейоз и инициируют события, ведущие к выделению яйца из яичника. Такой способ гарантирует то, что бóльшая часть копуляций завершится оплодотворением яйца, а животные, для которых характерен этот способ овуляции – кролики и норки, – известны своим замечательным репродуктивным успехом.

У большинства млекопитающих, однако, овуляция характеризуется периодичностью, т. е. происходит лишь в определенное время года; этот период называют **эструсом** (или «охотой»). Определенные факторы среды – обычно интенсивность и характер освещенности в течение дня – служат сигналом для гипоталамуса, который выделяет рилизинг-фактор

гонадотропинов. Этот фактор стимулирует гипофиз к секреции гонадотропинов – фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ). Гонадотропины обеспечивают пролиферацию фолликулярных клеток и секрецию эстрогена. Эстроген в свою очередь связывается с определенными нейронами, вызывая комплекс реакций брачного поведения, характерного для вида. Гонадотропины стимулируют также рост фолликула и инициируют овуляцию. Таким образом, эструс и овуляция происходят почти одновременно.

Овуляция у человека – это один из вариантов периодической овуляции. И хотя у женщин происходит циклическая овуляция (цикл составляет в среднем около 29,5 дней) без эструса, приуроченного к определенному сезону, репродуктивная физиология человека имеет много общего с другими приматами. Характерный для приматов периодический цикл в созревании и выделении яйцеклетки называется **менструальным циклом**, завершающимся выделением из матки крови и клеточного дебриса. Менструальный цикл представляет собой интеграцию трех очень различных событий: 1) овариального цикла, связанного с созреванием и выделением ооцита; 2) маточного цикла, функция которого заключается в обеспечении необходимых условий для имплантации бластоцисты и 3) цервикального цикла, функция которого связана с обеспечением условий, позволяющих спермиям проникнуть в женский половой путь только в определенное время. Все эти три функции интегрированы посредством гормонов гипофиза, гипоталамуса и яичника.

Бо́льшая часть ооцитов в зрелом яичнике женщины блокирована на чрезвычайно продолжительной стадии диплотены профазы первого деления мейоза (часто называемой **диктиатной** стадией). Каждый ооцит заключен в **первичном фолликуле**, состоящем из одного слоя эпителиальных **клеток грануле́зы** и менее организованного слоя мезенхимных **клеток теки** (рис. 22.33). Периодически та или иная группа первичных фолликулов вступает в стадию фолликулярного роста. За время этой стадии объем ооцита увеличивается в 500 раз (что соответствует увеличению его диаметра от 10 мкм у пер-

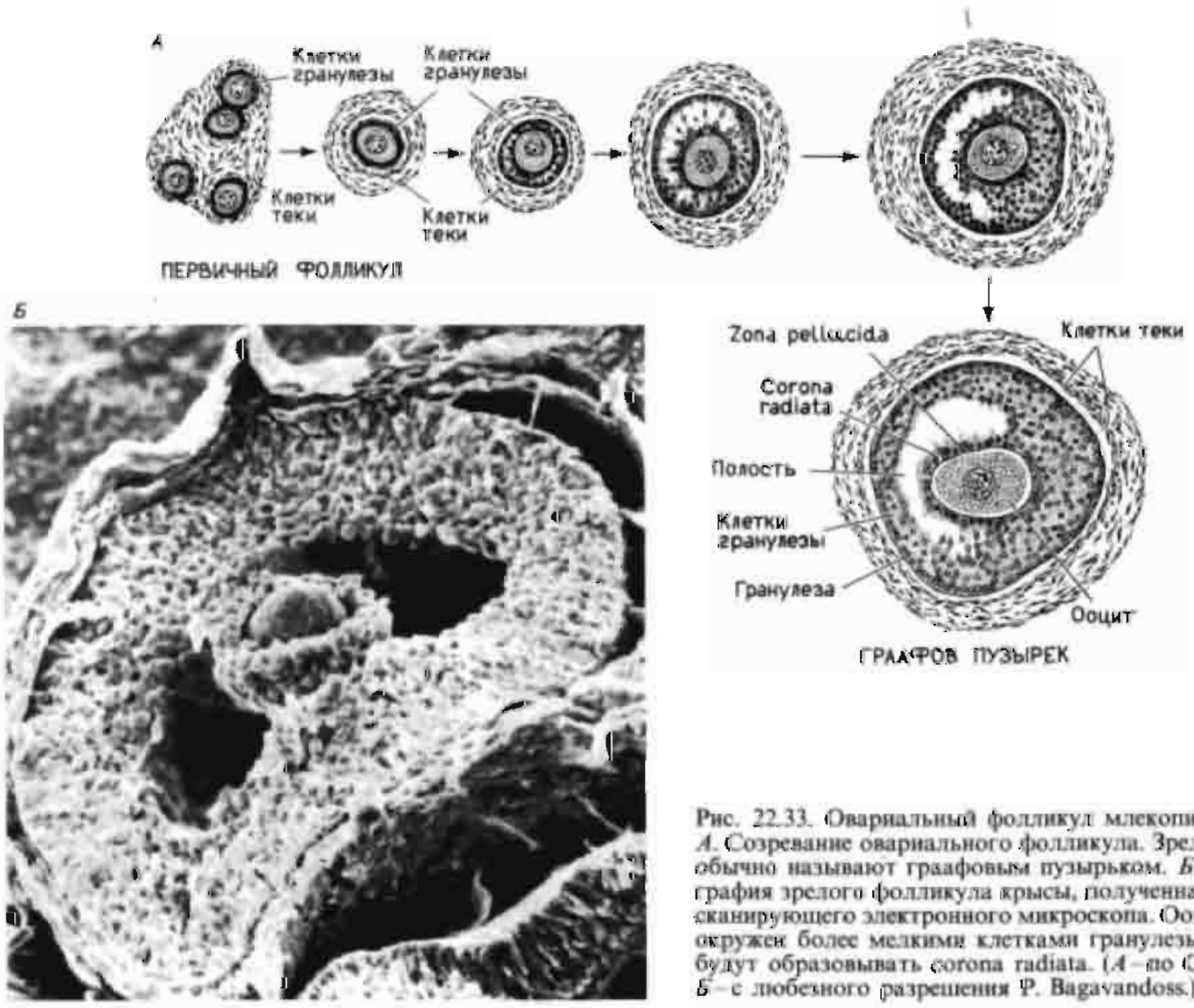


Рис. 22.33. Овариальный фолликул млекопитающих.
А. Созревание овариального фолликула. Зрелый фолликул обычно называют граафовым пузырьком. *Б*. Микрофотография зрелого фолликула крысы, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Ооцит (*в центре*) окружен более мелкими клетками гранулезы, которые будут образовывать corona radiata. (*А* – по Carlson, 1981; *Б* – с любезного разрешения P. Bagavandoss.)

вичного фолликула до 80 мкм у полностью сформированного фолликула). Рост ооцита сопровождается увеличением числа клеток гранулезы фолликула, образующих вокруг ооцита концентрические слои. В течение всего этого периода роста ооцит остается блокированным на диктиатной стадии. Завершивший рост фолликул содержит, таким образом, крупный ооцит, окруженный несколькими слоями клеток гранулезы. Многие из них сохраняются на овулировавшей яйцеклетке, где образуют **кумулюс**, окружающий яйцо в яйцеводе. Кроме того, в процессе роста фолликула формируется **антрум** (полость), которая заполняется смесью белков, гормонов, цАМФ и других молекул. В любой данный момент созревает небольшая группа фолликулов. Однако по прошествии некоторого периода развития бóльшая часть ооцитов вместе с заключающими их фолликулами погибает. Для того чтобы выжить, фолликул должен иметь источник гонадотропных гормонов – оказавшись «на волне», он должен удержаться на ее гребне. Иначе говоря, для того чтобы произошло созревание ооцита, фолликулы должны находиться на определенной стадии развития к тому времени, когда поднимется волна гонадотропина.

День 1 менструального цикла считается первым днем «кровотечения» (рис. 22.34). Это кровотечение из влагалища представляет собой отторжение поверхностной ткани и кровеносных сосудов матки, которые должны были способствовать имплантации бластоцисты. Во время первой части цикла (называемой **пролиферативной** или **фолликулярной** фазой) гипофиз начинает секретировать все возрастающие количества ФСГ. Группа созревающих фолликулов, которая уже прошла определенный путь развития, отвечает на гормон дальнейшим ростом и пролиферацией клеток. Кроме того, ФСГ индуцирует образование рецепторов ЛГ на клетках гранулезы. Вскоре после периода начального роста фолликула в гипофизе начинается секреция ЛГ, который снимает блок мейоза. Ядерные мембраны компетентных ооцитов дезинтегрируются, и ансамбли хромосом вступают в первое деление мейоза. Один из наборов хромосом остается внутри ооцита, а другой попадает в небольшое полярное тельце. Оба остаются

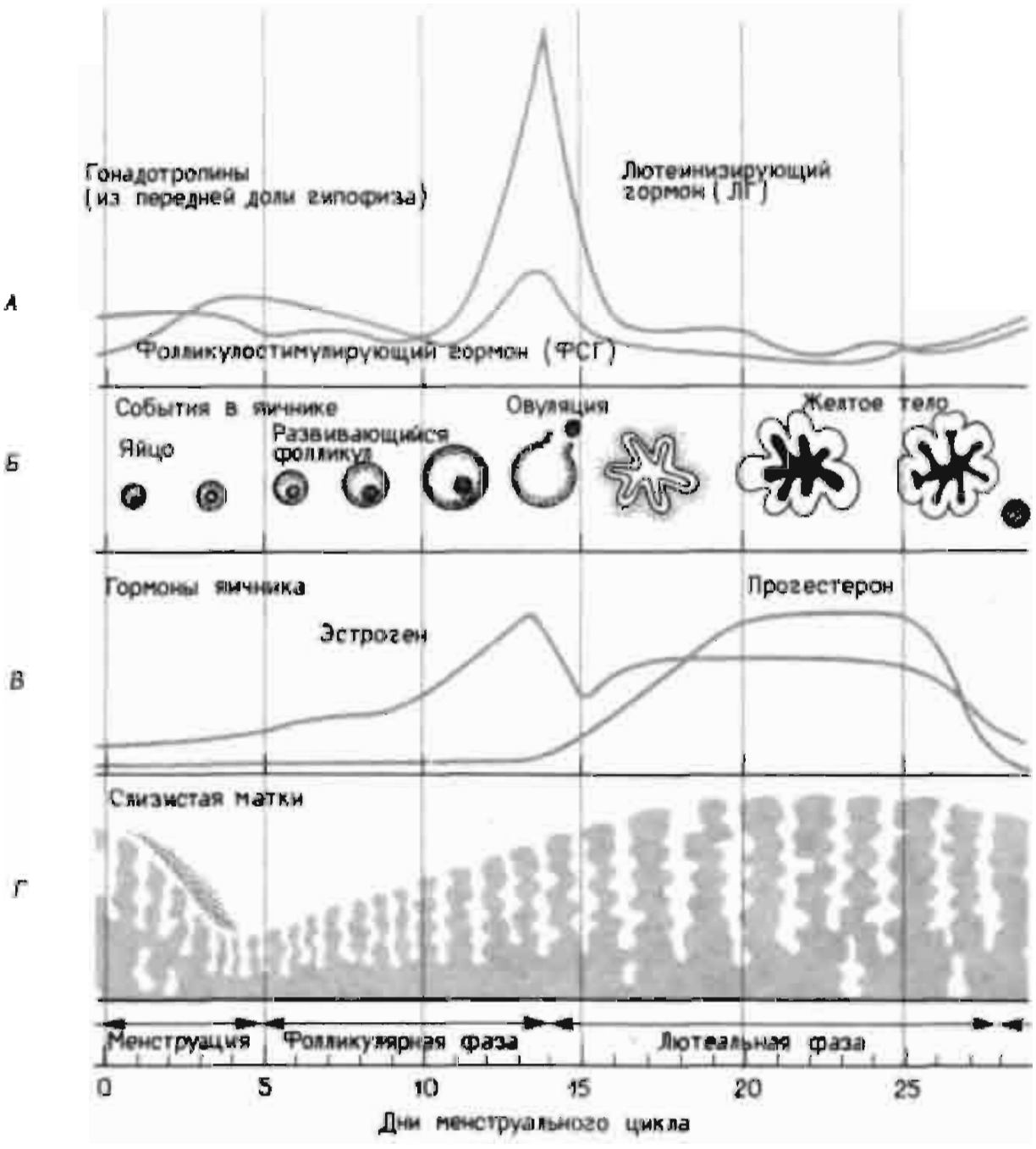


Рис. 22.34. Менструальный цикл человека. Циклы овариальный (*Б*) и маточный (*Г*) координируются гормонами гипофиза (*А*) и яичника (*В*). Во время фолликулярной фазы происходит созревание яйцеклетки внутри фолликула, а слизистая матки подготавливается к восприятию зародыша. Зрелое яйцо высвобождается примерно на четырнадцатые сутки. Если яйцеклетка не имплантируется, то начинается процесс отторжения стенки матки, ведущий к менструации.

в пределах блестящей оболочки (zona pellucida), синтезированной растущим ооцитом. Именно на этой стадии происходит овуляция.

Оба гонадотропина, действуя совместно, стимулируют фолликулярные клетки к синтезу все возрастающих количеств эстрогена, который регулирует дальнейший ход менструального цикла, выполняя при этом по меньшей мере пять основных функций.

1. Он вызывает пролиферацию слизистой матки и обогащение ее кровеносными сосудами.
2. Он разжижает слизь шейки матки, облегчая проникновение спермиев в глубь половых путей.
3. Он стимулирует увеличение числа рецепторов ФСГ на клетках гранулезы фолликула (Kammerman, Ross, 1975), в то же время заставляя гипофиз снизить продукцию ФСГ. Помимо этого, он стимулирует клетки гранулезы к секреции пептидного гормона ингибина, который также подавляет секрецию ФСГ гипофизом (River et al., 1986; Woodruff et al., 1988).
4. В низких концентрациях он ингибирует образование ЛГ, а в высоких – стимулирует его.
5. В *очень высоких концентрациях* и *при длительном* воздействии эстроген взаимодействует с гипоталамусом, заставляя его секретировать рилизинг-фактор гонадотропинов.

Таким образом, по мере того как в результате активности фолликулов повышается уровень эстрогена, уровень ФСГ снижается. Пока синтезируется эстроген (дни 7–10), клетки гранулезы продолжают расти. Начиная с дня 10 секреция эстрогена резко повышается. Это повышение сопровождается в середине цикла исключительно высоким всплеском выделения ЛГ и меньшим подъемом синтеза ФСГ. Результаты экспериментов на самках обезьян показали, что воздействие на гипоталамус эстрогена в дозах, превышающих 200 пг · мл$^{-1}$ крови дольше 50 ч приводит к секреции гипоталамусом рилизинг-фактора гонадотропинов. Этот фактор в свою очередь стимулирует выделение гипофизом ФСГ и ЛГ. В течение 10–12 ч после пика секреции гонадотропинов яйцеклетка овулирует (рис. 22.35; Garcia et al., 1981). Механизм овуляции до сих пор изучен недостаточно хорошо, однако можно полагать, что физический выход зрелого ооцита из фолликула происходит в результате индуцированного ЛГ повышения содержания коллагеназы, активатора плазминогена и **простагландина** внутри фолликула (Lemaire et al., 1973). мРНК активатора плазминогена хранится в неактивной форме в цитоплазме ооцита. ЛГ вызывает полиаденилирование этой матрицы и трансляцию ее в активную протеазу (Huarte et al., 1987). Простагландины могут вызывать локальное сокращение гладких мышц яичника и увеличивать

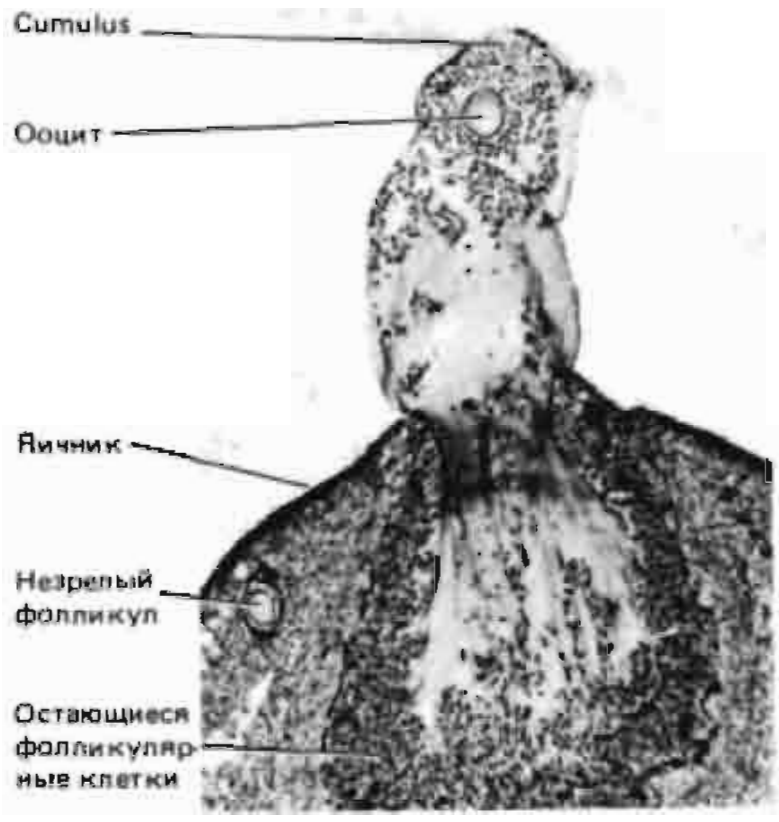


Рис. 22.35. Овуляция у кролика. Овуляцию наблюдали в обнаженном яичнике живого анестезированного кролика. В момент когда фолликул начал овулировать, яичник был удален, зафиксирован и окрашен. (Фотография с любезного разрешения J. Blandau.)

отток воды из овариальных капилляров (Diaz-Infante et al., 1974; Koos, Clark, 1982). Если синтез овариального простагландина ингибирован, то овуляции не происходит. В дополнение к индуцированному простагландином давлению коллагеназа и протеаза активатора плазминогена разрыхляют и переваривают внеклеточный матрикс фолликула (Beers et al., 1975; Downs, Longo, 1983). Результатом действия лютеинизирующего гормона, таким образом, оказывается повышение давления внутри фолликула, что сопровождается разрушением его стенки. Через образовавшееся отверстие яйцо выпадает в полость тела.

После овуляции начинается **лютеальная** фаза менструального цикла. Клеточная масса, оставшаяся от лопнувшего фолликула, под влиянием постоянно выделяющегося ЛГ становится **желтым телом.** (Реакция этих клеток на ЛГ объясняется тем, что всплеск синтеза ФСГ стимулирует у них образование дополнительных рецепторов ЛГ.) Желтое тело секретирует некоторое количество эстрогена, но основной его функцией является синтез **прогестерона.** Этот стероидный гормон с током крови попадает в матку, где довершает работу по подготовке ткани матки к имплантации бластоцисты, стимулируя рост стенки матки и ее кровеносных сосудов. Блокирование рецептора прогестерона синтетическим стероидом мифепристоном (Ru 486) приостанавливает утолщение стенки матки и препятствует импланта-

ции бластоцисты в стенку матки[1] (Couzinet et al., 1986). Кроме того, прогестерон ингибирует образование ФСГ, предотвращая таким образом созревание новых фолликулов и яйцеклеток. (На этом основано использование комбинации эстрогена и прогестерона в контрацептивных препаратах. До тех пор пока синтез ФСГ ингибирован, не может происходить ни рост новых яйцеклеток, ни их созревание.)

Если оплодотворения не происходит, желтое тело дегенерирует, секреция прогестерона снижается, и ткань с поверхности стенки матки отторгается. Когда уровень сывороточного прогестерона снизится, возобновляется секреция прогестерона гипофизом и начинается новый цикл. Если же оплодотворение произойдет, то трофобласт начинает секретировать новый гормон – **лютеотропин**, который будет поддерживать желтое тело в состоянии активности и сохранять по-прежнему высокий уровень сывороточного прогестерона. Таким образом, у человека менструальный цикл обусловливает периодическое созревание яйцеклеток и их овуляцию; кроме того, он дает возможность матке периодически становиться органом, способным обеспечить питание развивающегося организма в течение девяти месяцев.

[1] Полагают, что Ru 486 конкурирует с ядерным рецептором прогестерона. В отсутствие прогестерона сайт связывания ДНК на рецепторе «закрыт» белком hsp90. Связывание прогестерона с прогестероновым рецептором вызывает изменения конформации рецептора, высвобождая hsp90 и позволяя связавшему гормон рецептору присоединиться к реагирующим с гормоном элементам генных промоторов и энхансеров. Ru 486 может связаться с прогестероновым сайтом рецептора, но он не вызывает конформационных изменений, высвобождающих hsp90. Вместо этого он препятствует связыванию с этим сайтом прогестерона, следствием чего было бы изменение формы рецептора. В результате прогестероновый рецептор не может связать ДНК, и прогестерон не может оказывать физиологического эффекта (Baulieu, 1989). В Европе Ru 486 получил широкое распространение в качестве альтернативы хирургического аборта (Palka, 1989).

Дополнительные сведения и гипотезы

Поддержание блока мейоза в ооцитах млекопитающих и выход из блока

Если секреция фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) создает условия для созревания многочисленных фолликулов, то почему происходит преимущественное развитие всего лишь одного фолликула с единственным ооцитом? Очевидно, что созревать будет именно тот фолликул, который способен продуцировать наибольшее количество эстрогена в ответ на ФСГ, тогда как остальные погибнут. Наборы фолликулов, оказавшиеся под действием ФСГ, начинают не только пролиферировать, но и образуют на клетках теки новые рецепторы лютеинизирующего гормона (рис. 22.36). Рецепция ЛГ заставляет клетки теки секретировать эстроген. Как мы уже видели, последствия повышения количества эстрогена для дальнейшей рецепции ФСГ неоднозначны. Эстроген в одной концентрации снижает секрецию ФСГ гипофизом, тогда как в другой концентрации он стимулирует увеличение числа рецепторов ФСГ на фолликулярных клетках. Таким образом, чем больше эстрогена синтезирует фолликул, тем больше рецепторов ФСГ он получает,– при этом количество ФСГ в кровотоке снижается. По мере снижения концентрации ФСГ остается только один фолликул, способный связывать доступный ФСГ; именно этот фолликул продолжает свой рост, а остальные погибают.

Каким образом ЛГ нарушает мейотический блок? Поиски ответа на этот вопрос привели к интенсивному изучению природы блока мейоза. Эта (диктиатная) стадия оогенеза чрезвычайно важна, поскольку в это время ооцит растет, в нем дифференцируются специфические структуры и он приобретает способность завершить деления мейоза (So-



Рис. 22.36. Цикл с положительной обратной связью в фолликулярных клетках млекопитающих. Рецепция фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) приводит к образованию все большего количества рецепторов лютеинизирующего гормона (ЛГ). Стимулированные ЛГ фолликулярные клетки секретируют эстроген, который вызывает и увеличение числа рецепторов ФСГ, и снижение гипофизом синтеза ФСГ. В результате лишь немногие фолликулы смогут получать небольшие количества образующегося ФСГ и как следствие этого повысят свою способность получать ЛГ. Эти немногие фолликулы и завершат свое созревание.

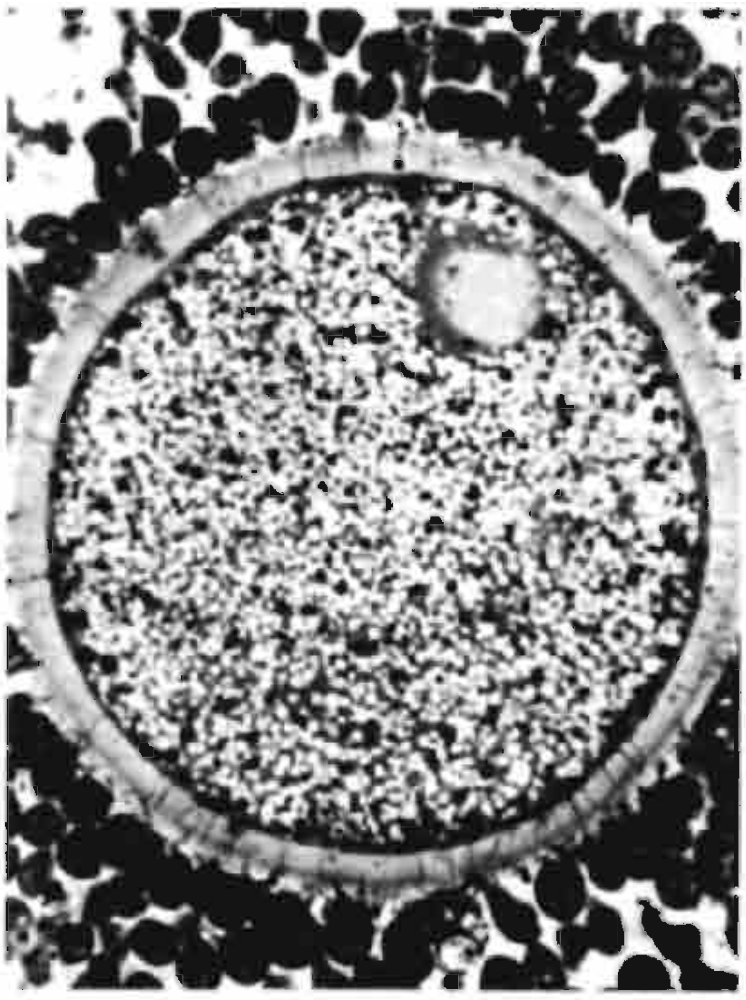


Рис. 22.37. Коммуникация между ооцитом и клетками гранулезы. *А*. Ооцит овцы, окруженный zona pellucida и фолликулярными клетками. Отростки клеток гранулезы фолликула пронизывают zona pellucida и контактируют с ооцитом. *Б*. Электронная микрофотография, на которой видны щелевые контакты между отростками фолликулярной клетки и ооцитом у макака-резуса. Щелевые контакты (обозначены стрелками) окрашены ионами лантана. (*А* – из Moore, Cran, 1980; фотография с любезного разрешения авторов. *Б* – из Anderson, Albertini, 1976; фотография с любезного разрешения D. Albertini.)

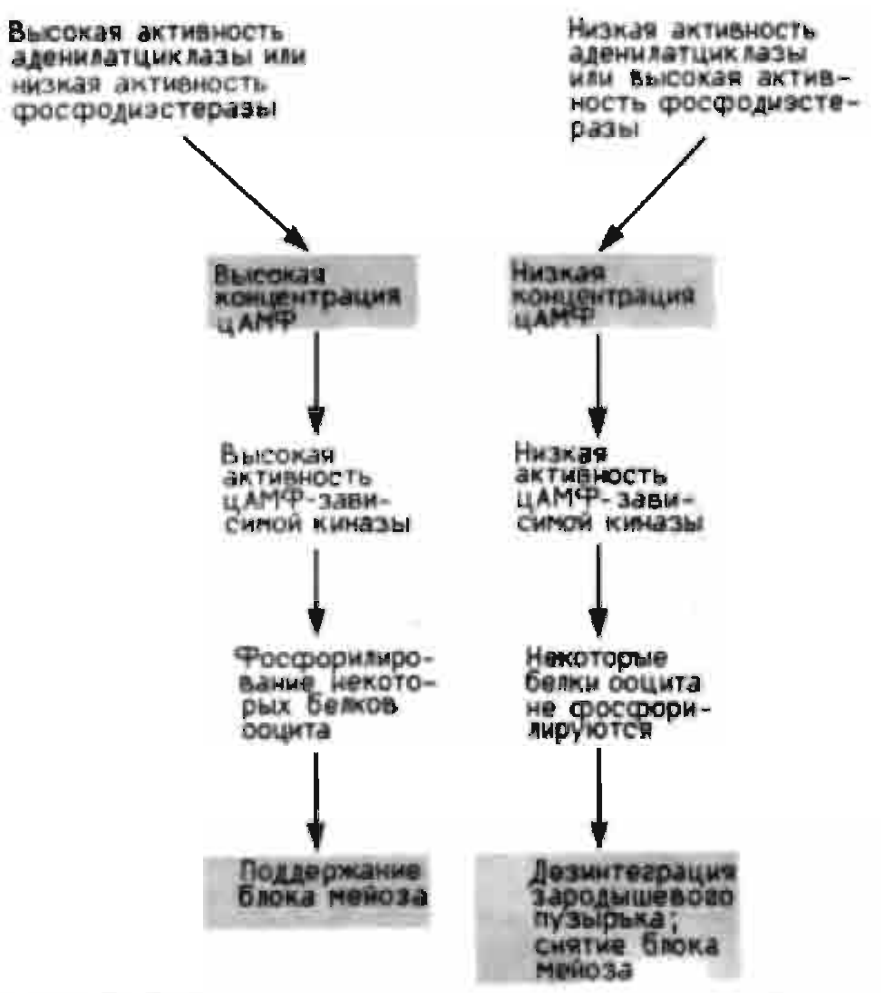


Рис. 22.38. Суммарная сводка предполагаемых событий, объясняющих, каким образом уровень цАМФ ооцита мог бы регулировать завершение мейоза ооцитом. Уровень цАМФ в ооците обусловлен, по крайней мере частично, его поступлением из фолликулярных клеток. Через мембраны

rensen, Wassarman, 1976). Ранние исследования показали, что заключенный в фолликул ооцит (в условиях как in vivo, так и in vitro) без воздействия гонадотропинов не созревает, тогда как ооцит, извлеченный из фолликула, способен возобновить мейоз даже без гормональной стимуляции (Pincus, Enzmann, 1935).

Отсюда можно заключить, что при нормальном развитии мейоз ингибирован фолликулярными клетками, а его инициация вызывается гонадотропинами. Это предположение о регуляции мейоза фолликулярными клетками подтверждается данными о том, что клетки кумулюса связаны с ооцитом посредством своих отростков, пронизывающих блестящую оболочку, и что эти отростки несут щелевые контакты, позволяющие небольшим молекулам проходить между клетками кумулюса фолликула и ооцитом (рис. 22.37; Anderson, Albertini, 1976; Gilula et al., 1978).

Наблюдения, свидетельствующие о том, что при повышении уровня цАМФ наблюдается ингибирование созревания ооцита (Cho et al., 1974), послужили основанием для предположения, что блок мейоза поддерживается транспортом цАМФ через щелевые

цАМФ пройти не может, но он способен проникать в ооцит по щелевым контактам, соединяющим ооцит с его фолликулярными клетками. При разрушении контактов уровень цАМФ в ооците снижается, что приводит к снятию блока мейоза.

контакты из фолликулярных клеток в ооцит (Dekel, Beers, 1978, 1980). Всплеск синтеза ЛГ мог бы служить триггером созревания, если бы он прерывал коммуникации через щелевые контакты, подавляя таким образом транспорт цАМФ в ооцит. Несколько групп данных подкрепляют эту гипотезу. Во-первых, снижение концентрации цАМФ играет решающую роль для возобновления мейоза. Дезинтеграция зародышевого пузырька может быть предотвращена, если в выделенных из фолликулов яйцеклетках ингибировать разрушение цАМФ или прямо воздействовать на них цАМФ (Bornslaeger et al., 1986). Снижение концентрации цАМФ в ооците происходит непосредственно перед возобновлением мейоза (Schultz et al., 1983). Механизм, посредством которого снижение уровня цАМФ приводит к возобновлению мейоза, неизвестен, но предполагается, что падение уровня цАМФ приводит к снижению концентрации цАМФ-зависимой протеинкиназы. Этот фермент, по-видимому, отвечает за фосфорилирование особых белков, которые в фосфорилированном состоянии поддерживали бы мейотический блок. Если ингибиторы этой протеинкиназы инъецировать в ооцит мыши, то мейоз может возобновиться даже в присутствии цАМФ (рис. 22.38; Bornslaeger et al., 1986).

Во-вторых, гонадотропины, по-видимому, ответственны за нарушение связи между ооцитом и фолликулярными клетками. Последние служат важным источником цАМФ ооцита, поэтому изменения концентрации цАМФ, фолликулярных клеток скажутся на уровне цАМФ ооцита (Racowsky, 1985; Bornslaeger, Schultz, 1985). Этим, наверное, можно объяснить, почему окруженный фолликулярными клетками ооцит находится в состоянии блокированного мейоза и освобождается от этого блока при удалении фолликулярных клеток.

Всплеск синтеза гонадотропина, однако, может поднять концентрацию цАМФ фолликулярных клеток на новые уровни. В ответ на это повышение зрелые фолликулярные клетки синтезируют гиалуроновую кислоту, которая вызывает физический разрыв контактов между отростками фолликулярных клеток и ооцитом (Eppig, 1979; Larsen et al., 1986). В результате мостики между фолликулярными клетками гранулезы и ооцитом, по которым перетекает цАМФ, прерываются, и ооцит млекопитающего возобновляет мейоз (Dekel, Sherizly, 1985; Racowsky, Satterlie, 1985).

Как и ооциты амфибий, овулировавший ооцит мыши блокирован на метафазе второго деления мейоза и в этом состоянии происходит его оплодотворение. Было показано (Paules et al., 1989), что созревающие ооциты мыши также содержат цитостатический фактор pp39^{mos}. Если трансляция гена *c-mos*, ответственного за этот фактор, специфически прервана, то ооцит не выделяет первое полярное тельце и не проходит нормальное созревание. Очевидно, что к созреванию яиц и амфибий, и млекопитающих ведут сходные события.

И яйцо, и спермий обречены на гибель, если они не встретятся. Итак, мы вновь оказались там, откуда начали – подошли к оплодотворению. Как говорил Ф. Р. Лилли в 1919 г.: «Элементы, которые соединяются, представляют собой одиночные клетки, и каждая из них находится на краю гибели, однако в результате соединения этих клеток возникает новая особь, являющаяся очередным звеном в бесконечном процессе Жизни».

ЛИТЕРАТУРА

Anderson E., Albertini D. F. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary, J. Cell Riol., **71**, 680–686.

Auerbach R., Joseph J. (1984). Cell surface markers on endothelial cells: A developmental perspective. In: E. A. Jaffe (ed.). The Biology of Edothelial Cells, Nijhoff, The Hague.

Austin J., Kimble J. (1987). *glp-1* is pequired in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*, Cell, **51**, 589–599.

Baker T. G. (1970). Primordial germ cells. In: C. R. Austin and R. V. Short (eds.), Reproduction in Mammals, Vol. 1, Germ Cells and Fertilization Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–13.

Baxter R. (1952). Alkaline phosphates in the primordial germ cells of a 10-mm human embryo, Int. Anat. Cong., Oxford, 17–18.

Beers W. H., Strickland S., Reich E. (1975). Ovarian plasminogen activator: Relationship to ovulation and hormonal regulation, Cell, **6**, 387–394.

Bennett D., Dunn L. C. (1964). Abnormalities associated with a chromosome region of the mouse, Science, **144**, 260–267.

Bier K. (1963). Autoradiographische Untersuchungen über die Leistungen des Follikelepithels und der Nahrzellen bei der Dottbildung und Eiweissynthese im Fliegenova, Wilhelm Roux Arch., Entwicklungsmech Org., **154**, 552–575.

Blanco A. (1980). On the functional significance of LDH-X, Johns Hopkins Med. J., **146**, 231–235.

Bloom W., Fawcett D. W. (1975). Textbook of Histology, 10th Ed. Saunders, Philadelphia.

Bornslaeger E. A., Mattei P., Schultz R. M. (1986). Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation, Dev. Biol., **114**, 453–462.

Bornslaeger E. A., Schultz R. M. (1985). Regulation of mouse oocyte maturation: Effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels, Biol. Reprod., **33**, 698–704.

Bounoure L. (1934). Recherches sur lignée germinale chez la grenouille rousse aux premiers stades au développement, Ann. Sci. Zool. Ser. 17, **10**, 67–248.

Bownes M. (1982). Hormonal and genetic regulation of vitellogenesis in *Drosophila*, Q. Rev. Biol., **57**, 247–274.

Brennen M. D., Weiner A. J., Goralski T. J., Mahowald A. P. (1982). The follicle cells are a major site of vitellogenin

synthesis in *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol., **89**, 225–236.
Brock M. L., Shapiro D. J. (1983). Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation, Cell, **34**, 207–214.
Browder L. (1980). Developmental Biology, Saunders, Philadelphia.
Burns R. K., Jr. (1930). The process of sex-transformation parabiotic *Amblystoma*. I. Transformation from female to male, J. Exp. Zool., **55**, 123–169.
Carlson B. M. (1981). Patten's Foundations of Embryology, 4th Ed., McGraw-Hill, New York.
Chiquoine A. D. (1954). The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo, Anat. Rec., **118**, 135–146.
Cho W. K., Stern S., Biggers J. D. (1974). Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro, J. Exp. Zool., **187**, 383–386.
Comings D. E. (1968). The rationale for an ordered arrangement of chromatin in the interphase nucleus, Am. J. Hum. Genet., **20**, 440–460.
Couzinet B. et al. (1986). Termination of early pregnancy by the progesterone antagonist RU 486 (Mifepristone), N. Eng. J. Med., **315**, 1565–1570.
Danilchik M. V., Gerhart J. C. (1987). Differentiation of the animal-vegetal axis in *Xenopus laevis* oocytes: Polarized intracellular translocation of platelets establishes the yolk gradient, Dev. Biol., **122**, 101–112.
Davidson E. (1985). Gene Activity in Early Development, 3rd Ed., Academic, Orlando, FL.
Dekel N., Beers W. H. (1978). Rat oocyte maturation in vitro: Relief of cyclic cAMP inhibition by gonadotropins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 4369–4373.
Dekel N., Beers W. H. (1980). Development of the rat oocyte in vitro: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorous, Dev. Biol., **75**, 247–254.
Dekel N., Sherizly I. (1985). Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle-enclosed oocytes, Endocrinology, **116**, 406–409.
Diaz-Infante A., Wright K. H., Wallach E. E. (1974). Effects of indomethacin and $PGF_{2\alpha}$ on ovulation and ovarian contraction in the rabbit, Prostaglandins, **5**, 567–581.
Dolecki G. J., Smith L. D. (1979). Poly(A) RNA metabolism during oogenesis in *Xenopus laevis*, Dev. Biol., **69**, 217–236.
Doniach T., Hodgkin J. (1984). A sex-determining gene, *fem-1*, required for both male and hermaphroditic development in *C. elegans*, Dev. Biol., **106**, 223–235.
Downs S., Longo F. J. (1983). Prostaglandins and preovulatory follicular maturation in mice, J. Exp. Zool., **228**, 99–108.
Dubois R. (1969). Le mécanisme d'entrée des cellules germinales primordiales dans le réseau vasculaire, chez l'embryion de poulet, J. Embryol. Exp. Morphol., **21**, 255–270.
Dumont J. N. (1978). Oogenesis in *Xenopus laevis*. VI. Route of injected tracer transport in follicle and developing oocyte, J. Exp. Zool., **204**, 193–200.
Dym M. (1977). The male reproductive system. In: L. Weiss and R. O. Greep (eds.), Histology, 4th Ed., McGraw-Hill, New York, pp. 979–1038.
Dym M., Fawcett D. W. (1971). Further observations on the number of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis, Biol. Reprod., **4**, 195–215.
Eppig J. J. (1979). FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte–cumulus cell complexes from mouse preovulatoru follicles, Nature, **281**, 483–484.
Eyal-Giladi H., Ginsburg M., Farbarou A. (1981). Avian primordial germ cells are of epiblastic origin, J. Embryol. Exp. Morphol., **65**, 139–147.
Flickinger R. A., Rounds D. E. (1956). The maternal synthesis of egg yolk proteins as demonstrated by isotopic and serological means, Biochim. Riophys. Acta, **22**, 38–72.
Frigerio D., Burri M., Bopp D., Baumgartner S., Noll M. (1986). Structure of the segmentation gene *paired* and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network, Cell, **47**, 735–746.
Frohnhöfer H. G., Nüsslein-Volhard C. (1987). Maternal genes reguired for the anterior localization of *bicoid* activity in the embryo of *Drosophila*, Genes Dev., **1**, 880–890.
Garcia J. E., Jones G. S., Wright G. L. (1981). Prediction of the time of ovulation, Fertil. Steril., **36**, 308–315.
Gilula N. B., Epstein M. L., Beers W. H. (1978). Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus–oocyte complex, J. Cell Biol., **78**, 58–75.
Ginsburg M., Eyal-Giladi H. (1987). Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process, Development, **101**, 209–219.
Grant P. (1953). Phosphate metabolism during oogenesis in *Rana temporaria*, J. Exp. Zool., **124**, 513–543.
Gurdon J. B. (1976). The Control of Gene Expression in Animal Development, Harvard University Press, Cambridge, MA.
Hagedorn H. H. (1983). The role of ecdysteroids in the adult insect, In: G. Downer and H. Laufer (eds.), Endocrinology of Insects, Alam R. Liss, New York, pp. 241–304.
Heasman J., Hynes R. D., Swan A. P., Thomas V., Wylie C. C. (1981). Primordial germ cells of *Xenopus* embryos: The role of fibronectin in their adhesion during migration, Cell, **27**, 437–447.
Heasman J., Mohun T., Wylie C. C. (1977). Studies on the locomotion of primordial germ cells from *Xenopus laevis* in vitro, J. Embryol. Exp. Morphol., **42**, 149–162.
Heath J. K. (1978). Mammalian primordial germ cells, Dev. Mammals, **3**, 272–298.
Hess D. (1973). Local structural variations in the Y chromosome of *Drosophila hydei* and their correlation to genetic activity, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 663–672.
Hirsh D., Oppenheim D., Klass M. (1976). Development of the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*, Dev. Biol., **49**, 200–219.
Hodgkin J., Doniach T., Shen M. (1985). The sex determination pathway in the nematode *Caenorhabditis elegans*: Variations on a theme, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **50**, 585–593.
Hotta Y., Tabata S., Stern H. (1984). Replicating and nicking of zygotene DNA sequences: control by a meiosis-specific protein, Chromosoma, **90**, 243–253.
Hotta Y., Tabata S., Stubbs L., Stern H. (1985). Meiosis-specific transcripts of a DNA component replicated during chromosome pairing: Homology across the phylogenetic spectrum, Cell, **40**, 785–793.
Hough-Evans B. R., Wold B. J., Ernst S. G., Britten R. J., Davidson E. H. (1977). Appearance and persistence of maternal RNA sequence in sea urchin development, Dev. Biol., **60**, 258–277.
Huarte J., Berlin D., Vassalli A., Strickland S., Vassalli J.-D. (1987). Meiotic maturation of mouse oocytes triggers the translation and polyadenilation of domant tissue-type plasminogen activator mRNA, Genes Dev., **1**, 1201–1208.
Humphrey R. R. (1931). Studies of sex reversal in *Amblystoma*. III. Transformation of the ovary of *A. tigrinum* into a functional testis trough the influence of a testis resident in the same animal, J. Exp. Zool., **58**, 333–365.
Iatrou K., Spira A., Dixon G. H. (1978). Protamine messenger RNA: Evidence for early synthesis and accumulation during spermatogenesis in rainbow trout, Dev. Biol., **64**, 82–98.
Ikenishi K., Kotani M. (1979). Ultraviolet effects on presumptive and primordial germ cells (pPGCs) in *Xenopus laevis* after the cleavage stage, Dev. Biol., **69**, 237–246.

Kammerman S., Ross J. (1975). Increase in numbers of gonadotropin receptors on granulosa cells during follicle maturation, J. Clin. Endocrinol., **41**, 546–550.
Kimble J.E. (1981). Strategies for control of pattern formation in *Caenorhabditis elegans*, Philos. Trans. R. Soc. (Lond.) B, **295**, 539–551.
Kimble J., Barton M.K., Schedl T.B., Rosenquist T.A., Austin J. (1986). Controls of postembryonic germ line development in *Caenorhabditis elegans*. In: J. Gall (ed.), Gametogenesis and the Early Embryo, Alan R. Liss, New York, pp. 97–110.
Kimble J.E., White J.G. (1981). Control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*, Dev. Biol., **81**, 208–219.
Klug W.S., King R.C., Wattiaux J.M. (1970). Oogenesis in the *suppresor-2* of *hairy wing* mutant *Drosophila melanogaster*. II. Nucleolar morphology and in vitro studies of RNA and protein synthesis, J. Exp. Zool., **174**, 125–140.
Kmiec E.B., Holloman W.K. (1984). Synapsis promoted by *Ustilago rec1* protein, Cell, **36**, 593–598.
Koch E.A., Smith P.A., King R.C. (1976). The division and differentiation of *Drosophila* cystocytes, J. Morphol., **121**, 55–70.
Koos R.D., Clark M.R. (1982). Production of 6-keto-prostaglandin F_{1a} by rat granulosa cells in vitro, Endocrinology, **111**, 1513–1518.
Langman J. (1981). Medical Embryology, 4th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
Larsen W.J., Wert S.E., Brünner G.D. (1986). A dramatic loss of cumulus cell gap junctions is correlated with germinal vesicle breakdown in rat oocytes, Dev. Biol., **113**, 517–521.
Laskey R.A. (1974). Biochemical processes in early development. In: A.T. Bull, J.R. Lagnado, J.O. Thomas and K.E. Tipton (eds.), Companion to Biochemistry, Vol. 2, Longman, London, pp. 137–160.
Lemaire W.J., Yang N.S.T., Behram H.H., Marsh J.M. (1973). Preovulatory changes in concentration of prostaglandin in rabbit graffian follicles, Prostaglandins, **3**, 367–376.
Lillie F.R. (1919). Problems of Fertilization, University of Chicago Press, Chicago.
Longo F., Anderson E. (1974). Gametogenesis. In: J. Lash and J.R. Whittaker (eds.), Concepts of Development, Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp. 3–47.
McLaren A. (1983). Does the chromosomal sex of a mouse cell affect its development? Symp. Br. Soc. Dev. Biol., **1**, 225–227.
Marushige K., Dixon G.H. (1969). Developmental changes in chromosome composition and template activity during spermatogenesis in trout testis, Dev. Biol., **19**, 397–414.
Masui Y., Markert C.L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes, J. Exp. Zool., **177**, 129–146.
Mintz B. (1957). Embryological development of primordial germ cells in the mouse: Influence of a new mutation W.J. Embryol. Exp. Morphol., **5**, 396–403.
Moens P.B. (1969). The fine structure of meiotic chromosome polarization and pairing in *Locusta migratoria*, Chromosoma, **28**, 1–25.
Moens P.B. (1974). Coincidence of modified crossover distribution with modified synaptonemal complexes. In: R.F. Grell (ed.), Mechanisms of Recombination, Plenum, New York, pp. 377–383.
Moor R.M., Cran D.G. (1980). Intercellular coupling of mammalian oocytes, Dev. Mammals, **4**, 3–38.
Moses M.J. (1968). Synaptonemal complex, Annu. Rev. Genet., **2**, 363–412.
Paglia L.M., Berry J., Kastern W.H. (1976). Messenger RNA synthesis, transport, and storage in silk-moth ovarian follicles, Dev. Biol., **51**, 173–181.
Palmiter R.D., Wilkie T.M., Chen H.Y., Brinster R.L. (1984). Transmission distortion and mosaicism in an unusual transgenic mouse pedigree, Cell, **36**, 869–877.
Pasteels J. (1953). Contributions a l'étude du developpement des reptiles. I. Origine et migration des gonocytes chez deux Lacertiens, Arch. Biol., **64**, 227–245.
Perlman S., Rosbash M. (1978). Analysis of *Xenopus laevis* ovary and somatic cell polyadenylated RNA by molecular hybridization, Dev. Biol., **63**, 197–212.
Pincus G., Enzmann E.V. (1935). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs, J. Exp. Med., **62**, 665–675.
Pinkerton J.H.M. et al. (1961). Development of the human ovary: A study using histochemical techniques, Obstet. Gynecol., **18**, 152–181.
Poccia D. (1986). Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development, Int. Rev. Cytol., **105**, 1–65.
Postlethwait J.H., Brownes M., Jowett T. (1980). Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*, Dev. Biol., **79**, 379–387.
Postlethwait J.H., Giorgi F. (1985). Vitellogenesis in insects. In: L. Browder (ed.), Developmental Biology: Oogenesis, Plenum, New York, pp. 85–126.
Racowsky C. (1985). Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of hamster and oocyte-cumulus complexes, J. Exp. Zool., **234**, 87–96.
Racowsky C., Satterlie R.A. (1985). Metabolic, fluorescent dye and electrical coupling between hamster oocytes and cumulus cells during meiotic maturation in vivo and in vitro, Dev. Biol., **108**, 191–202.
Reynaud G. (1969). Transfert de cellules germinales primordiales de dindon à l'embryon de poulet par injection intravasculaire, J. Embryol. Exp. Morphol., **21**, 485–507.
Reynhout J.K., Smith L.D. (1974). Studies on the appearance and nature of a maturation-inducing factor in the cytoplasm of amphibian oocytes exposed to progesterone, Dev. Biol., **38**, 394–400.
Rivier C., Rivier J., Vale W. (1986). Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat, Science, **234**, 205–208.
Rogulska T. (1969). Migration of chick primordial germ cells from the intracoelomically transplanted germinal crescent into the genital ridge, Experientia, **25**, 631–632.
Rogulska T., Ozdzenski W., Komer A. (1971). Behavior of mouse primordial germ cells in chick embryo, J. Embryol. Exp. Morphol., **25**, 155–164.
Romanoff A.L. (1960). The Avian Embryo, Macmillan, N.Y.
Schultz R.M., Montgomery R.R., Belanoff J.R. (1983). Regulation of mouse oocyte maturation: Implications of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis, Dev. Biol., **97**, 264–273.
Scully N.F., Shur B.D. (1988). Stage-specific increase in cell surface galactosyltransferase activity during spermatogenesis in mice bearing *t* alleles, Dev. Biol., **125**, 195–199.
Simon D. (1960). Contribution à l'étude de la circulation et du transport des gonocytes primaires dans les blastodermes d'oiseau cultivein vitro, Arch. Anat. Micr. Morph. Exp., **49**, 93–176.
Skipper J.K., Hamilton T.H. (1977). Regulation by estrogen of the vitellogenin gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 2384–2388.
Smith L.D. (1966). The role of a "germinal plasma" in the formation of primordial germ cells in *Rana pipiens*, Dev. Biol., **14**, 330–347.
Smith L.D., Ecker R.E. (1969). Role of the oocyte nucleus in physiological maturation in *Rana pipiens*, Dev. Biol., **19**, 281–309.
Sorensen R., Wassarman P.M. (1976). Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte, Dev. Biol., **50**, 531–536.
Stott D., Wylie C.C. (1986). Invasive behavior of mouse primordial germ cells in vitro, J. Cell Sci., **86**, 133–144.

Streeter P. R., Berg E. L., Rouse B. T. N., Bargatze R. F., Butcher E. C. (1988). A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. Nature, **331**, 41–46.
Subtelny S., Penkala J. E. (1984). Experimental evidence for a morphogenetic role in the emergence of primordial germ cells from the endoderm of *Rana pipiens*. Differentiation, **26**, 211–219.
Sutasurya L. A., Nieuwkoop P. D. (1974). The induction of primordial germ cells in the urodeles. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org., **175**, 199–220.
Swanson C. P., Merz T., Young W. J. (1981). Cytogenetics: The Chromosome in Division, Inheritance and Evolution. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
Swift C. H. (1914). Origin and early history of the primordial germ-cells in the chick. Am. J. Anat., **15**, 483–516.
Taylor M. A., Smith L. D. (1987). Induction of maturation in small *Xenopus laevis* oocytes. Dev. Biol., **121**, 111–118.
Telfer W. H., Woodruff R. I., Huebner E. (1981). Electrical polarity and cellular differentiation in meroistic ovaries. Am. Zool., **21**, 675–686.
Von Wettstein D. (1971). The synaptonemal complex and four-strand crossing over. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 851–855.
Von Wettstein D. (1984). The synaptonemal complex and genetic segregation. In: C. W. Evans and H. G. Dickinson (eds.), Controlling Events in Meiosis. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 195–231.
Woodruff R. I., Telfer W. H. (1980). Electrophoresis of proteins in intercellular bridges. Nature, **386**, 84–86.
Wylie C. C., Heasman J., Swan A. P., Anderton B. H. (1979). Evidence for substrate guidance of primordial germ cells. Exp. Cell Res., **121**, 315–324.
Yanagisawa K. et al. (1974). Transmission ratio distortion at the *T* locus: Serological identification of two populations in *t* heterozygotes. Immunogenetics, **1**, 91–96.
Züst B., Dixon K. E. (1977). Events in the germ cell lineage after entry of the primordial germ cell into the genital ridges in normal and UV-irradiated *Xenopus laevis*. J. Embryol. Morphol., **41**, 33–46.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА К 3-МУ ИЗДАНИЮ

Auerbach R. et al. (1987). Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: an in vitro correlate of preferential metastasis in vivo. Cancer Res., **47**, 1492–1496.
Baulieu E. E. (1989). Contragestion and other clinical applications of RU 486, an antiprogesterone at the receptor. Science, **245**, 1351–1357.
Braun R. E., Behringer R. R., Peschron J. J., Brinster R. L., Palmiter R. D. (1989a). Genetically haploid spermatids are phenotypically diploid. Nature, **337**, 373–376.
Borovsk D., Carlson D. A., Griffin P. R., Shabanowitz J., Hunt D. F. (1990). Mosquito oostatic factor: A novel decapeptide modulating trypsin-like enzyme biosynthesis in the midgut. FASEB J., **4**, 3015–3020.
Braun R. E. et al. (1989b). Protamine 3'untranslated sequences regulate temporal translational control and subcellular localisation of growth hormone in spermatids of transgenic mice. Genes Dev., **3**, 793–802.
Fox C. A., Sheets M. D., Wickens M. P. (1989). Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUAU. Genes Dev., **3**, 2151–2162.
Gallatin W. M., Weissmann I. L., Butcher E. C. (1983). A cell surface molecule inolved in organ-specific homing of lymphocytes. Nature, **304**, 30–35.
Gallatin W. M. et al. (1986). Lymphocyte homing receptors. Cell, **44**, 673–680.
Green G. R., Poccia D. L. (1988). Interaction of sperm histone variants and linker DNA during spermiogenesis in the sea urchin. Biochemistry, **27**, 619–625.
Hill D. P., Shakes D. C., Wards S., Strome S. (1989). A sperm-supplied product essential for initiation of normal embryogenesis in *Gaenorhabditis elegans* is encoded by the paternal effect embryonic-lethal gene, *spe-11*. Dev. Biol., **136**, 154–166.
Hoyle H. D., Raff E. C. (1990). Two *Drosophila* β-tubulin isoforms are not funktionally equivalent. J. Cell Biol., **111**, 1009–1026.
Inoue S., Hiroyoshi T. (1986). A maternal-effect sex-transformation mutant of the housefly, *Musca domestica* L. Genetics, **112**, 469–481.
Karr T. L. (1988). Persistence of the sperm tail during early embryonic development in *Drosophila* visualized using sperm-specific monoclonal antibodies. J. Cell Biol., **107**, 173a.
MacDonald P. M. (1990). *bicoid* mRNA localization signal: Phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. Development, **110**, 161–171.
Manseau L. J., Schüubach T. (1989). *cappuccino* and *spire*: two unique maternal effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of *Drosophila* embryo. Genes Dev., **3**, 1437–1452.
Masui Y. (1974). A cytostatic factor in amphibian: Its extraction and partial characterization. J. Exp. Zool., **187**, 141–147.
Nakamache M., Berg E. L., Streeter P. R., Butcher E. C. (1989). The mucosal vascular addressin is a tissue-specific endothelial cell adhesion molecule for circulating lymphocytes. Nature, **337**, 179–181.
Palka J. (1989). The pill of choice? Science, **245**, 1319–1323.
Paules R. S. et al. (1989). Mouse *mos* protoncogene product is present and functions during oogenesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **86**, 5395–5399.
Sagata N., Oscarsson M., Copeland T., Brumbaugh J., Vande Woude G. F. (1988). Function of *c-mos* proto-oncogene product in meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. Nature, **335**, 519–525.
Sagata N., Watanabe N., Vande Woude G. F., Ikawa Y. (1989). The *c-mos* proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. Nature, **342**, 512–518.
Sen D., Gilbert W. (1988). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. Nature, **334**, 364–366.
Stephanson E. C., Chao Y.-C., Fackenthal J. D. (1988). Molecular analysis of the *swallow* gene of *Drosophila melanogaster*. Genes Dev., **2**, 1655–1665.
Streeter P. R., Berg E. L., Rouse B. T. N., Baargatze R. F., Butcher E. C. (1988a). A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. Nature, **331**, 41–46.
Streeter P. R., Rouse B. T. N., Butcher E. C. (1988b). Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. J. Cell. Biol., **107**, 1853–1862.
Vassalli J.-D. and 8 others. (1989). Regulated polyadenylation controls mRNA translation during meiotic maturation of mouse oocytes. Genes Dev., **3**, 2163–2171.
Watanabe N., Vande Woude G. F., Ikawa Y., Sagata N. (1989). Specific proteolysis of the *c-mos* proto-oncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. Nature, **342**, 505–517.
Woodruff R. I., Kulp J. H., LaGaccia E. D. (1988). Electrically mediated protein movement in *Drosophila* follicles. Roux Arch. Dev. Biol., **197**, 231–238.
Woodruff T. K. et al. (1988). Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cecle. Science, **239**, 1296–1299.
Yisaeli J. K., Sokol S., Melton D. A. (1990). A two-step model for the localization of a maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in translocation and anchoring of Vg1 mRNA. Development, **108**, 289–298.

Глава 23

Эмбриологические механизмы эволюционных изменений

Как новое приходит в мир? Как оно рождается?
Из каких оно создано сплавов, толкований, сочетаний?
Как ему, столь экстремальному и опасному, удается выжить?
На какие компромиссы, какие сделки, какие измены своей тайной природе оно должно идти,
Чтобы избежать крушения, уничтожения, гильотины?

САЛМАН РУШДИ (1988)

Первая Птица вылупилась из яйца Рептилии

ВАЛЬТЕР ГАРСТАНГ (1922)

«Единство типа и условий существования»

Чарлз Дарвин унаследовал от прошлого накапливавшиеся веками спекуляции относительно происхождения животных и природы их разнообразия. Образование, полученное самим Дарвином, было пропитано в соответствии с британскими традициями естественным богословием, которое проповедовало, что мудрость, вездесущность и благожелательность Господа проявляются в его творениях. В этой традиции доминировало представление об Акте творения, утверждающее, что виды созданы Творцом по его собственным замысловатым проектам. Пальцы человеческой руки являют собой необыкновенно искусно (некоторые говорили «совершенно») задуманные изобретения, дающие людям власть над всем, что их окружает. Лопатообразная лапа крота в свою очередь превосходно приспособлена к среде его обитания, так же как крылья птиц и плавники рыб. Более изощренная форма естественного богословия, за которую в Англии ратовал анатом и эмбриолог Ричард Оуэн, отводила адаптациям второстепенную роль, считая действительно важной идею о том, что рука человека, лапа крота, крыло птицы и плавник рыбы построены по одному и тому же плану. Рассматривая отвлеченно план строения данной конечности, мы можем выявить тот великий замысел, в соответствии с которым Господь построил конечности всех позвоночных. По Оуэну (Owen, 1848), главное – это гомологии, лежащие в основе разнообразия животных, а не вторичные адаптации этих исходных элементов.

Синтез, произведенный Чарлзом Дарвином

Дарвин отдал должное этим первым дебатам, написав (1859): «Общепризнано, что строение всех органических существ подчинено двум великим законам – единства типа и единства условий существования». Далее Дарвин пишет, что его теория даст объяснение единству типа, связанному с происхождением. Изменения, создающие эти типы и вызывающие замечательные адаптации к условиям существования, были объяснены, кроме того, теорией естественного отбора. Дарвин назвал это «происхождением с модификацией». Прочитав в 1842 г. изложение законов фон Бэра (von Baer), сделанное Иоханнесом Мюллером (Müller), Дарвин понял, что сходство между зародышами может оказаться очень сильным доводом в пользу генетической связанности различных групп животных. «Общность эмбриональных структур указывает на общность происхождения» – к такому заключению он приходит в «Происхождении видов».

Личиночные формы использовались в таксономической классификации еще до Дарвина.

Дж. В. Томпсон (J. V. Thompson), например, показал, что личинки морского желудя почти идентичны личинкам креветки и поэтому относил морских желудей к членистоногим, а не к моллюскам (рис. 23.1; Winsor, 1969). Дарвин как специалист по таксономии морских желудей очень высоко оценил это открытие: «Даже прославленный Кювье не заметил, что морская уточка – ракообразное, но одного взгляда на личинку достаточно, чтобы в этом не осталось никаких сомнений». Эволюционная интерпретация Дарвином законов фон Бэра привела к созданию парадигмы, которой ученые следовали на протяжении многих десятилетий: родственные связи между группами могут быть выявлены при обнаружении общих личиночных форм. Вскоре сходное открытие сделал А. О. Ковалевский (1871), о чем написал Дарвин в «Происхождении человека». Ковалевский обнаружил, что у личинок оболочников имеется хорда, а по закладке и развитию нервной трубки и других органов они очень сходны с примитивным хордовым – ланцетником. Это позволило разрешить еще одну таксономическую загадку: оболочники (которых обычно, так же как и морских уточек, относили к моллюскам) заняли свое место среди хордовых. Дарвин обратил также внимание на то, что у зародышей иногда имеются структуры, ненужные взрослой форме, но указывающие на их родственные связи с другими животными. Он обратил внимание на наличие глаз у зародышей кротов, рудиментов таза – у зародышей змей и зубов – у зародышей беззубых китов. Ранее в этой книге было отмечено, что у зародышей млекопитающих образуется рудиментарный желточный мешок, снабженный кровеносными сосудами, и что по характеру морфогенетических движений они сходны с птицами и рептилиями, развитие которых происходит внутри этого мешка.

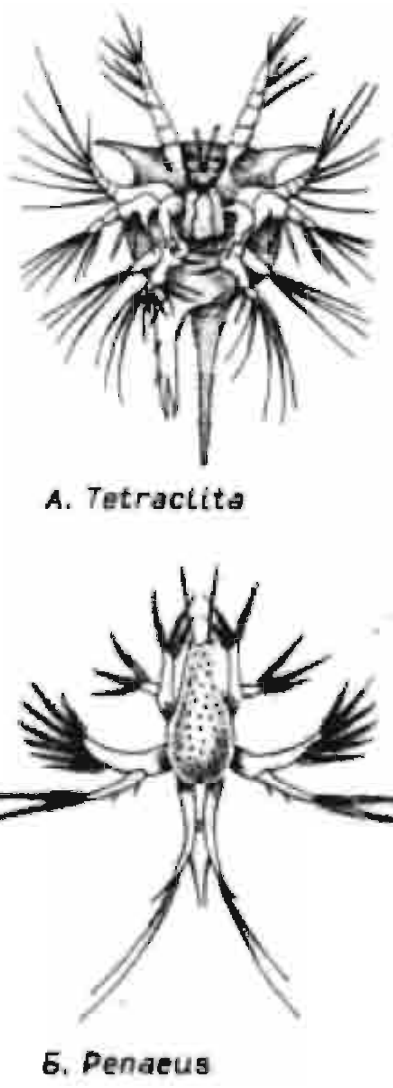


Рис. 23.1. Науплиусы (личинки): *А* – морской уточки *Tetraclita* (вид с брюшной стороны) и *Б* – креветки *Penaeus* (вид со спинной стороны). Личинки этих ракообразных очень сходны на ранних стадиях развития, но в дальнейшем они сильно дивергируют. (По Müller, 1864.)

Дарвин утверждал также, что адаптации, которые отклоняются от «типа» и дают организму возможность выжить в его особой среде, появляются на поздних стадиях эмбрионального развития. Он отмечает, что различия между видами и родами возникают, как это предсказывают законы фон Бэра, лишь на поздних стадиях развития и, чтобы убедиться в этом, он даже усыплял с помощью хлороформа голубей (очень неохотно). Таким образом, Дарвин различал два подхода к «происхождению с модификацией»: можно делать упор на общее *происхождение*, указывая на гомологии у зародышей двух или нескольких групп животных, или выдвигать на первый план *модификации*, показывая, как изменилось развитие, с тем чтобы могли возникнуть структуры, дававшие животным возможность адаптироваться к тем или иным условиям среды.

Дарвин не пытался строить полные филогении, основанные на эмбриологических данных, но его работы побудили к этому многих его современников. Одним из первых ученых, оценивших эволюционное значение исследований фон Бэра, был Илья Мечников. Мечников понимал, что в основе эволюции лежат не модификации взрослых организмов, а модификации эмбриональных стадий. В 1891 г. он писал:

> «Человек появился в результате одностороннего, но не общего совершенствования, и он близок не столько к взрослым человекообразным обезьянам, сколько к их неравномерно развитым плодам. С чисто естественноисторической точки зрения можно было бы рассматривать человека как обезьяньего «монстра» с непомерно развитыми мозгом, лицевой частью головы и руками».

Таким образом, эволюция организмов происходит в результате изменения их эмбрионального развития.

Э. Б. Вильсон и Ф. Р. Лилли

Если изменения в эмбриональном развитии приводят к эволюционным изменениям, то как происхо-

дят эти изменения в развитии? В конце прошлого века многие исследователи пытались связать эмбриогенез с филогенезом путем анализа клеточных линий. Они тщательнейшим образом наблюдали за каждой клеткой развивающихся зародышей и сравнивали способы формирования тканей (гистогенез) у разных организмов. В 1898 г. два выдающихся эмбриолога прочитали в Лабораториях биологии моря в Вуде-Холе (Массачусетс) лекции о клеточных линиях; в этих лекциях подчеркивались два способа использования эмбриологии в поддержку эволюционной биологии. Первая лекция, прочитанная Э. Б. Вильсоном (E. B. Wilson), была важной вехой в исследовании гомологий у зародышей с целью установления филогенетических связей. Изучая спиральное дробление у плоских червей, моллюсков и кольчатых червей (аннелид), Вильсон обнаружил, что во всех случаях каждый данный орган образуется из одной и той же группы клеток. На основании этого Вильсон пришел к выводу, что все три типа животных происходят от одного общего предка. На стадиях дробления различные группы клеток у плоских червей, моллюсков и аннелид «так близки друг другу по происхождению и по дальнейшей судьбе, что объяснить это сходство чем-то иным, кроме как наличием общего предка, просто невозможно. Сами различия, как мы увидим, служат некоторыми из наиболее интересных и убедительных доказательств генетического родства, ибо процессы, которые у низших форм играют ведущую роль в развитии, у высших форм так сильно редуцированы, что представляют собой не более, чем следы или напоминания о том, чем они были, а в некоторых случаях совершенно отсутствуют, так же как, например, зубы у птиц или конечности у змей».

Вторую лекцию прочитал Ф. Р. Лилли (F. R. Lillie), который также изучал развитие зародышей моллюсков и модификации клеточных линий, обращая особое внимание на модификации, а не на сходные черты в дроблении. Его исследования по двустворчатому моллюску перловице (*Unio*) были изложены в гл. 3; модифицированное дробление у этого моллюска приводит к образованию глохидия – личинки, благодаря которой перловица способна выжить в проточных водоемах. Лилли указывал, что в «современных» эволюционных исследованиях следовало бы сосредоточить внимание на изменениях эмбрионального развития, обеспечивающих выживание в той или иной среде, а не увлекаться изучением гомологий у предковых форм, на основании которых устанавливается общность происхождения животных.

Так в 1898 г. были ясно определены два главных момента в изучении эволюции и развития: выявление глубинного единства, которое позволяет объединять коренным образом различающиеся группы организмов, и обнаружение различий, благодаря которым виды получают возможность адаптироваться к определенным условиям окружающей среды. (Эти же направления были характерны для двух типов естественного богословия до Дарвина.) Дарвин полагал, что эти два аспекта разделены во времени (т. е. глубинное сходство следует искать на самых ранних стадиях развития, тогда как на более поздних стадиях происходит дивергенция, обеспечивающая видоспецифичные адаптации [см. Ospovat, 1981]). Однако как Вильсон, так и Лилли рассматривали лишь самую начальную стадию эмбриогенеза – дробление. Описанные два подхода к характеристике соотношения между эволюцией и развитием остаются главными до сих пор.

Эволюция раннего развития: E pluribus unum[1]

Возникновение зародышей

Как в процессе эволюции, так и в процессе эмбрионального развития живых существ мы наблюдаем возникновение многоклеточности из одноклеточных организмов. Из отдельных частей клетки образуется некое новое целое. Это основополагающая ступень в возникновении нового уровня сложности. Volvocaceae и Dictyostelidae, упоминавшиеся в гл. 1, – всего лишь две из 17 групп протистов, достигших многоклеточности (Buss, 1987). Однако только у трех групп (у тех, от которых происходят грибы, растения и животные) развилась способность к формированию многоклеточных агрегатов, дифференцирующихся на клетки различных типов, т. е. к образованию зародышей.

Первые зародыши должны были разрешить самую главную проблему: поскольку каждая из составляющих клеток имела собственный генетический аппарат, а цитоплазматические структуры должны были разделиться, почему бы каждой клетке не продолжать свою самостоятельную пролиферацию? Что должно было заставить клетки пожертвовать способностью пролиферировать, чтобы совместно образовать единый индивидуум? Существовало, вероятно, несколько путей для решения этой проблемы. Басс (Buss) полагает, что у первых зародышей имело место резкое разделение между пролиферацией и дифференцировкой и что протисты, бывшие нашими предками, никогда не научились делиться после того, как у них дифференцировались реснички. Некоторые другие группы протистов (особенно Ciliata) были способны к образованию новых центров организации микротрубочек, тогда как наши предки

[1] Из множества единое (лат.).

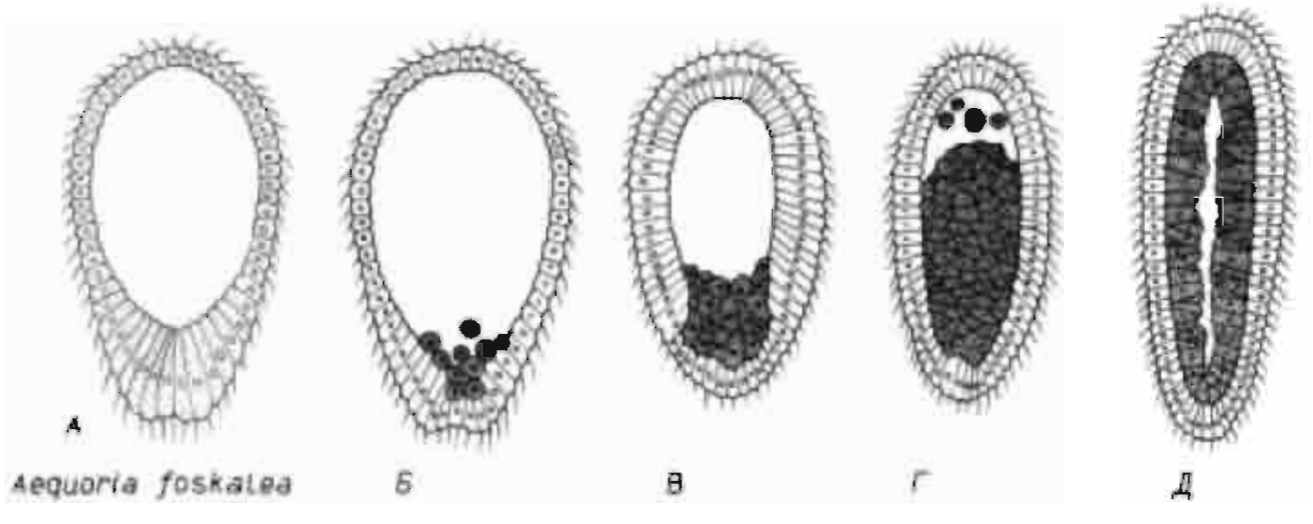


Рис. 23.2. Гаструляция у двух гидроидных медуз. *А–Д*. Гаструляция у *Aequoria foskalea*, приводящая к образованию покрытой ресничками гаструлы. Клетки, находящиеся на вегетативном полюсе, теряют реснички и мигрируют в бластоцель, формируя там популяцию, делящуюся путем митоза. *Е–И*. Гаструляция у *Clava squamata*, в результате которой образуется наполненная клетками стерробластула, а затем ее наружный слой покрывается ресничками. Оба процесса приводят к образованию покрытой ресничками «планулы» – личинки, характерной для гидроидов. (У свободноплавающих зародышей не наблюдается эпиболии нересничной эктодермы.) (По Buss, 1987.)

этого не умели. До сих пор у Metazoa нет ни одной ресничной клетки, которая была бы способна к делению (хотя ресничные клетки Metazoa могут разделиться, если предварительно утратят реснички). Басс полагает, что у предков современных Metazoa пролиферация клеток прекратилась в результате их дифференцировки в бластулу, состоявшую из ресничных клеток. Ранние зародыши первых типов Metazoa – губок и кишечнополостных – представляли собой шары из ресничных клеток, сходные с зародышами морских ежей, рассматривавшихся в гл. 3. Эти ресничные бластулы были способны передвигаться, но, по-видимому, всякое развитие у них прекращалось, поскольку ресничные клетки неспособны ни к делению, ни к превращению в дифференцированные клетки каких-либо других типов. Для того чтобы превратиться в организм, следовало решить эту дилемму.

Проблема была решена путем сохранения или создания популяции клеток, лишенных ресничек. Такие клетки обеспечивали пролиферацию, образуя новые клетки, тогда как реснички давали зародышу возможность перемещаться. Однако делящиеся нересничные клетки не могли перемещаться куда угодно. Они не могли нарастать на ресничные клетки, покрывая их поверхность, так как при этом перемещение зародыша стало бы невозможным. Они не могли расти наружу, так как это тормозило бы движение зародыша. Единственное, что им оставалось, – это мигрировать *внутрь* бластоцеля (рис. 23.2). Предполагается, что это перемещение и пролиферация клеток положили начало гаструляции. Таким образом, бластула возникла как способ объединения автономных клеток в федерацию. А возникновение гаструлы было компромиссом в пределах этой федерации, дававшим зародышу возможность развиваться, сохраняя подвижность [1] (Buss, 1987).

[1] Это модификация теории, первоначально выдвинутой Мечниковым (1886) для объяснения происхождения многоклеточных организмов. Используя эмбрионы гид-

Самые первые зародыши развивались, вероятно, таким мозаичным способом. Вторым механизмом, с помощью которого тотипотентные бластомеры оставались вместе, образуя единый организм, служила индукция. При этом каждая клетка вынуждена жертвовать своей автономией, чтобы создать связное сообщество. Генри и др. (Henry et al., 1989) обнаружили, что если отдельные бластомеры морского ежа могут быть тотипотентными, то состоящие из этих клеток агрегаты нетотипотентны. Вероятно, каждая клетка ограничивает потенциальные возможности своих соседей (см. гл. 8). Эта ограничительная регуляция проявляется также у аллофенных мышей (см. гл. 3), когда бластомеры, комбинируясь, образуют одну химерную мышь вместо двух отдельных мышей. Очевидно, что как только клетки оказываются вместе, их потенциальные возможности сильно ограничиваются. Кроме того, как только эта внутренняя популяция клеток получает возможность взаимодействовать с наружной популяцией и с другими частями внутренней популяции, могут происходить индукционные события, дающие начало новым органам.

Каким бы образом ни формировалось это сообщество клеток, их интеграция в единый зародыш обеспечивается материнским вкладом в цитоплазму яйца. Именно этот набор инструкций заставляет клетки дробиться, располагаясь определенным образом, прочно прилегать друг к другу и дифференцироваться в определенные сроки. Как мы видели в гл. 14, зародыши морского ежа превращаются в покрытую ресничками бластулу, даже если ДНК в ядре не транскрибируется. Только во время гаструляции ядро начинает контролировать развитие. Таким образом отбор на уровне размножения клеток (что было законом выживания для протистов) заменил отбор на уровне отдельного многоклеточного организма.

роидных полипов и губок, Мечников показал, что некоторые клетки из стенки бластулы «втягивают внутрь свой жгутик, приобретают амебоидный облик и подвижность, размножаются делением, заполняют полость бластулы и становятся способными переваривать пищу». По мнению И. И. Мечникова, такое эмбриональное состояние «имеет поэтому право претендовать на то, чтобы считаться прототипом многоклеточных существ». Мечников пытался построить филогению всех организмов на основе их зародышевых листков и полагал, что все мезодермальные клетки могут быть охарактеризованы по их способности фагоцитировать чужеродные вещества. Его открытия в области сравнительной эмбриологии в конечном счете позволили ему сформулировать концептуальные основы новой науки – иммунологии. (Подробное изложение теории Мечникова о происхождении многоклеточности см. Chernyak, Tauber, 1988, 1991.)

Формирование типов. Модификация путей развития

В настоящее время на нашей планете можно насчитать всего лишь 33 плана строения тела животных (Margulis, Schwartz, 1988). Они соответствуют типам животных. Не следует, однако, думать, что эти планы строения – единственно возможные. Принято считать, что среди отпечатков раннекембрийских животных из сланцев Бэрджес содержатся остатки животных 22 типов, потомки которых не были найдены в более высоких слоях (рис. 23.3). Кроме того, в этой небольшой полосе сланцевых отложений площадью с городской квартал обнаружены остатки дюжины неизвестных прежде классов насекомых. Эти животные не являются «примитивны-

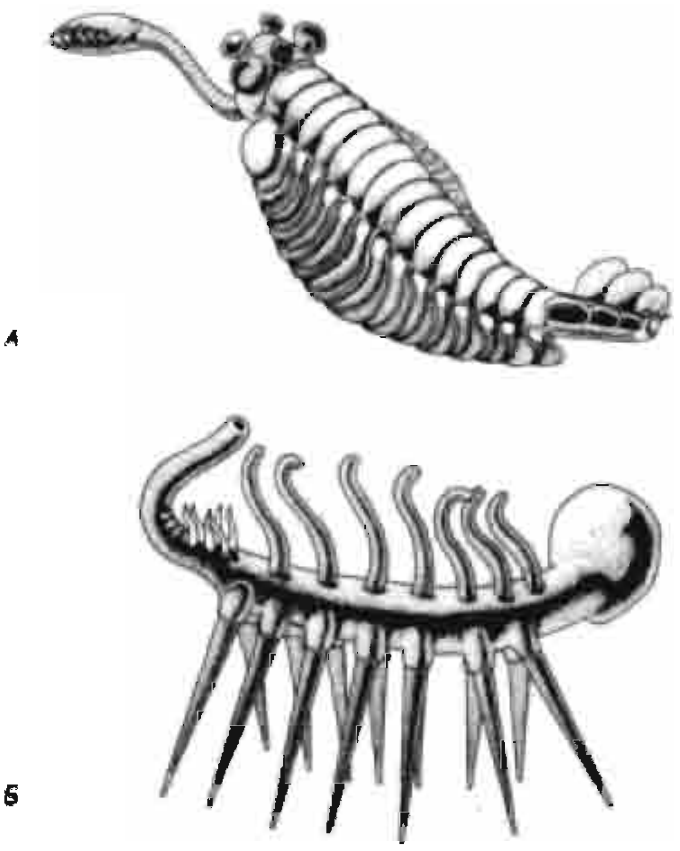


Рис. 23.3. Три ископаемых организма из сланцев Бэрджес (средний кембрий). *А. Opabina* – организм с пятью глазками на голове, передним придатком, заканчивающимся когтем, сегментированным туловищем, дорсальными жабрами и хвостом, состоящим из трех сегментов. *Б.* Удачно названная *Hallucigenia* с семью парами подпорок и дорсальными щупальцами. *В. Pikaia gracilens*, возможно принадлежащая к хордовым. (Из Gould, 1989).

ми» членами ныне существующих типов или классов; скорее это специализированные представители собственных групп (Whittington, 1985; Gould, 1989). В сланцах Бэрджес найдено также два представителя животного мира, возможно родственных предковым формам ныне существующих типов. Один из этих представителей – животное, напоминающее перипатуса, которое, по-видимому, близко к предковой форме насекомых, а другой, вероятно, является каким-то хорошо сохранившимся хордовым (названное *Pikaia gracilens*); не исключено, что этот последний экземпляр родственен предковым хордовым (рис. 23.3, *B*). Это второе ископаемое обладает рядом признаков, оправдывающих его отнесение к хордовым: у него, по-видимому, имелась хорда и косые полосы по бокам тела, очень похожие на мышечные сегменты ланцетника (Conway, Morris, Whittington, 1979). Таким образом, все известные (и многие другие, пока еще неизвестные) типы Metazoa, вероятно, сформировались 570 млн. лет назад.

Если современные интерпретации палеонтологической летописи верны, то эукариотические клетки появились примерно 1,4 млрд. лет назад, все типы животных сложились в течение последующих 800 млн. лет и за последние полмиллиарда лет никаких новых морфологических планов строения к ним не добавлялось. Каким же образом за такой относительно короткий срок возникли эти основные планы строения и почему впоследствии не появилось ни одного другого типа? Кауффман (Kauffman, 1993) построил математическую модель, согласно которой для любой развивающейся системы (будь то тип или вид организмов, автомобиль или религиозное учение) характерна подобная дивергенция, после чего принимается один из вариантов первоначального многообразия. Кауффман использует метафору изрезанного адаптивного ландшафта, где имеются адаптивные пики и долины, а все организмы первоначально обладают одинаковой средней приспособленностью. Сделав большие скачки, они с вероятностью 50% повысят свою приспособленность. В конечном итоге шансы найти такой план строения, который сделает их более приспособленными, уменьшаются, если животное перескакивает на слишком большое расстояние от того места, где оно находится. Таким образом, длинные прыжки становятся чересчур рискованными, тем более, что высокие адаптивные пики могут оказаться уже занятыми. Зато небольшие прыжки (в пределах данного типа) могут сделать данный организм несколько более приспособленным, чем окружающая популяция. В результате создается некоторое разнообразие вокруг нескольких удачных моделей. В общем промежутки времени между успешными длинными прыжками увеличиваются вдвое с каждой попыткой. Возможно, что в течение раннего кембрия в геноме еще не успели стабилизироваться те множества взаимодействий, которые мы наблюдаем сегодня. Кроме того, для многих групп беспозвоночных характерно чередование поколений, при котором половая форма дает начало бесполой форме (зооиду, полипу, почке), в свою очередь снова дающей начало половой форме. В таких случаях соматические мутации, возникшие у бесполой формы, могут попасть в тело половой формы и очень быстро распространиться (рис. 23.4; Buss, 1987).

Каким образом может измениться один план строения и возникнуть другой? Во-первых, могут



Рис. 23.4. Быстрое появление новых вариантов у беспозвоночных, для которых характерно чередование поколений. В данном случае в клетках колонии гидроидного полипа возникает соматическая мутация. Некоторые из мутантных клеток становятся частью репродуктивного полипа, дающего начало медузам, в которые попадают мутантные клетки. Эти медузы размножаются половым путем, давая начало новым колониям, которые могут состоять из мутантных клеток.

модифицироваться самые ранние стадии развития. Согласно фон Бэру (см. гл. 5), животные, принадлежащие к разным видам, но к одному и тому же роду, дивергируют на очень поздних стадиях развития. Чем сильнее дивергировали виды один от другого, тем раньше проявляются различия между их зародышами. Так, зародышей белого гуся можно отличить от зародышей голубого гуся лишь на очень поздних стадиях развития. Однако дивергенция от куриных зародышей у зародышей белого гуся наблюдается несколько раньше, а отличить гусиные зародыши от зародышей ящерицы можно даже на еще более ранних стадиях. Создается впечатление, что возникновение новых планов строения, обусловленное мутациями, достигается за счет их воздействия на ранние стадии развития.

Эти ранние изменения в развитии могут возникнуть в результате изменения локализации цитоплазматических детерминантов, влияющих на скорость деления одной клетки или группы клеток относительно других или изменяющих расположение клеток во время их деления. В гл. 3 мы упоминали о том, что в результате модификации процесса дробления у моллюсков основная часть цитоплазмы переходит в эктодермальные клетки, образующие раковину личинки. Это обусловлено изменением характера деления бластомеров и распределения цитоплазмы между ними. У кольчатых червей различия между полихетами и олигохетами проистекают из различий в локализации морфогенов в цитоплазме яйца (рис. 23.5). Обеим группам присуще спиральное дробление, однако морфогены у каждой группы распределяются по разным клеткам. Полихеты претерпевают относительно стандартное спи-

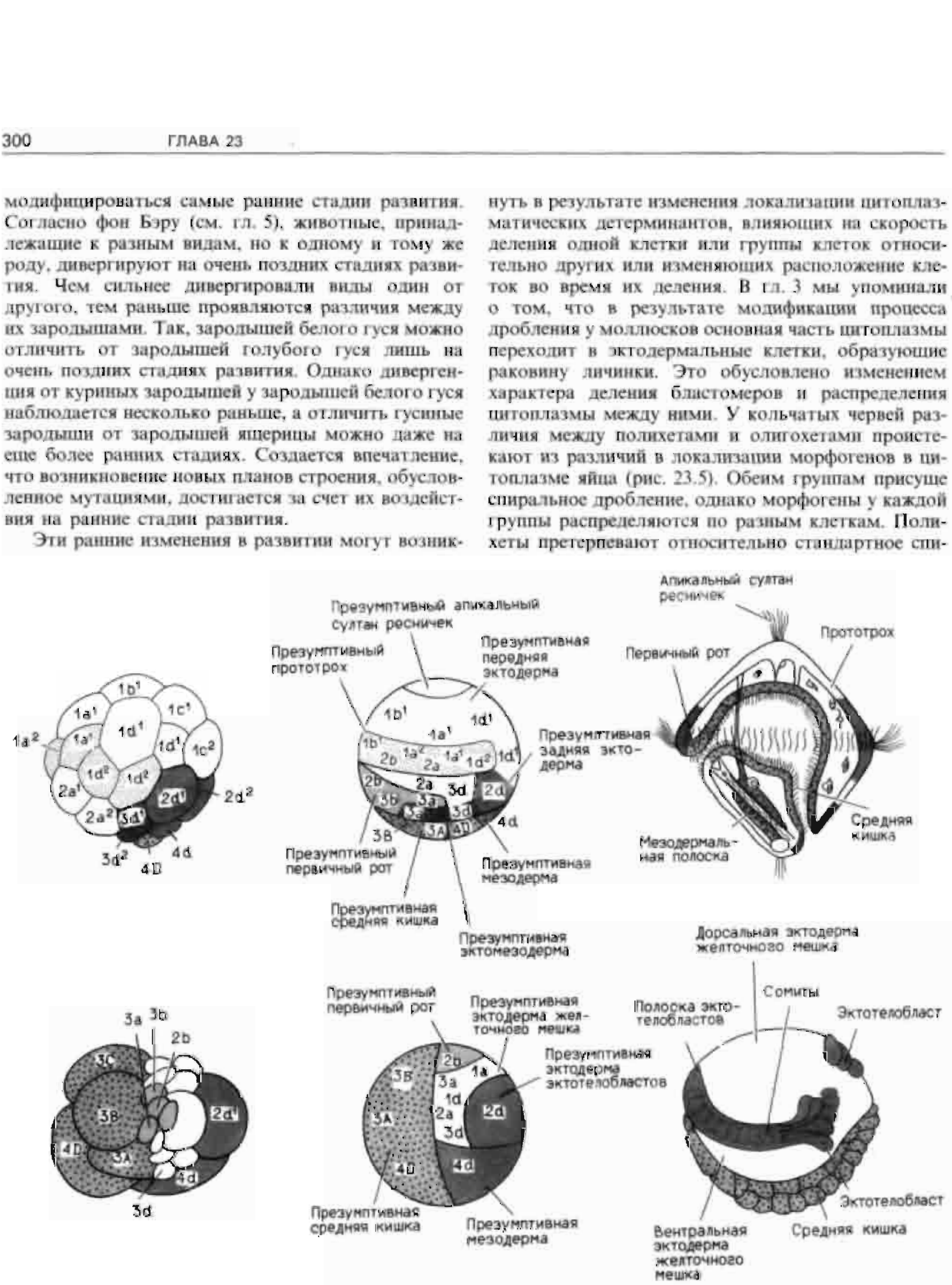


Рис. 23.5. Сопоставление развития представителей двух классов кольчатых червей: полихеты *Podarke* (*верхний ряд*) и олигохеты *Tubifex* (*нижний ряд*). Показаны дробление (*слева*) карты зачатков на стадии бластулы (*в середине*) и гаструляция у *Tubifex* (*внизу справа*). У *Podarke* гаструляция ведет к образованию трохофоры (*вверху справа*). У *Tubifex* личиночная стадия отсутствует, и зародыш непосредственно развивается в сегментированную взрослую особь. (По Raff, Kaufman, 1983).

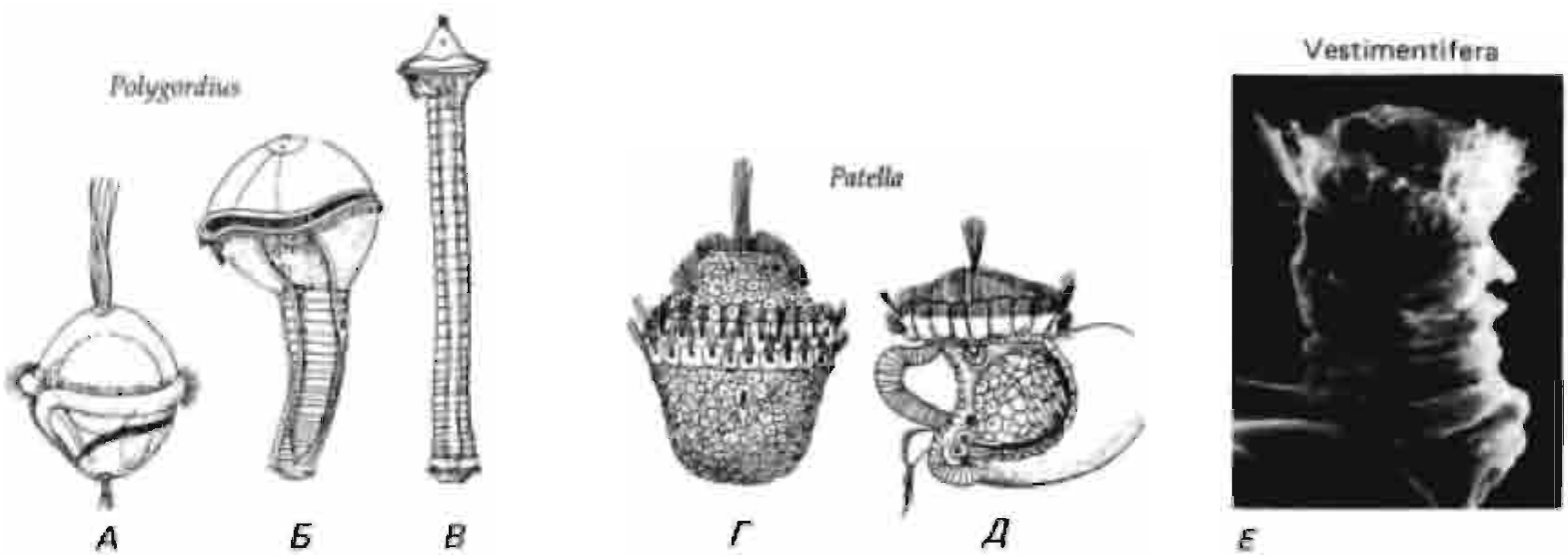


Рис. 23.6. Дивергенция развития после прохождения личиночной стадии – трохофоры. *А – В*. Формирование сегментированного туловища у многощетинкового кольчатого червя *Poligordius* в процессе метаморфоза из его свободно плавающей личинки трохофоры. В конце метаморфоза, при формировании головы, личиночные структуры на переднем конце тела отмирают. *Г – Д*. Метаморфоз у переднежаберного моллюска блюдечка (*Patella*). По окончании личиночного развития у него развиваются типичная для моллюсков нога, раковинная железа и горбовидное образование (мантия), содержащее висцеральные органы (*Г* – вид спереди; *Д* – вид сбоку). *Е*. Микрофотография трохофоры одного из представителей Vestimentifera, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (*А – D* – по Grant, 1978; *Е* – из Jones, Gardner, 1989; фотография с любезного разрешения авторов.)

ральное дробление, в результате которого образуется типичная для кольчатых червей личинка – трохофора. Что касается олигохет, то у них бóльшая часть цитоплазмы направляется в клетки, предназначенные для образования дефинитивных, а не личиночных структур. Эти клетки как бы пропускают личиночную стадию. Если в результате мутации тот или иной цитоплазматический морфоген попадает вместо одного участка яйца в другой или же если мутация вызовет изменение оси клеточного деления, так что эти детерминанты попадут в другие группы клеток, то может возникнуть организм с совершенно иным фенотипом. Конклин писал (Conklin, 1915): «Мы позвоночные, потому что наши матери были позвоночными и производили яйца, типичные для позвоночных».

Другой тип эволюции новых типов может быть связан с модификацией личинки. Дарвин и некоторые другие ученые полагали, что сходство между личиночными формами свидетельствует об общем происхождении. Однако это можно переосмыслить в том плане, что изменения, дающие начало различным типам, возникают у личинок. Картины деления брюхоногих моллюсков, эхиурид и полихет очень сходны и у всех трех групп образуются одинаковые личинки – трохофоры (рис. 23.6). В сущности вновь открытый тип Vestimentifera (ярко-красные беспозвоночные, не имеющие кишечника, обнаруженные в так называемых желобах – длинных впадинах на дне океана) систематики поместили вблизи от кольчатых червей именно потому, что у этого типа также личиночная стадия представлена трохофорой (Jones, Gardiner, 1989). Таким образом, одним из главных механизмов возникновения новых типов или классов могла быть перестройка развития на личиночной стадии, в результате чего при метаморфозе появились организации нового типа. Гарстанг (Garstang, 1928) показал, как в результате мутации могла возникнуть личинка некоторых брюхоногих – парусник; эта мутация была поддержана отбором, потому что новое расположение головы и раковины создавало возможность в случае опасности втягивать голову под раковину. Кроме того, Гарстанг сформулировал гипотезу о происхождении хордовых от личинок предковых оболочников, ставших неотеническими. К сожалению, мягкотелые личинки очень редко фоссилизируются, так что у нас крайне мало данных о механизмах, с помощью которых хордовые и другие типы могли возникнуть из раннекембрийских личинок [1].

[1] Личиночные формы часто используют для заполнения разрывов между различными взрослыми формами. Личиночная форма рассматривается либо как предковая для двух групп, либо как «оторвавшаяся» в результате неотении и образовавшая организм иного типа. Это нередко выдвигали в качестве предполагаемого механизма возникновения хордовых от беспозвоночных и позвоночных – от хордовых. Развитие торнарии (личинки полухордовых) протекает так, как это свойственно вторичноротым, и сходно с развитием личинок у иглокожих; торнария настолько сходна с последними, что ее вначале принимали за личинку иглокожих. Это позволяло установить связь между иглокожими и хордовыми. Гарстанг (Garstang, 1928) и Берилл (Berrill, 1955) выдвинули гипотезу о том, что некоторые оболочники эволюционировали в такое хордовое, как ланцетник, в результате неотенического развития. Таким образом они могли достигнуть половозрелости, сохраняя хорду, метамерную мускулатуру и ротовой аппарат личинки оболочника. Неотенические свободноплавающие оболочники действительно существуют (напри-

Морфогенетические механизмы эволюционных изменений

Изоляция

Авторы работ последних лет пытались восполнить этот пробел в наших знаниях, занявшись изучением генов, контролирующих эмбриональные и личиночные стадии развития. Одним из способов, с помощью которого изменения в развитии могут вызвать эволюционные изменения, является создание репродуктивной изоляции какой-либо группы в пределах данной популяции. Считается, что такая изоляция имеет существенное значение для формирования новых видов. Мутации, определяющие закрученность раковины у улиток (см. гл. 3), оказывают свое воздействие на ранних стадиях развития, изменяя расположение мезодермальных органов. Скрещивание между левозакрученными и правозакрученными улитками очень затруднено по механическим причинам, а у некоторых видов даже невозможно (Clark, Murray, 1969). Эта мутация наследуется по материнскому типу, в результате чего возникает группа родственных особей, способных скрещиваться между собой, но не с другими членами исходной популяции. Эти репродуктивно изолированные улитки могут расширить область своего распространения и, постепенно накапливая новые мутации, образовать новый вид (Александров, Сергиевский, 1984).

Гомеозис

Крупные изменения в развитии возникают в тех случаях, когда изменяются взаимодействия между генами. Это может привести к появлению новых фенотипов на клеточном уровне, а иногда и на уровне организмов. Как говорилось в гл. 12 и 20, если структурный ген расположен непосредственно за каким-то новым энхансером, то он экспрессируется в те сроки или в том месте, которое детерминируется этим энхансером. Глобиновый ген, помещенный за определенными энхансерами у *Xenopus*, экспрессируется на стадии средней бластулы, а протоонкоген, оказавшийся в результате транслокации около энхансера иммуноглобулинового гена в предшественнике В-клетки, вызывает неконтролируемый рост лимфоцитов. Один из возможных путей изменения дифференцированного фенотипа данной клетки состоит в том, чтобы изменить энхансер какого-либо гена с помощью генной мутации или транслокации.

Эта гипотеза была проверена на гавайских дрозофилах (Rabinow, Dickinson, 1986). У этих двукрылых происходит поразительно быстрое видообразование, причем у нескольких видов оно сопровождается перемещением генной экспрессии в другие ткани. Например, у личинок *Drosophila hawaiiensis* ген алкогольдегидрогеназы (АДГ) обычно экспрессируется в жировых телах и в скелете, а у личинок *D. formella* – только в жировых телах. Эти две АДГ различаются по своей электрофоретической подвижности. При скрещивании этих двух видов дрозофилы образуются гибридные личинки. Как показал анализ, жировые тела гибридов содержат как АДГ *D. hawaiiensis*, так и АДГ *D. formella*. Однако в скелетах гибридных личинок был обнаружен только белок, свойственный *D. hawaiiensis*. Таких результатов следует ожидать, если гены АДГ контролируются *цис*-регуляторными элементами и если они различаются у этих двух близкородственных видов. (Если бы экспрессия контролировалась *транс*-регуляторными элементами, то оба гена были бы либо включены, либо выключены.) Таким образом, создается впечатление, что энхансеры в процессе эволюции могут изменяться, что приводит к синтезу различных продуктов в разных тканях.

Если фенотипы клеток могут изменяться при изменении *цис*-регуляторных элементов структурных генов, то изменения, возникающие в результате изменений *транс*-регуляторных факторов, могут быть еще более значительными. В гл. 12 и 18 мы рассматривали гомеозисные трансформации у дрозофилы. Эти мутации вызываются изменениями некоторых *транс*-регуляторных факторов, связывающих энхансеры. В конце тридцатых годов Ричард Гольдшмидт (Richard Goldschmidt) и Конрад Х. Уоддингтон (Conrad H. Waddington) отмечали, что гомеозисные мутации дают возможность связать воедино развитие, генетику и эволюцию. Уоддингтон (1940) подчеркивал, что гомеозисные гены представляют собой переключатели, аналогичные переключателям на железнодорожных сортировочных горках, направляющих составы на тот или другой путь. Как полагал Гольдшмидт (1938), гомеозисные гены вызывают у зародыша несколько крупных изменений одновременно, что ведет к формированию новых видов. Привлекая внимание к гомеозисным трансформациям, эти ученые шли далеко впереди науки своего времени.

Во многих отношениях фенотипы, возникающие при гомеозисных делециях, сходны с постулированными ранними стадиями эволюции *Drosophila* (рис. 23.7). Считается, что *Drosophila*, принадлежащая к отряду двукрылых (Diptera), произошла от обычных четырехкрылых насекомых. Двукрылость могла возникнуть в результате делеции участка *Ubx* комплекса *bithorax*. Крылатые насекомые (Pterigo-

---

мер, Larvacea). В несколько модифицированном виде (исходя из другого ствола Protochordata) эту точку зрения недавно изложил Джеффрис (Jefferis, 1986). Происхождение хордовых до сих пор остается трудной проблемой.

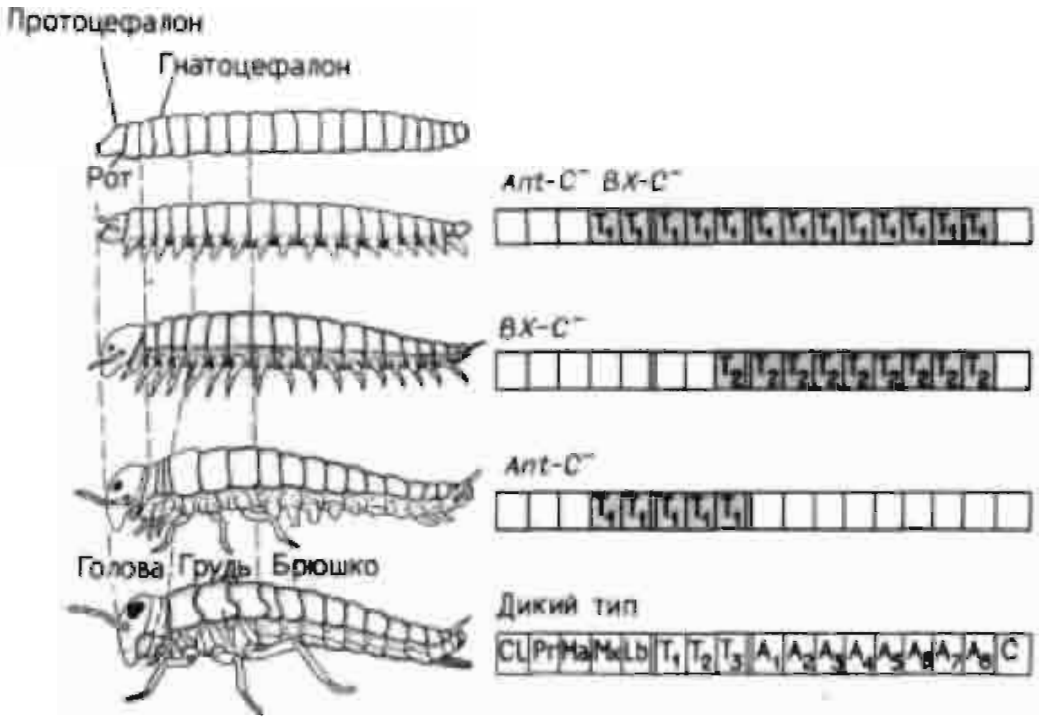


Рис. 23.7. Схема предполагаемой эволюции насекомых, происходившей путем добавления функций гомеозисных генов. *А*. Кольчецы. *Б*. Онихофоры. *В*. Многоножки. *Г*. Бескрылые насекомые. *Д*. Крылатые насекомые. Справа от каждого рисунка – генетическая конституция зародыша дрозофилы, которая приводит к развитию сегментированной структуры, сходной с сегментацией изображенных организмов. (По Raff, Kaufman, 1983.)

ta), как полагают, произошли в процессе эволюции от бескрылых (Apterigota) насекомых. Это событие имитирует делеция гена *Antennapedia*, в отсутствие которого вся грудь развивается как бескрылый первый грудной сегмент. Считается, что бескрылые насекомые произошли от сходного с многоножками (Millipedia, Centipedia) существа; такое могло произойти при полной утрате геномом этого существа комплекса bithorax и при развитии задней части зародыша как грудного сегмента, несущего конечности. Наконец, если удалить оба набора гомеозисных генов (комплексы *Antennapedia* и *bithorax*), то развивается зародыш, сходный с самыми примитивными среди известных членистоногих – онихофорами. Рэфф и Кофмен пишут (Raff, Kaufman, 1983): «Таким образом, постепенно удаляя относительно небольшие количества генетического материала, нам удалось пройти довольно большой отрезок эволюционного пути» [1].

[1] Рэфф и Кофмен также предостерегают нас, что эти интересные аналогии не следует воспринимать чересчур буквально. В результате делеции из генома *Drosophila* генов *Antennapedia* получается сильно отклоняющаяся личинка мухи, но не многоножка. Подобным же образом четырехкрылые мухи, образующиеся в результате мутаций в *Ultrabithorax*, несут по две пары передних крыльев, а не пару передних и пару задних крыльев. Однако недавние исследования указывают на некоторые удивительные черты сходства между сегментацией у дрозофилы и позвоночных. Например, и у позвоночных, и у дрозофилы последовательность гомеозисных генов в хромосоме соответствует последовательности их экспрессии на переднезадней оси зародыша (дрозофила) или спинном мозге (позвоночные). Гены комплексов *Antennapedia* и *bithorax*, расположенных в третьей хромосоме дрозофилы, экспрессируются в той же последовательности по переднезадней оси, как гены *Hox-2*, находящиеся в 11-й хромосоме мыши (размышления об эволюции этих генов, детерминирующих тип структуры, см. Holland, 1990). Недавно было установлено, что в сегментах заднего мозга курицы имеются ограничения, определяемые границами между клеточными линиями (подобно границам между компартментами у дрозофилы); это также подтверждает гипотезы, постулирующие общность происхождения метамерных структур у насекомых и позвоночных (Fraser et al., 1990).

Новые типы клеток могли также создаваться при возникновении новых комбинаций генов. Одним из крупных изменений, происходивших в типах животных, было возникновение клеток с новыми свойствами. Кауфман (Kauffman, 1988) построил математическую модель возникновения новых типов клеток из произвольно созданного генома, состоящего из 10 000 генов, каждый из которых регулируется двумя другими генами. Он обнаружил при этом только 100 стабильных состояний (из $2^{10\,000}$ возможных). Каждое из этих стабильных состояний представляет собой отдельный дифференцированный тип клеток. В некоторых случаях достаточно возникновения мутации в одном регуляторном гене, чтобы произошла перестройка взаимодействий и был создан новый тип клеток. Однако бóльшую часть остальных генов это новое событие не затрагивает. Создание нового типа клеток в природе происходит редко и часто при этом изменяются характерные особенности данного животного. Например, клетки нервного гребня у позвоночных отличаются от клеток нервного гребня у протохордовых (полухордовые, личиночнохордовые и бесчерепные) (рис. 23.8). У протохордовых имеется нервная трубка и хорда, но нет настоящей «головы». Краниальные клетки нервного гребня играют значительную роль в развитии лицевых структур, черепной коробки и жаберных дуг. Считают, что развитие головы первоначально способствовало более эффективному хищничеству, поскольку при этом сенсорные структуры оказались рядом с че-



Рис. 23.8. Изменения в развитии, возникшие в процессе эволюции от беспозвоночных к позвоночным. От первых вторичноротых беспозвоночных произошли иглокожие и те организмы, которые в конечном итоге дали начало линии позвоночных. Способность мезодермы образовать хорду, а лежащей над ней эктодермы – превратиться в нервную трубку отделило хордовых от беспозвоночных. Развитие клеток нервного гребня и эпидермальных плакод, из которых образуются сенсорные нервные волокна, отличает позвоночных от протохордовых. (По Langille, Hall, 1989; Gans, 1989.)

люстями, схватывающими жертву (Gans, Northcutt, 1983; Langille, Hall, 1989). Как показано на рис. 23.8, предполагается, что позвоночные произошли от беспозвоночных в несколько этапов, связанных с формированием и модификацией новых типов клеток.

Развитие и эволюция в пределах сложившихся планов строения

Ограничения, налагаемые развитием

Мы уже отмечали, что число планов строения у животных относительно невелико и что можно без труда представить себе такие планы строения, которые не встречаются среди существующих типов животных. Почему число главных типов животных не может быть больше? Чтобы ответить на этот вопрос, мы должны рассмотреть ограничения, налагаемые на эволюцию. Существуют три основных класса ограничений, сдерживающих морфогенетическую эволюцию. Во-первых, как уже говорилось в гл. 20, на строении организма сказываются **физические ограничения**. Диффузионные и гидравлические факторы, а также необходимость механической прочности создают ограничения, при которых возможно существование лишь некоторых механизмов развития. Так, например, позвоночное не может обладать конечностями, работающими по принципу колеса, ввиду невозможности обеспечить кровоснабжение вращающегося органа. Следовательно, эволюция в этом направлении была исключена. Сходным образом структурные и гидродинамические факторы налагают запрет на существование комаров высотой 1,5 м.

Во-вторых, имеется ряд ограничений, связанных с **морфогенетическими правилами строения** (Oster et al., 1988). Бэтсон (Bateson, 1894) заметил, что если организмы отклоняются от своего нормального развития, то отклонения эти могут происходить лишь несколькими способами, число которых ограничено. Были проведены исследования с целью выявить структурные параметры, лежащие в основе строения организмов, и показать, как эти параметры могут модифицироваться в процессе эволюции. Некоторые наиболее наглядные примеры подобного рода ограничений дает анализ формирования конечностей у позвоночных. Холдер (Holder, 1983) указывает, что, несмотря на многочисленность



Рис. 23.9. Несколько «запрещенных» и несколько «разрешенных» планов строения конечностей четвероногих. (Из Thomson, 1988.)

модификаций конечностей позвоночных, происходивших на протяжении последних 300 млн. лет, некоторые модификации не были обнаружены ни разу (рис. 23.9). Кроме того, как показывает изучение природных популяций, число возможных способов изменения конечности относительно невелико (Wake, Larson, 1987). Если для данной среды лучше иметь длинную конечность, то плечевая кость становится длиннее. Никто никогда не видел две маленькие плечевые кости, соединенные последовательно, хотя нетрудно представить себе, какие селективные преимущества могло бы иметь такое расположение. Это свидетельствует о том, что схема строения подчиняется определенным правилам.

Основные правила формирования конечности были сформулированы Остером и др. (Oster et al., 1988). Эти авторы установили, что известные нам типы строения конечности, равно как и «запрещение» других типов строения можно объяснить с привлечением реакционно-диффузионной модели. Как уже говорилось в гл. 17, эта модель исходит из того, что скопления хряща активно мобилизуют дополнительные клетки из окружающей области и подавляют формирование латеральных очагов конденсации. Число очагов зависит от геометрии ткани и от латерального ингибирования. Если сила ингибирования не изменяется, то должен возрасти объем ткани, чтобы сделать возможным образование двух очагов там, где прежде допускалось образование лишь одного. Когда этот объем достигает определенной пороговой величины (называемой порогом бифуркации), почка конечности может разветвиться сформировав два очага.

Результаты экспериментальных исследований и данные сравнительной анатомии подтверждают эту математическую модель. Если обработать почку конечности аксолотля колхицином, подавляющим митоз, то развивается конечность меньших размеров. На таких конечностях пальцы не просто редуцируются, но редуцируются в определенном порядке, в соответствии с тем, чего следовало ожидать, исходя из математической модели и «запрещенных» морфологий. Более того, при редукции определенных пальцев получаются конечности, очень сходные с конечностями прогенетических саламандр; эти саламандры достигают зрелости при меньших размерах, чем их предки, а их конечности развиваются из почек конечностей меньших размеров (рис. 23.10; Alberch, Gale, 1983, 1985). Таким образом, использование реакционно-диффузионного механизма при построении конечностей, по-видимому, ограничивает возможности, возникающие во время развития; соблюдение этих правил допускает построение конечностей лишь нескольких типов.

Третью группу ограничений, сдерживающих эволюцию структур новых типов, составляют **филетические ограничения** (Gould, Lewontin, 1979), т. е. исторические ограничения, основанные на генетике развития данного организма. Например, коль скоро в результате индукционных взаимодействий возникает та или иная структура, начать весь процесс сызнова трудно. Так, хорда, которая все еще функционирует у взрослых протохордовых (Berrill, 1987), у птиц и млекопитающих считается рудиментом. Возможно, однако, что она в течение некоторого времени необходима зародышу, определяя развитие нервной трубки. Аналогичным образом Уоддингтон (Waddington, 1938) отмечал, что хотя пронефрос у куриного зародыша считается рудиментом, поскольку он неспособен концентрировать мочу, из него развивается зачаток мочеточника, индуцирующий формирование функциональной почки в процессе развития курицы.

Обзор филетических ограничений этого типа недавно опубликовали Рэфф и др. (Raff et al., 1991). Прежде считалось, что самые ранние стадии развития изменить труднее всего, поскольку в результате вмешательства зародыш либо погибнет, либо у него возникнет совершенно новый фенотип. Но данные, полученные в недавних работах (и переоценка старых), показали, что на ранних стадиях развития можно производить изменения, не нарушая дефинитивную форму. Изменяя морфогены у зародышей моллюсков, можно получить личинки новых типов, которые, метаморфизируя, все же дают моллюсков, а изменение цитоплазматических морфогенов у зародышей морских ежей может привести к развитию, протекающему без личиночной стадии, но приводящему тем не менее к формированию морских ежей. В сущности, глядя на позвоночных, можно видеть, что к знаменитой схеме фон Бэра ведет длительный

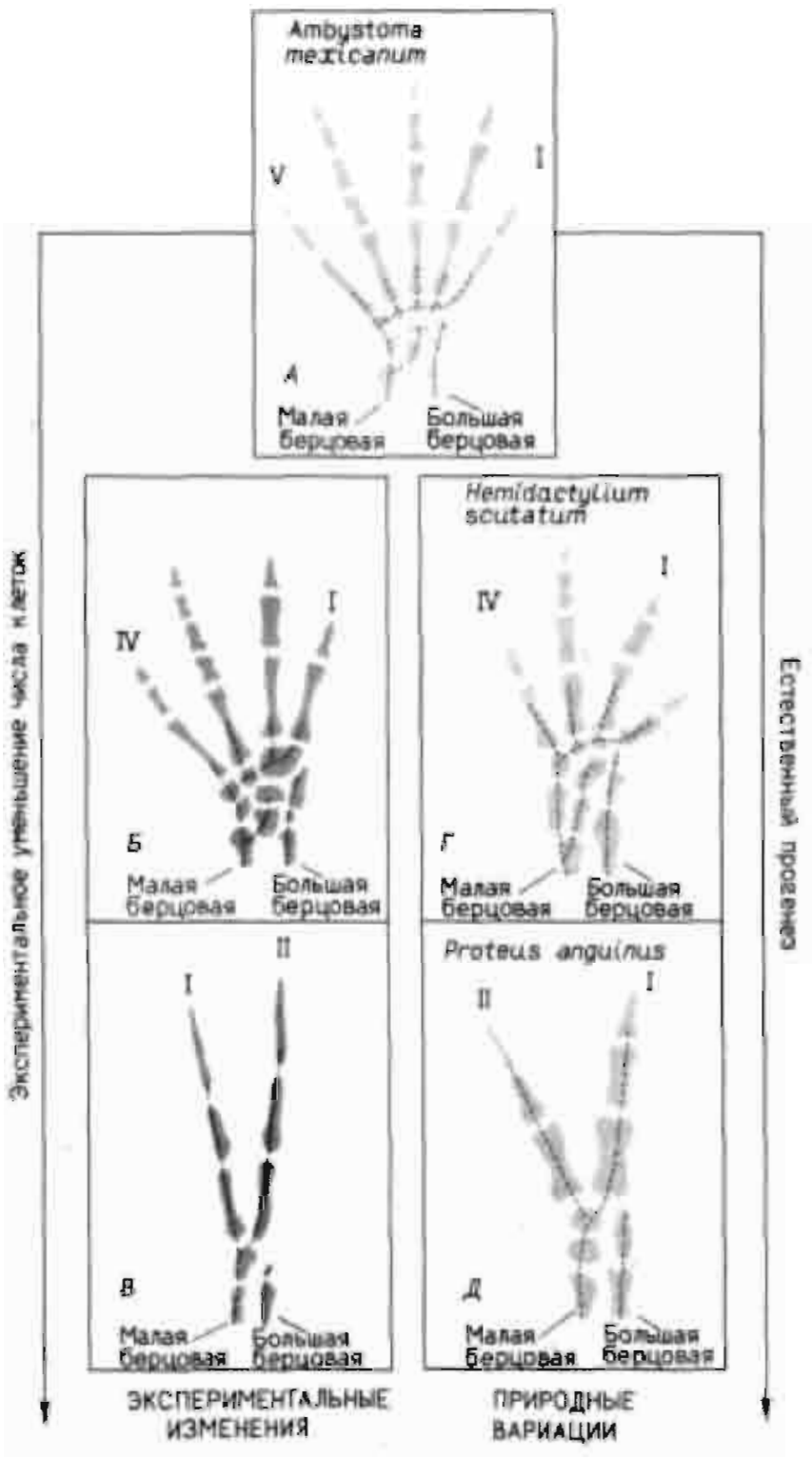


Рис. 23.10. Зависимость между числом клеток и числом пальцев у хвостатых амфибий. *А*. Задняя конечность аксолотля (*Ambystoma mexicanum*) с пятью симметричными пальцами. *Б, В*. Пальцы задней конечности аксолотля, развившиеся после инкубации почки конечности в колхицине для уменьшения числа клеток. *Г, Д*. Две амфибии (*Г – Hemidactylium scutatum; Д – Proteus anguinus*), возникшие в результате прогенеза; у обеих форм почка конечности меньше нормальной. Можно видеть параллельность экспериментальной и природной изменчивости, а общим знаменателем служит уменьшение числа клеток в почках конечностей. (По Oster et al., 1988.)

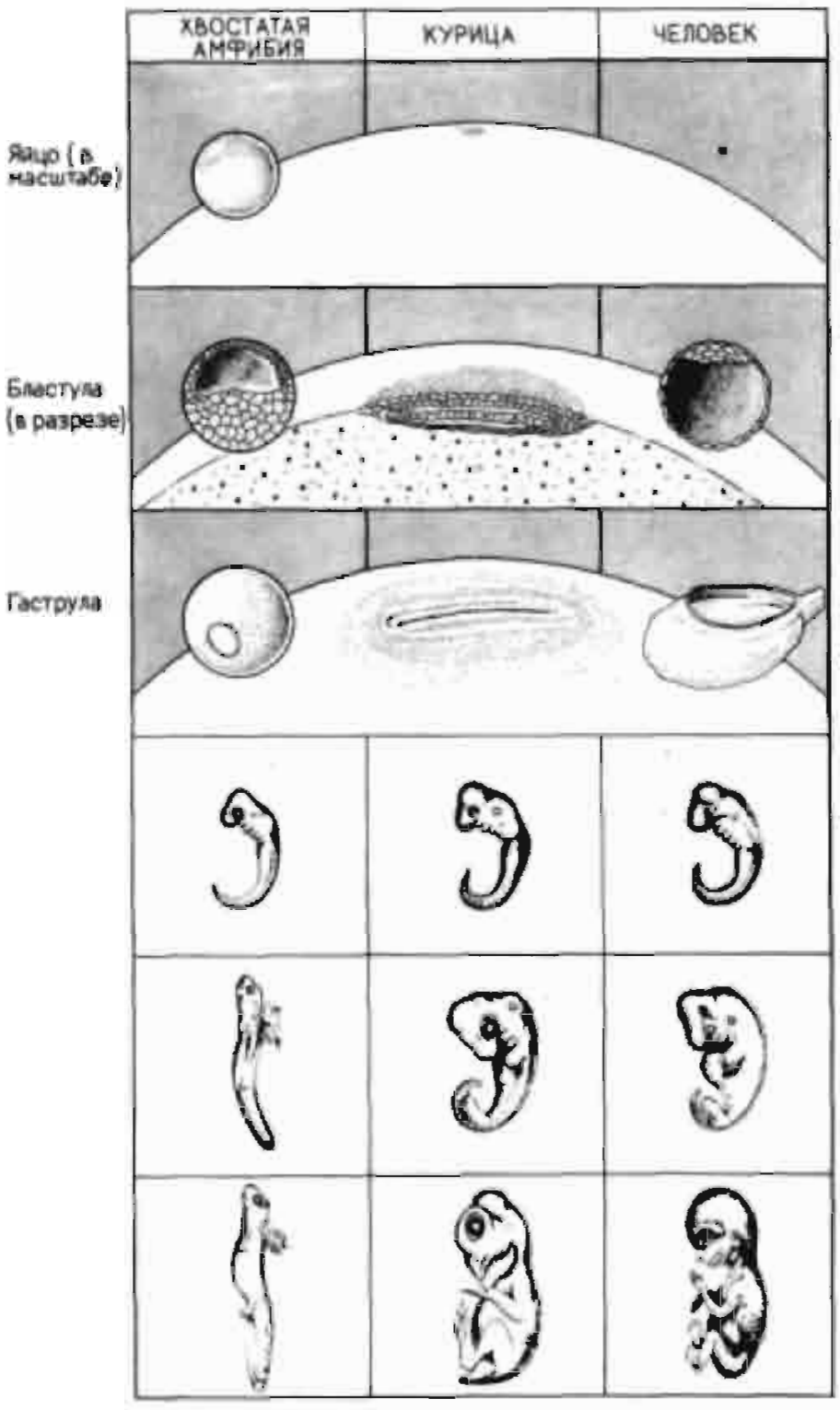


Рис. 23.11. «Узкое горлышко» на стадии «фарингулы» в развитии позвоночных. В нижней части рисунка приведена стандартная иллюстрация закона фон Бэра (см. гл. 5), демонстрирующая дивергенцию классов позвоночных после общей эмбриональной стадии. В верхней части рисунка изображено дивергентное начало развития. Сам фон Бэр (Von Baer, 1886) сознавал наличие такого «узкого горлышка». (По Elinson, 1987.)

исторический процесс (см. гл. 5). Все позвоночные достигают этой особой стадии развития (называемой «фарингулой»), однако делают они это разными способами (рис. 23.11). Птицы, рептилии и рыбы доходят до этой стадии с помощью различных вариантов мробластического дробления, амфибии – в результате радиального голобластического дробления, а млекопитающие достигают ее после образования бластоцисты, хориона и амниона. Следовательно, самые ранние стадии развития, по-видимому, крайне пластичны. Сильно различаются также более поздние стадии, о чем убедительно

свидетельствуют резкие различия в фенотипе мышей, лупы-рыбы, змей и тритонов. Что же касается *средних* стадий развития, то они, очевидно, несут в себе нечто постоянное.

По мнению Рэффа формирование новых планов строения тормозится отсутствием последовательностей глобальных индукций на протяжении стадии нейрулы (рис. 23.12). До наступления этого периода происходит несколько индукционных событий. По окончании нейруляции наблюдается огромное число таких событий, но бóльшая их часть носит локальный характер. Однако на ранних стадиях органогенеза происходит одновременно несколько индукционных событий глобального характера. У позвоночных, если воспользоваться примером фон Бэра, на самых ранних стадиях устанавливаются оси зародыша и происходит гаструляция. Широкомасштабная индукция еще не наступает. Кроме того, как показали Рэфф и др. (Henry et al., 1989), на этих стадиях зародыш обладает значительной способностью к регуляции, что допускает небольшие изменения в распределении морфогенов или расположении плоскостей дробления. После определения основного плана строения организма индукционные процессы происходят во всех его частях, однако они компартментализованы по дискретным органообразующим системам. Хрусталик индуцирует образование роговицы, а если это почему-либо не состоится, то нарушается только развитие глаза. Подобным же образом индукционные процессы определяют формирование в коже перьев, чешуй или волосяного покрова. В отсутствие индукции кожа или отдельный ее участок остается голой. Однако на ранних стадиях органогенеза эти взаимодействия носят более глобальный характер (Slack, 1983). На индукционные процессы в глазах может оказать воздействие нарушение нормального расположения сердца (см. гл. 16). Нарушение индукции мезодермы в определенном участке ведет к нарушениям развития почек, конечностей и хвоста. Именно на стадии органогенеза наступают ограничения эволюционных возможностей и закладываются особенности, характерные для типа позвоночных. Таким образом, коль скоро зародыш стал приобретать черты позвоночного, ему трудно превратиться во что-то другое.

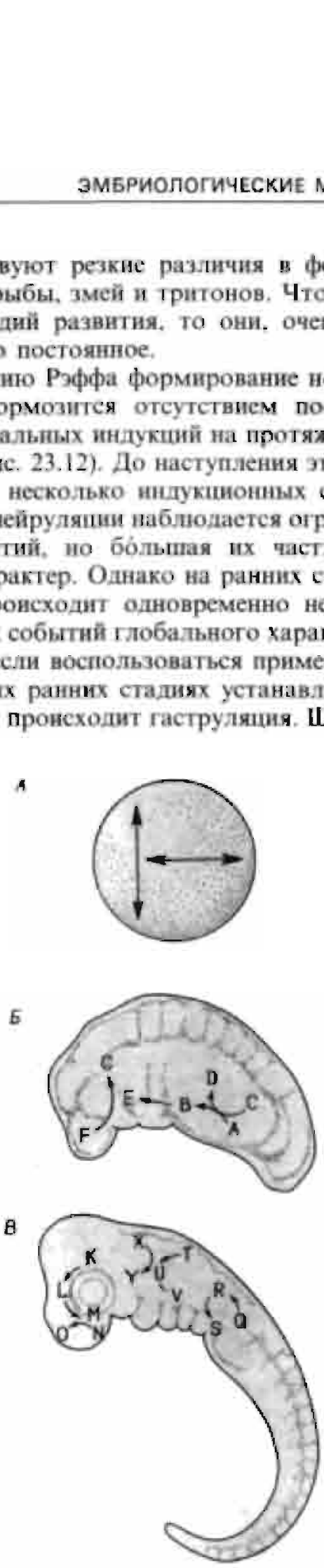


Рис. 23.12. Механизм «узкого горлышка» на стадии фарингулы в развитии позвоночных. *А*. На стадии дробления происходят глобальные взаимодействия, однако число их очень невелико и они главным образом определяют расположение осей зародыша. *Б*. В период от стадии нейрулы до стадии фарингулы число глобальных взаимодействий значительно увеличивается. После стадии фарингулы (*В*) число индуктивных взаимодействий становится еще больше, но их эффекты в основном локальны и не выходят за пределы их собственных полей. (R. A. Raff, личное сообщение).

Индуктивные взаимодействия и генерация новых структур

Помимо того что индукционные взаимодействия способны ограничивать развитие, они могут быть изменены, в результате чего возникают эволюционные новшества. Впервые такое предположение высказал Вальтер Гарстанг (Walter Garstang). В первые десятилетия XX в. связь между эмбриологией и эволюцией рассматривалась в свете «биогенетического закона» Эрнста Геккеля (см. «Дополнительные сведения и гипотезы», на стр. 309). Согласно этому закону, онтогенез (развитие нового индивидуума) повторяет филогенез (стадии, через которые проходит новый вид в процессе своего становления). В 1922 г. Гарстанг резко раскритиковал биогенетический «закон», показав, что он несовместим с менделевской генетикой и эмбриологическими данными. Гарстанг поставил этот закон с ног на голову. По его мнению, онтогенез не повторяет филогенез, а создает его. Животные, возникшие на более поздних стадиях эволюции, появились не в результате добавления новых стадий к уже существующему филогенезу, а в результате мутаций, затрагивающих взаимодействия между модулями, уже имеющимися в плане строения данного организма: «Дом – это не

коттедж с еще одним надстроенным этажом. Дом – это более высокая ступень в эволюции жилых помещений, и хотя он строится из таких же кирпичей, как коттедж, но все остальное – фундамент, деревянные конструкции, крыша – у него другое».

Таким образом, когда мы говорим, что современная однопалая лошадь произошла от пятипалого предка, мы имеем в виду, что в процессе эволюции лошади в дифференцировке мезодермы конечности в хондроциты, происходящей в эмбриогенезе, возникли наследуемые изменения. В таком аспекте эволюция предстает как результат наследственных изменений, воздействующих на развитие. Так обстоит дело и в том случае, когда данная мутация ведет к превращению зародыша рептилии в птицу или же к изменению цвета глаз у дрозофилы.

Поэтому, несмотря на то что существует примерно тридцать установившихся планов строения, изменения, возникающие в процессе развития, могут тем не менее вызывать глубокие эволюционные изменения. Изменения в индукционных процессах ведут к разнообразным морфогенетическим изменениям самыми разными путями. Такие изменения могут превратить чешую в перья (как у кур бентамской породы) или вызвать столь необыкновенные адаптации, как легкие птиц, желудок жвачных или бивни слонов (измененные резцы) и моржей (измененные верхние клыки). Все секреторные железы эпидермиса возникают в результате модификаций индукции одного и того же типа; так, млечные железы – это потовые железы, модифицированные в процессе эмбриогенеза. Подобным же образом устрашающие ряды акульих зубов – модификации чешуй, покрывающих тело. Берк (Burke, 1989a) даже высказала мнение, что все вторичные индукции имеют общее происхождение (рис. 23.13).

Один из интересных моментов в схеме Берк относится к механизму, используемому для создания конечностей (апикальный эктодермальный гребень совместно с пластичной мезодермой, об-

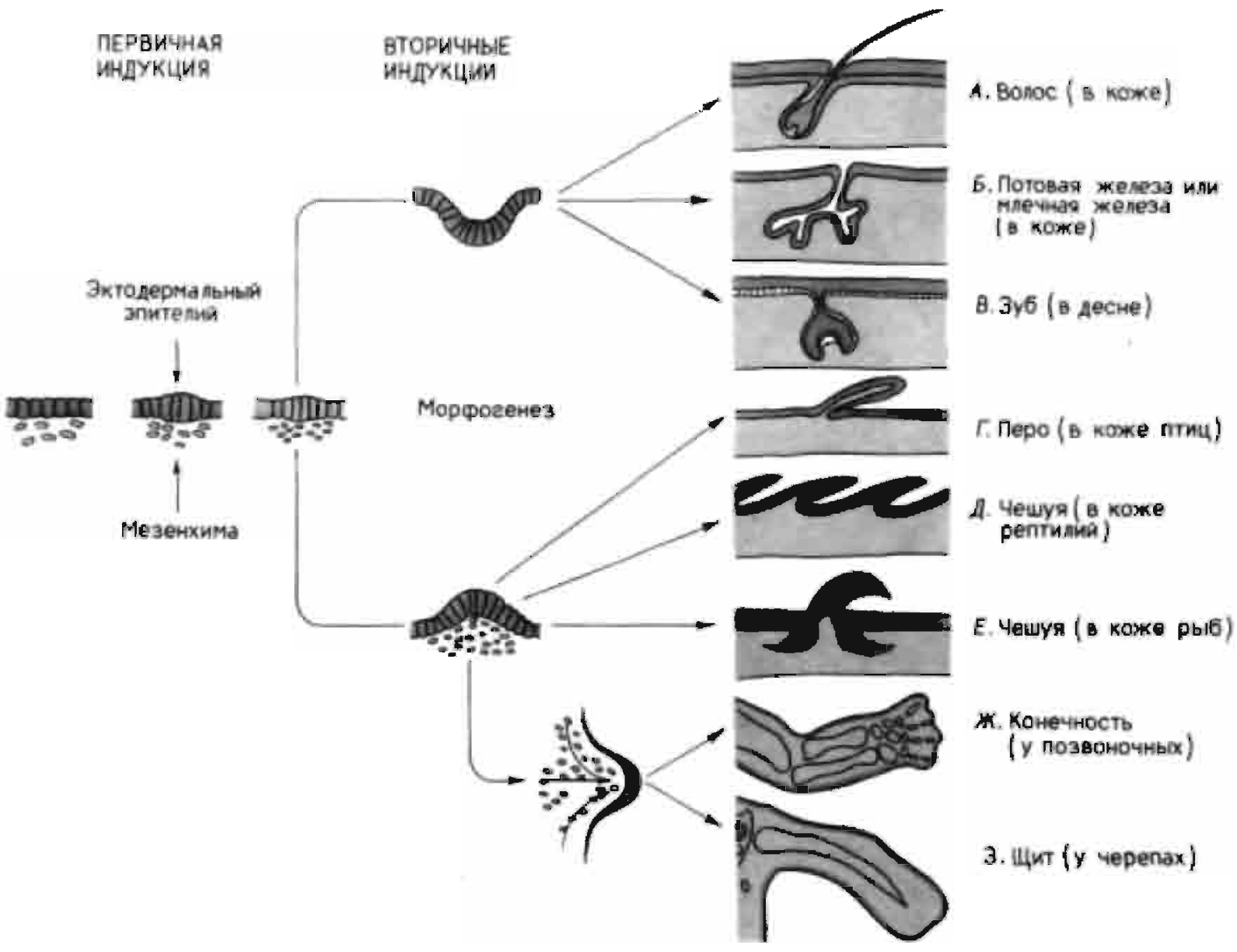


Рис. 23.13. Взаимосвязи между эпидермально-мезенхимными индукциями. Во время морфогенеза мезенхима может вызвать инвагинацию (*А – В*) или эвагинацию (*Г – Е*) прилежащего эпидермиса. В некоторых случаях, как, например, при формировании конечностей или панциря черепахи, мезенхима индуцирует формирование апикального эктодермального гребня (*Ж, З*). (По Burke, 1989a).

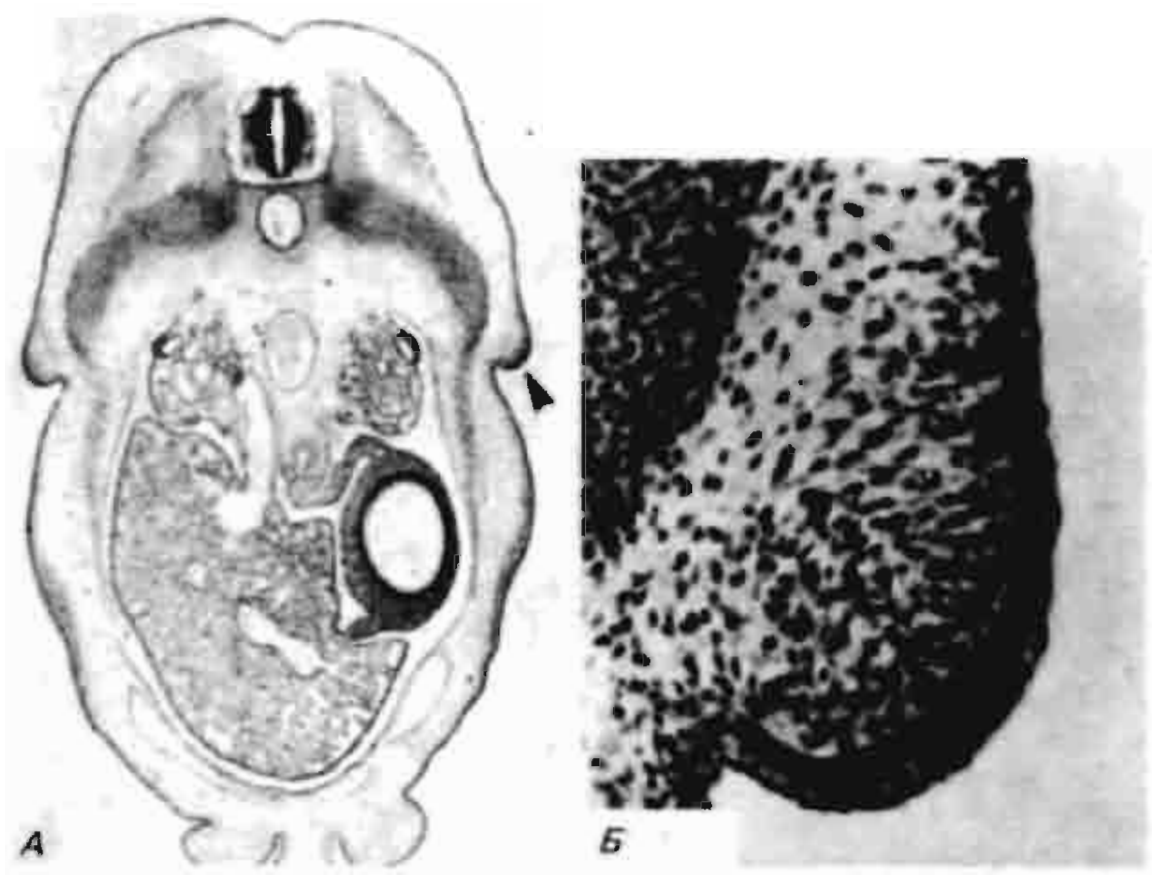


Рис. 23.14. Поперечный срез из области средней части туловища зародыша черепахи *Chelydra serpentina*. *А*. На границе между мезодермой сомита и мезодермой боковой пластинки образуется почка щита (показана стрелкой), которая обозначает теперь границу между дорсальной и вентральной сторонами. Утолщенные полоски мезодермы, тянущиеся из центра в область верхнего щита, представляют собой скопления клеток, из которых будут образовываться ребра. *Б*. Почка щита при большем увеличении. (Из Burke, 1989; фотографии с любезного разрешения автора.)

разующей хрящ). Она установила, что в одном семействе позвоночных этот же механизм используется в другом участке тела. Панцирь черепахи образуется в результате размещения эпителио-мезенхимного взаимодействия в новой области. Как показано на рис. 23.14, «панцирный» гребень образуется таким же образом, как и апикальный эктодермальный гребень почки конечностей. Характер пролиферации клеток и распределения таких адгезивных гликопротеидов, как N-МКА и фибронектин, также сходны с тем, что наблюдается при формировании конечности (Burke, 1989b). Образование «дополнительных» лучей у иглокожих также вызывается индукцией. У морской звезды формирование пяти лучей индуцируется пятью выростами гидроцеля, воздействующими на эпидермис. Однако у шестилучевой морской звезды *Leptasterias hexactis* образуется шесть выростов, а у девятилучевых морских звезд *Solaster* – девять (Gemmill, 1912).

Дополнительные сведения и гипотезы

Эрнст Геккель и биогенетический закон

Гибельный союз эмбриологии и эволюционной биологии был сфабрикован во второй половине XIX в. немецким эмбриологом и философом Эрнстом Геккелем (Ernst Haeckel). Основываясь на допущении, что законы, в соответствии с которыми появляются на нашей планете новые виды (филогенез), идентичны законам, по которым протекает развитие составляющих эти виды индивидуумов (онтогенез), Геккель рассматривал взрослые организмы как эмбриональные стадии организмов, более продвинувшихся в своем развитии. Эту точку зрения он сформулировал в своем «биогенетическом законе»: онтогенез повторяет филогенез. Иными словами, развитие более продвинутых видов проходит через стадии, представленные взрослыми организмами более примитивных видов.

С такой точки зрения создание каждого нового типа – это шаг к завершению развития человека. В ранние эпохи происходили только начальные стадии этого развития, в результате чего появились протисты и кишечнополостные. Затем к ним последовательно добавлялись все новые и новые стадии, пока не появился человек. Согласно Геккелю, достаточно трех законов, чтобы объяснить, как этот прогрессирующий онтогенез мог привести к возникновению новых видов. Во-первых, это закон соответствия: зигота человека, например, представлена «взрослой» стадией протистов; колониальные протисты соответствуют более продвинутой стадии развития зародыша – стадии бластулы; человеческому зародышу на стадии жаберных щелей соответствует взрослая рыба. Геккель даже постулировал

некий вымерший организм – *гастрею*, которая представляла собой двуслойный мешок, соответствующий стадии гаструлы, и которую он считал предком всех видов Metazoa. Во-вторых, это закон о надставках, или добавлениях, к конечным стадиям развития предка. Зародыш, развиваясь, дает новый вид, добавляя к уже имевшимся стадиям еще одну, новую стадию. Исходя из этого следует считать, что возникновение человека произошло в результате добавления новой стадии к развитию зародыша ближайшей к нему человекообразной обезьяны. Таким образом, это была линейная, а не ветвящаяся филогения. Наконец, третьим был закон усечения, согласно которому предшествующее развитие могло быть урезано. Этот закон был необходим, чтобы предотвратить чрезмерную продолжительность периода внутриутробного развития. Он был необходим также потому, что эмбриологам не удалось обнаружить все указанные стадии у всех животных.

Представление об онтогенезе, повторяющем филогенез, не было дарвинизмом. В сущности синтез Геккеля был попыткой слить воедино работы Дарвина, Ламарка и Гёте. С точки зрения дарвинизма все современные виды имели общего предка. В результате филогения представляла собой сильно разветвленный куст. (Филогению сравнивали также с деревом, но у дерева имеется центральный ствол, который ученые нередко отождествляли с линией, ведущей к *Homo sapiens*.) Таким образом, человек не «выше» шимпанзе – просто у них имеется общий предок, от которого дивергировали обе группы. По схеме Геккеля животные движутся к новым уровням, добавляя к уже существующему эмбриональному развитию дополнительные статьи.

Интересно указать, что фон Бэр (von Baer, 1828) опроверг «биогенетический закон» еще до того, как Геккель его создал. Высмеивая доэволюционные формы этого закона, фон Бэр фантазировал, что́ могло бы получиться, если бы птицы вздумали писать учебники эмбриологии.

> «Вообразите себе, что птицы, изучив собственное развитие, взялись бы исследовать строение взрослого млекопитающего и человека. Разве мы не прочитали бы в написанных ими учебниках физиологии следующее: «Эти четверо- и двуногие животные во многом сходны с нашими собственными зародышами: кости их черепа не сращены; у них нет клюва, так же, как и у нас в первые пять или шесть дней насиживания; все их конечности очень сходны друг с другом, как и у нас в тот же самый период; на их теле нет ни одного настоящего пера, а лишь очень тонкие стержни, так что когда мы, уже оперившись, сидим в гнезде, мы уже достигли в своем развитии такого уровня, какого им никогда не удастся достичь... И эти-то млекопитающие, которые в течение столь долгого времени после появления на свет не в состоянии сами добывать себе пищу, которые никогда не смогут оторваться от земли, считают себя более высокоорганизованными, чем мы?»

Наблюдая за развитием, фон Бэр (см. гл. 5) заметил, что зародыши никогда не повторяют взрослые стадии других животных. Однако некоторые стадии у зародышей родственных животных сходны. Все позвоночные в процессе эмбрионального развития проходят через стадию, на которой у них имеются жаберные щели. У рыб они превращаются в настоящие жабры, тогда как у других позвоночных они преобразуются в элементы нижней челюсти или органы слуха. Но зародыши лягушки или человека никогда не проходят через стадию, на которой у них имелись бы структуры, типичные для взрослой рыбы. Однако, даже несмотря на то что фон Бэр и другие дискредитировали представление о рекапитуляции, она стала одной из самых популярных концепций в биологии [1].

[1] Еще менее критически, чем в биологии, «биогенетический закон» Геккеля был воспринят многими из только что начавших формироваться социальных наук. Первые антропологи поддерживали идею о том, что другие культуры «примитивны» в эмбриологическом смысле слова и что их развитие закончилось раньше, чем наше. Ведь еще до сих пор для определения таких культур пользуются словом «слаборазвитые». Геккель также чувствовал, что разные расы в пределах вида *Homo sapiens* можно расположить по их «рангу» в линейном порядке, и тем самым «научно» обосновал расовые предрассудки, достигшие кульминации в политике геноцида Третьего рейха (подробности см. Gasman, 1971; Gould, 1977a, b; Stein, 1988). Гоулд показал, что рекапитуляцию можно использовать в ограниченной степени при исследовании формирования родственных видов, но что ее нельзя рассматривать как универсальное явление.

Прогрессивное развитие корреляции

В тех случаях, когда в процессе эволюции морфология коренным образом перестраивается, необходимо выявить изменения в развитии, вызвавшие эту перестройку. Еще в 1872 г. Жорж Миварт (St. George Mivart) указывал, что простое изменение одной из структур данного организма не может вызвать крупных эволюционных изменений. Для этого должна измениться целая группа структур. Берг (Berg, 1960) назвала эти одновременно изменяющиеся созвездия признаков «корреляционными плеядами». Механизм, создающий возможность для таких изменений, получил название **коррелированного развития** и занимал важное место в эмбриологических исследованиях начала века. Шпеман (Spe-

mann, 1901) написал большую работу на эту тему, поскольку она имела прямое отношение к его исследованиям по образованию хрусталика. Хрусталик, как утверждал Шпеман, развивается лишь при индуцирующем воздействии со стороны других тканей (таких, как глазной пузырь), формирующих структуры глаза. Аналогичным образом хрящ определяет расположение мышц, а мышцы – расположение нервных волокон. Томсон (Thomson, 1988) использовал эту концепцию для того, чтобы объяснить, как одна часть данного организма может измениться, не нарушая при этом координированности его строения в целом: если какая-либо структура изменяется, то она индуцирует одновременное изменение других структур. В этом и заключается принцип прогрессивного развития корреляции.

Одним из лучших примеров такого прогрессивного развития корреляции служит формирование нижней челюсти у позвоночных (см. обзор Gould, 1990). У первых позвоночных челюстей не было. С образованием хрящевых элементов, поддерживающих жаберные щели, первая пара этих элементов, по-видимому, окружив рот, образовала челюсти. Имеются убедительные данные, свидетельствующие о том, что челюстная дуга представляет собой модифицированные хрящевые жаберные дуги. Во-первых, обе эти кости образуются из клеток нервного гребня, а не из мезодермальной ткани (как бóльшая часть костей). Во-вторых, обе структуры состоят из верхних и нижних отделов, которые сочленяются друг с другом. В-третьих, челюстная мускулатура, по-видимому, гомологична мускулатуре жаберных дуг. Таким образом, первое преобразование первой жаберной дуги состояло в превращении жаберного аппарата в челюстной аппарат. Но на этом дело не закончилось.

У челюстноротых верхний отдел второй жаберной дуги превратился в подвесок. Этот элемент обычно прикрепляет челюстную дугу к мозговой коробке (рис. 23.15). Как было показано в гл. 5, у млекопитающих подвесок преобразуется в одну из слуховых косточек, находящихся в среднем ухе. Но ведь у рыб подвесок не используется для восприятия звука. Каким же образом элемент, поддерживающий жабры, превратился в часть слухового аппарата? Когда рыбы вышли из воды на сушу, перед ними встала новая проблема – слышать в такой разреженной среде, как воздух. Подвесок прилегает к слуховой капсуле, а кость – превосходный материал для проведения звука. Таким образом, продолжая функционировать в качестве связующего элемента, подвесок начал также функционировать в качестве проводника звука (Clack, 1989). С изменением локомоции, строения челюсти и положения тела у наземных позвоночных мозговая коробка оказалась прочно соединенной с остальным черепом, и подвесок, утратив свою прежнюю роль, превратился в одну из слуховых косточек среднего уха – стремя.

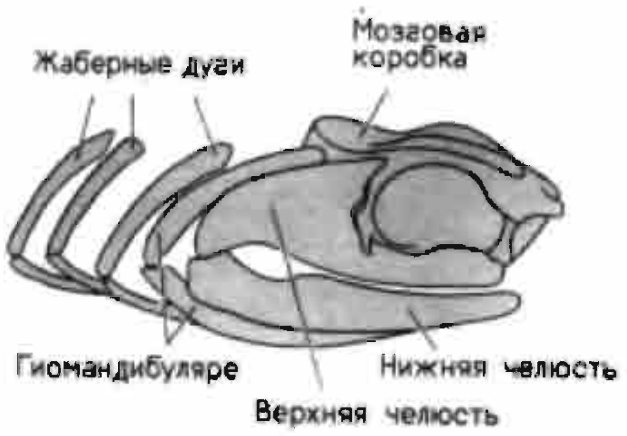


Рис. 23.15. Гомологичность челюстей и жаберных дуг в черепе палеозойской акулы *Cobelediis aculentes*. (По Zangerl, Williams, 1975.)

Челюстные кости также претерпели изменения. Первая жаберная дуга превращается в челюстной аппарат. У амфибий, рептилий и птиц задняя часть хряща образует квадратную кость верхней челюсти и сочленовную кость нижней челюсти. Эти кости соединяются друг с другом, обеспечивая сочленение верхней и нижней челюстей. Однако у млекопитающих это сочленение происходит в другом месте (чешуйчатая и зубная кости), что «освобождает» квадратную и сочленовную кости и дает им возможность приобрести новые функции. Квадратная кость рептилий превратилась у млекопитающих в наковальню, а сочленовная в другую слуховую косточку – молоточек. Этот процесс был впервые описан Рейхертом (Reichert, 1837), когда он наблюдал на зародышах свиньи, что окостенение нижней челюсти происходит вокруг меккелева хряща, тогда как задняя часть меккелева хряща окостеневает, отделяется от остальной его части и входит в область среднего уха, превращаясь в молоточек (рис. 23.16).

Эти удивительные изменения в строении черепа в процессе эволюции от бесчелюстных до рыб, от рыб до амфибий и от рептилий до млекопитающих координировали с изменениями в строении челюстей, челюстной мускулатуры, в расположении и форме зубов и с модификациями черепного свода и уха (Kemp, 1982; Thomson, 1988). Поэтому создается впечатление, что какое-либо одно изменение может сопровождаться несколькими другими.

Данные, свидетельствующие о прогрессивном развитии корреляции

Описанные выше изменения в строении нижней челюсти и уха – результат развития и естественного отбора, происходивших сотни миллионов лет назад. Можно ли вызвать такие изменения у современных

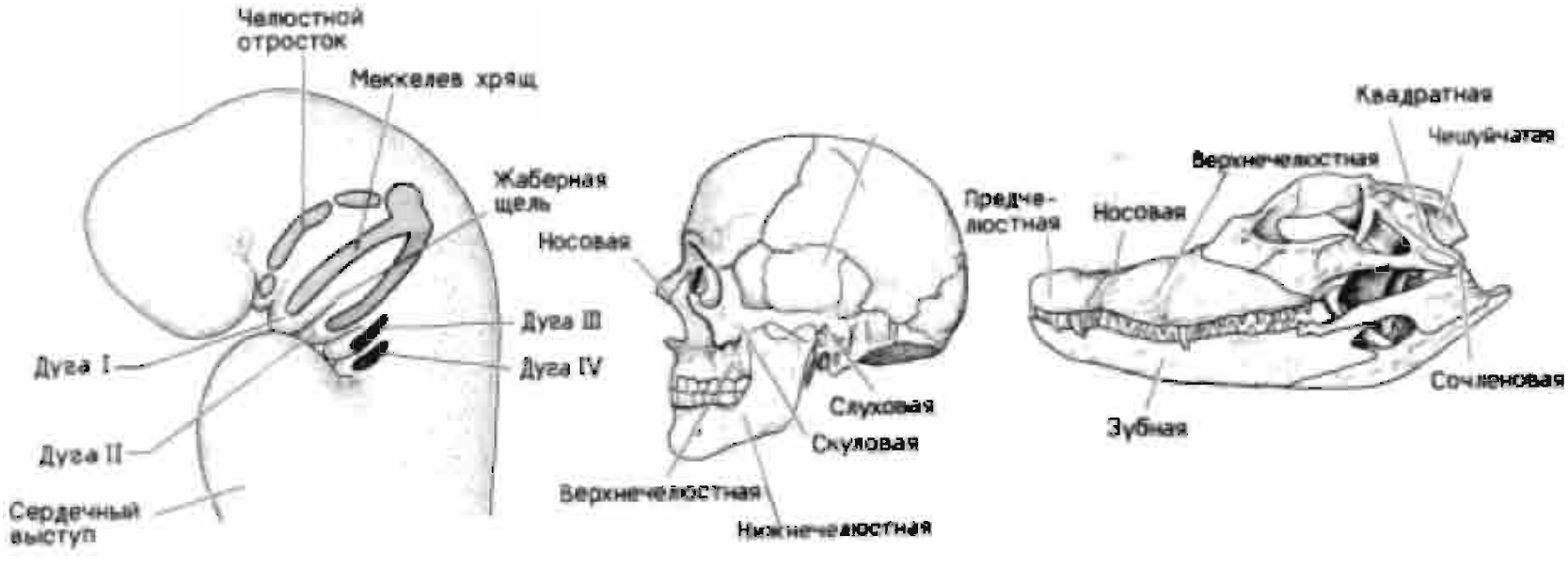


Рис. 23.16. Жаберные дуги и их производные. *А*. Человеческий эмбрион в возрасте 4 нед (вид сбоку); видны жаберные дуги и их хрящевые производные. *Б*. Череп человека (вид сбоку); видно сочленение нижней челюсти с височной областью черепа. *В*. Череп крокодила (вид сбоку); сочленовная часть нижней челюсти соединяется с квадратной костью черепа. У млекопитающих квадратная кость превращается в наковальню и перемещается в среднее ухо. Сочленовная кость сохраняет контакт с квадратной костью, превращаясь в молоточек, также находящийся в среднем ухе. (*А* – по Langman, 1981.)

организмов путем соответствующих скрещиваний и селекции, с тем чтобы установить, не сопровождаются ли они прогрессивным развитием корреляции? К счастью, люди обладают большим талантом в отборе наследственных изменений, в которых участвуют клетки нервного гребня, образующие лобно-носовой и нижнечелюстной отростки. На рис. 23.17 изображены в профиль черепа собак разных пород. Каждая вариация генетически детерминирована: важно подчеркнуть, что каждая из них представляет собой гармоничную перестройку различных костей, причем все они согласованы друг с другом и с изменениями прикрепляющихся к ним мышц [1]. В некоторых случаях, например у бульдогов, отбор ведется на широкую морду с очень небольшим углом между головой и нижней челюстью. Другие породы, как, например, колли, отбираются на узкую морду с вытянутой челюстью, сильно выступающей вперед. Несмотря на различия в форме или расположении костей, собаки любой породы двигают челюстями, вертят головой и лают. Одновременно с отбором скелетных элементов происходил отбор мышц, приводящих их в движение, нервных волокон, управляющих движениями мышц, и кровеносных сосудов, снабжающих мышцы.

Прогрессивное развитие корреляции было также продемонстрировано экспериментально. Повторяя более ранние эксперименты Хампэ (Hampé, 1959), Герд Мюллер (Gerd Müller, 1989) вставлял в прехондрогенную почку задней конечности куриного зародыша в возрасте 3,5 сут кусочек золотой фольги,

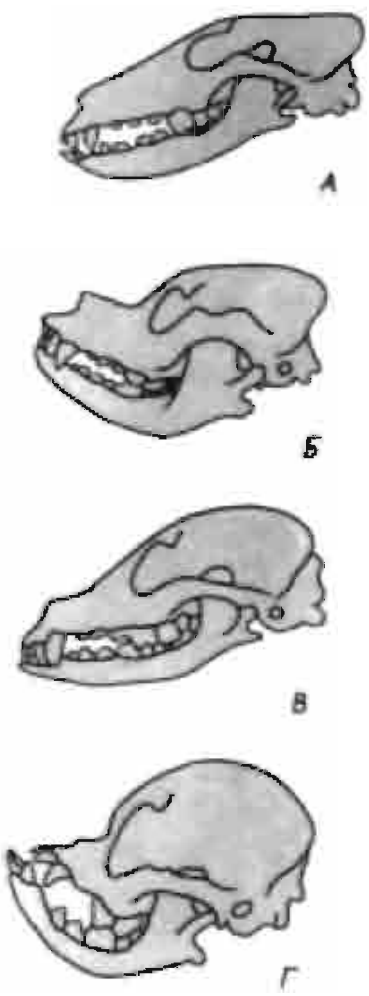


Рис. 23.17. Черепа собак разных пород. *А*. Борзая. *Б*. Сенбернар. *В*. Левретка. *Г*. Японский спаниель. Развитие челюстной мускулатуры коррелирует с развитием лицевой части черепа. (По Waddington, 1956.)

[1] Эта координация, однако, не всеобъемлюща. У собак с сильно укороченной лицевой частью черепа (таких, как бульдоги) развитие кожи не координировано с развитием костей, и поэтому она образует складки, свешивающиеся вниз (Stockard, 1941).



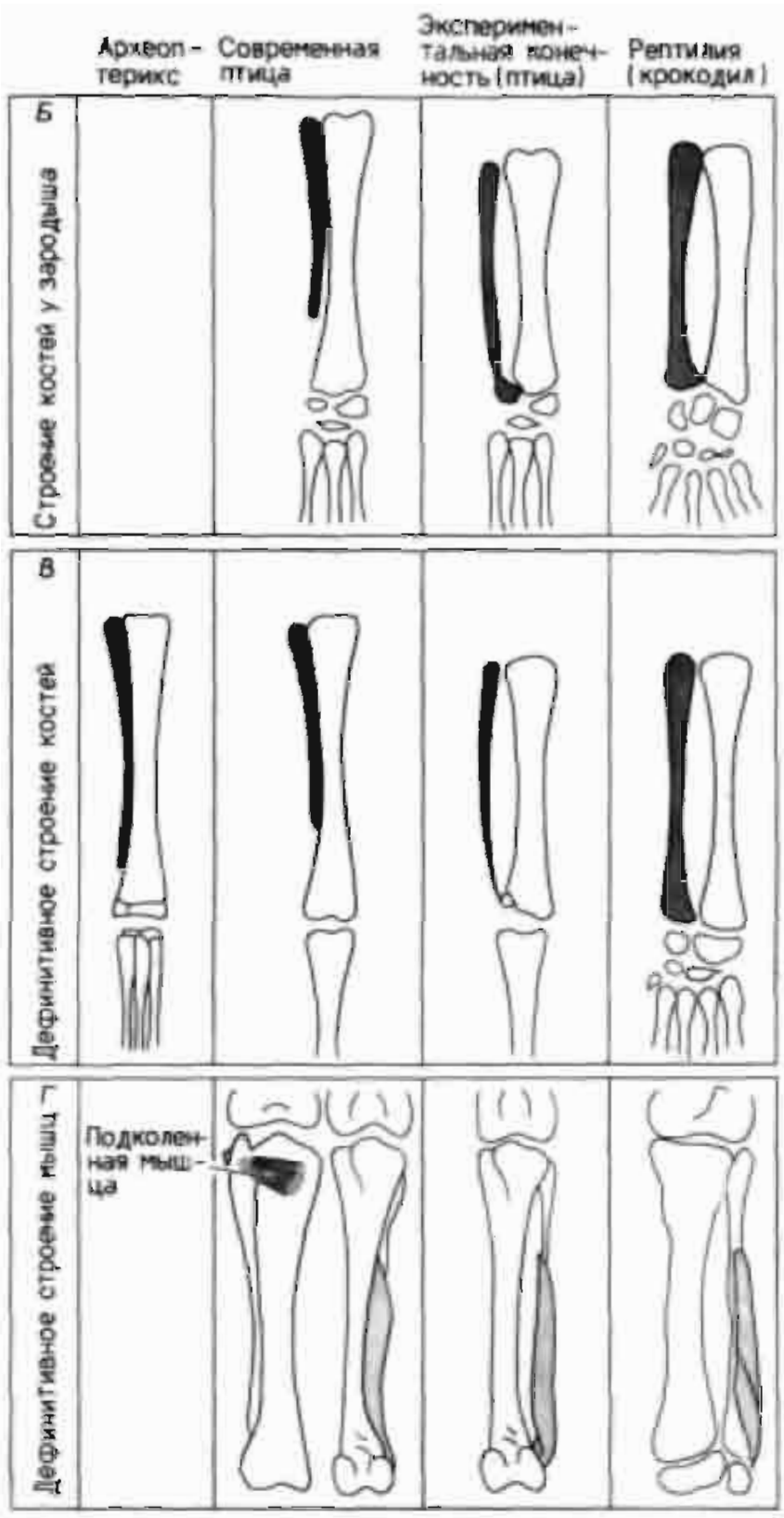


Рис. 23.18. Экспериментальные «атавизмы», вызванные изменением эмбриональных полей конечности. *А*. Отпечаток археоптерикса на известняке. Хорошо видны отпечатки перьев. Если бы не перья, то это зубастое животное, возможно, отнесли бы к рептилиям. *Б–Г*. Результаты экспериментов Мюллера с разделением поля задней конечности куриного зародыша с помощью золотой фольги. *Б, В*. Эмбриональная и дефинитивная формы кости, показывающие, что экспериментальная конечность цыпленка сохранила строение малой берцовой кости, характерное для современных рептилий и для ископаемого организма, который считают археоптериксом. *Г*. Некоторые изменения в мышцах, наблюдаемые у куриных зародышей, подвергнутых эксперименту. Подколенная мышца имеется у курицы, но отсутствует в конечностях рептилии и у экспериментального зародыша. Короткая малоберцовая мышца, которая обычно отходит от обеих берцовых костей, большой и малой, на оперированных конечностях приобретает рептильные черты, отходя только от малой берцовой кости. (Фотография с любезного разрешения B. A. Miller/Biological Photo Service; *Б–Г* – по Müller, 1989.)

разделяя таким образом презумптивные участки большой и малой берцовых костей. В этих экспериментах были получены следующие результаты. Во-первых, большая берцовая кость укорачивается, а малая берцовая выгибается, сохраняя свою связь с os fibulare. У птиц соединения между этими костями обычно нет, но для рептилий оно характерно (рис. 23.18). Во-вторых, параллельно с изменениями костей изменяется и мускулатура задней конечности. Три из мышц, связанные с перечисленными костями, прикрепляются к ним типичным для рептилий образом. Поэтому создается впечатление, что экспериментальные манипуляции, изменяющие процесс развития одной части мезодермального поля, образующего конечность, изменяют также развитие других мезодермальных компонентов. Так же, как и в случае прогрессивного развития корреляции, наблюдаемой при развитии лицевой части черепа, все эти изменения, по-видимому, обусловлены взаимодействиями в пределах некоего поля, в данном случае – поля задней конечности куриного зародыша. Эффекты эти не носят глобального характера и могут происходить независимо от развития других частей тела.

В некоторых случаях прогрессивное развитие корреляции представляет собой, возможно, плейотропный эффект, имеющий единое происхождение. Это может быть какая-то «ключевая адаптация», влекущая за собой изменения других тканей (Larson et al., 1981). Если, например, кости конечности или ротового аппарата изменяются, то одновременно происходят изменения в тех участках мезодермы, из которых образуются мышцы, связанные с этими костями. Подобные коррелированные изменения могут быть вызваны либо каким-то одним индуктором, воздействующим на клетки обоих типов, либо

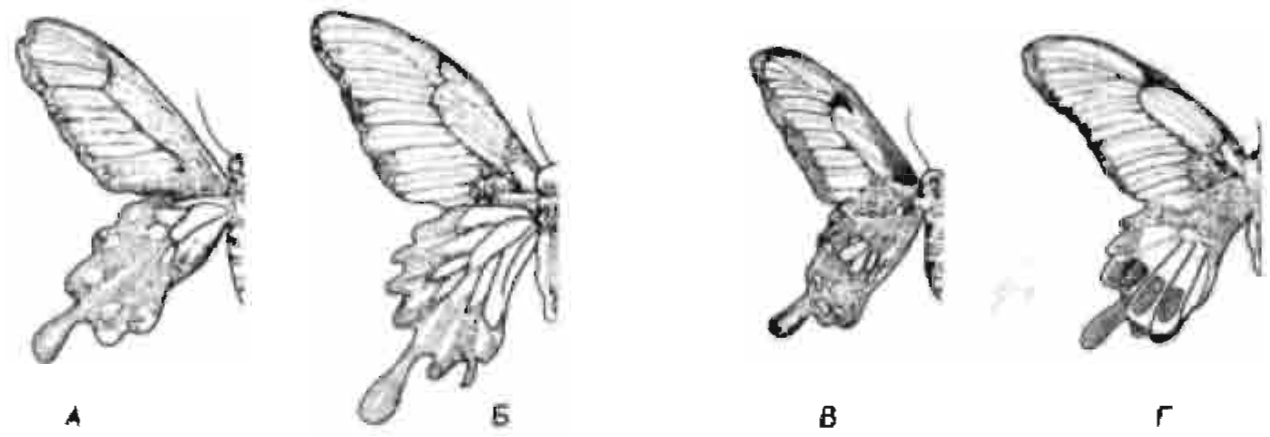


Рис. 23.19. Мимикрия у *P. memnon*. Несъедобная модель *A. coon* (*А*) и подражающая ей *P. memnon* (*Б*). Несъедобная модель *A. aristolochia* (*В*) и подражающая ей другая генетическая форма *P. memnon* (*Г*). Способность *P. memnon* подражать и одному, и другому виду определяется аллелями, образующими генный комплекс, который состоит из нескольких спепленных локусов. (По Clarke et al., 1968).

целым каскадом индукций, когда мышцы, прикрепляющиеся к верхней части кости, индуцируются к этому самой костью. В других случаях прогрессивное развитие корреляции, возможно, подвергалось отбору на уровне генных транслокаций. Один такой пример касается бэтсоновской мимикрии у парусника *Papilio memnon* (Clarke et al., 1968). Эта бабочка – лакомый кусочек для нескольких видов птиц, но ей удается выжить благодаря тому, что она подражает в своей окраске двум сравнительно малосъедобным бабочкам *Atrophaneura coon* и *A. aristolochiae* (рис. 23.19). *P. memnon* содержит «супергенный» комплекс, в состав которого входят по крайней мере пять тесно сцепленных между собой генов. Один локус контролирует наличие (*T*) или отсутствие (*t*) «хвостиков» на конце заднего крыла. Второй ген контролирует окраску брюшка – желтую (B^Y), с желтым кончиком (b^y) или черную (*b*). Третий ген обусловливает узор окраски заднего крыла, подражающей крыльям *A. coon* (W^{al}) или *A. aristolochiae* (W^4). Четвертый и пятый гены этого кластера контролируют узор окраски передних крыльев и цвет пятна у их основания. В каждой изученной популяции *P. memnon* в этом локусе находятся разные аллели, дающие бабочке возможность подражать несъедобной модели. Например, в Гонконге *P. memnon* несет кластер генов $TW^{al}B^Y$, детерминирующий развитие бабочки с «хвостиками», брюшко и задние крылья которой окрашены так, как у представителей местных популяций *A. aristolochiae*. Это сочетание признаков наследуется, однако, как нечто единое, поскольку под действием отбора определяющие их гены оказались сцепленными так тесно, что рекомбинации возникают относительно редко. Благодаря этому бабочка полностью подражает своей модели. Если подражание касается только какого-то одного аспекта, то оно менее эффективно. Таким образом, коррелированная изменчивость у некоторых видов (например, у собак) создается, возможно, в результате взаимодействий между коорелированными компонентами в процессе эмбрионального развития, тогда как у других видов (таких, как описанные здесь махаоны) коррелированная изменчивость возникает на генетическом уровне.

Гетерохрония и аллометрия

Гетерохронией называют происходящий от одного поколения к другому сдвиг в относительных сроках каких-либо двух процессов развития в течение эмбриогенеза. Мы уже встречались с этой концепцией при обсуждении неотении и прогенеза у хвостатых амфибий (гл. 19). Гетерохрония может быть вызвана разными причинами. У амфибий, навсегда остающихся на личиночной стадии, гетерохрония возникает в результате генных мутаций в системе индукция – компетенция. Другие гетерохронические фенотипы создаются в результате гетерохронической экспрессии определенных генов. Непосредственное развитие зачатка взрослого морского ежа (гл. 19) обусловлено ранней инициацией экспрессии генов взрослой особи и подавлением экспрессии личиночных генов (Raff, Wray, 1989). Как уже обсуждалось выше, гетерохрония может оказывать влияние на эволюцию разными способами. Она может «вернуть» организм в личиночное состояние, свободное от специализированных адаптаций взрослой стадии. Гетерохрония может также придать взрослому организму личиночные признаки, такие, как небольшие размеры и перепончатые лапы древесных хвостатых амфибий или рост мозга новорожденного младенца со скоростью, характерной для плода.

Аллометрия наблюдается в тех случаях, когда разные части организма растут с различными скоростями. Как было показано в гл. 20, аллометрия может играть важную роль, формируя разнообразные варианты в пределах данного плана строения. Такие дифференциальные изменения роста могут возникать в результате изменения чувствительности

клетки-мишени к факторам роста или же изменения количества вырабатываемых факторов роста. И в этом случае в качестве иллюстрации можно использовать конечности позвоночных. Локальные различия в хондроцитах приводят к тому, что у лошади средний палец растет в 1,4 раза быстрее, чем боковые (Wolpert, 1983). Это означает, что по мере того как в процессе эволюции лошадь увеличивалась в размерах, такое региональное различие привело к превращению ноги лошади из трехпалой в однопалую. Особенно интересный пример аллометрии в эволюции дает развитие черепа. У очень ранних (4–5 мм) зародышей кита ноздри занимают обычное для млекопитающих положение. Однако неравномерный рост межчелюстных и верхнечелюстных костей выдвигает вперед лобную кость и сдвигает ноздри на верхнюю поверхность головы (рис. 23.20). Новое положение ноздрей (дыхала) создает возможность для развития мощного и высокоспециализированного челюстного аппарата, а также возможность дышать, когда кит находится у поверхности воды (Slijper, 1962).

Аллометрия может также создавать эволюционные новшества путем мелких постоянно нарастающих изменений, которые в конечном итоге переступают через некий порог (называемый иногда точкой бифуркации). При этом количественное изменение переходит в конце концов в изменение качественное. Считается, что именно таким образом возникли наружные выстланные шерстью защечные мешки гоферов и кенгуровых крыс, обитающих в пустынях. Наружные мешки отличаются от внутренних тем, что, во-первых, они выстланы шерстью, а, во-вторых, не имеют внутренней связи с ротовой полостью. Благодаря этому обладатели таких мешков могут складывать в них семена, не опасаясь их высыхания. Брыльски и Холл (Brylski, Hall, 1988) разрезали головы зародышей этих животных и изучали развитие наружных защечных мешков. Сопоставляя полученные данные с результатами изучения развития внутренних защечных мешков (например, у хомяков), эти авторы обнаружили, что наружные и внутренние мешки развиваются весьма сходным образом. Как те, так и другие закладываются у зародыша в виде карманов щечного эпителия, выступающих в лицевую мезенхиму (рис. 23.21). У животных с внутренними защечными мешками эти выступы не выходят за пределы щек. Однако в случае наружных мешков при вытягивании морды в длину выступы подтягиваются в область губы. Когда губной эпителий выворачивается из ротовой полости наружу, вместе с ним выворачиваются и эти карманы. То, что было внутри, оказывается снаружи. Шерстная выстилка, вероятно, образуется в результате соприкосновения наружных карманов с кожной мезенхимой, способной индуцировать образование волос в эпителии (гл. 16). Такой мешок не сообщается посредством внутреннего отверстия с ротовой полостью. Фактически переход от внутреннего к наружному мешку–

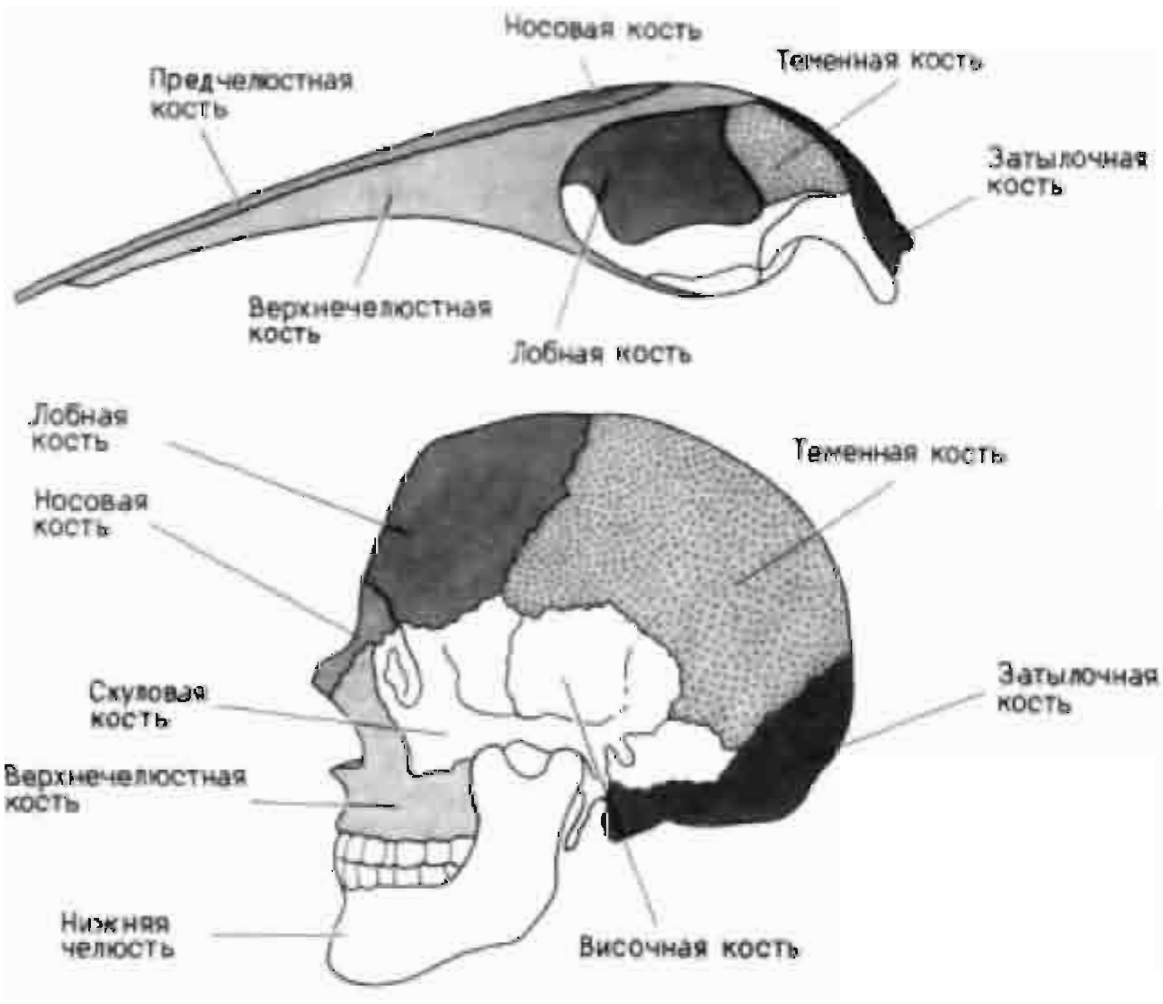


Рис. 23.20. Аллометрический рост костей черепа у кита. Верхняя челюсть выдвинулась вперед, в результате чего ноздри сместились на верхнюю поверхность черепа. Для сравнения представлен череп человека. (Межчелюстные кости имеются у зародыша человека на ранних стадиях развития, но к концу третьего месяца беременности они сливаются с верхнечелюстными. Одним из тех, кто обнаружил наличие у человека межчелюстных костей, был Вольфганг Гёте, сделавший это открытие в 1786 г.) (По Slijper, 1962.)



Рис. 23.21. Поперечный срез через переднюю область зародыша западного гофера (*Thomomys*), на котором видно переднее отверстие защечного мешка (*1*) и непрерывное соединение этого мешка (на данной стадии) и ротовой полости (*2*). *3* – меккелев хрящ; *4* – язык. (Из Brylski, Hall, 1988; фотография с любезного разрешения этих авторов.)

это один из порогов. Расположение эпителиального выпячивания (спереди или сзади) определяет, будет ли защечный мешок внутренним или наружным. «Переходной стадии» с двумя отверстиями – одним внутрь, а другим наружу – не существует [1]. Можно представить себе, что возникновение наружного защечного мешка было вызвано случайными мутациями, сдвинувшими выпячивание эпителия несколько вперед. В условиях пустыни подобный признак мог бы быть подхвачен отбором. По мнению ван Валена (Van Valen, 1976), эволюцию можно определить как «регуляцию развития со стороны экологии».

Передача компетенции

Другой возможный способ использования индукции для создания изменений в развитии, которые могли бы подвергаться отбору в процессе эволюции,– это **передача компетенции**. Идея о передаче компетенции, которую популяризировали К. Уоддингтон и И. И. Шмальгаузен, позволяет объяснить сохранение новых фенотипов, которым благоприятствует отбор. В 1936 г. Уоддингтон, Нидхэм и Браше сделали неожиданное открытие. Они надеялись выделить из хорды некий специфический фактор, который был бы способен индуцировать образование нервных пластинок, а вместо этого обнаружили, что способностью к такой индукции обладает множество различных природных и синтетических соединений. Это заставило их по-новому истолковать свои данные и высказать мнение, что подлинный нейрализующий фактор находится в покоящемся состоянии в компетентной эктодерме и что существует ряд разнообразных веществ, способных освободить этот фактор от его ингибитора. Затем Уоддингтон перенес главное внимание с индуцирующих клеток на компетентные клетки. Он полагал, что в роли индуктора могут выступать самые разные вещества, тогда как компетентная ткань должна содержать в себе нечто, что позволяет ей реагировать на эти вещества. Индуктор дает лишь толчок (Waddington, 1940). Генетическому контролю подвергается только компетенция, которая и несет ответственность за детали развития.

Поскольку компетенция может быть достигнута независимо от данного индуктора и поскольку различные соединения индуцируют одни и те же процессы развития в данной компетентной ткани, Уоддингтон высказал предположение, что данная компетентная ткань может передавать свою способность реагировать от одного индуцирующего фактора другому. Кроме того, эти индукторы могут быть как внутренними, так и внешними. Внешние индукторы уже были известны, и в качестве примера Уоддингтон воспользовался определением пола у *Bonellia* (гл. 21). Уоддингтон отметил также, что подобным примером может служить способность к образованию мозолей на тех участках кожи, которые постоянно трутся о грунт. В этом случае клетки кожи проявляют способность к образованию мозолей, если их индуцировать трением. Гены, очевидно, реагируют на индуцирующее воздействие, вызывая пролиферацию клеток, образующих мозолистую

[1] Отсутствие переходных форм нередко используется креационистами в качестве аргумента при критике теории эволюции. Например, при переходе от рептилий к млекопитающим две из трех костей, образующих нижнюю челюсть у рептилий, превратились в наковальню и молоточек, так что в нижней челюсти осталась лишь одна кость (зубная). Сторонник креационизма Гиш (Gish, 1973) считает такое положение вещей невозможным, поскольку не найдено ни одного ископаемого животного, у которого было бы две или три кости в нижней челюсти и две или три слуховые косточки. Он заявляет, что у такого животного нижняя челюсть должна была бы волочиться по земле. Однако существование именно такой переходной формы вовсе не обязательно (описано свыше десятка переходных форм между черепами рептилий и млекопитающих). Хопсон (Hopson, 1966), основываясь на эмбриологических соображениях, показал, что кости нижней челюсти могли разделиться и использоваться для разных функций, а Ромер (Romer, 1970) обнаружил ископаемых рептилий, у которых новое сочленение нижней челюсти уже функционировало, тогда как прежние кости становились бесполезными.

структуру. Подобных примеров образования мозолей, индуцируемого факторами среды, очень много. А вот страус *появляется на свет* с мозолями. Уоддингтон высказал предположение, что поскольку клетки его кожи уже компетентны реагировать на индуцирующее воздействие трения, их можно индуцировать и другими факторами. В процессе эволюции у страусов появилась мутация, определившая способность клеток кожи реагировать на какое-то вещество, содержащееся в зародыше. Таким образом, признак, который был индуцирован средой, стал контролироваться особым геном и, следовательно, мог подвергаться отбору. Уоддингтон назвал это явление «генетической ассимиляцией».

Доказать передачу компетенции очень трудно, поскольку при этом надо сначала установить, что данная ткань была способна реагировать определенным образом на средовые индукторы, а затем – что в процессе эволюции у нее возник рецептор для какого-то внутреннего стимула, который направил дифференцировку этой клетки по тому же пути. Как и во многом другом, относящемся к эволюционной теории, для того чтобы доказать возможность такой эволюции, приходится привлекать косвенные данные. Имеется, однако, несколько кандидатов на роль организмов, в эволюции которых происходила передача компетенции.

ВОЗМОЖНАЯ ПЕРЕДАЧА КОМПЕТЕНЦИИ В ПОПУЛЯЦИЯХ МУРАВЬЕВ. Одним примером передачи компетенции от средового стимула к геномному служит эволюция разделения на касты у муравьев. Муравьиная семья состоит преимущественно из самок, а самки отличаются резко выраженным полиморфизмом. Два главных типа самок представлены рабочими особями и репродуктивными самками. Репродуктивная самка – это потенциальная матка. При более высокой специализации из касты рабочих особей выделяются более крупные особи – солдаты. Касты определяются уровнем ювенильного гормона у развивающейся личинки. Если уровень этого гормона высокий, то рост личинки носит аллометрический характер и у нее либо образуются более крупные челюсти, либо развиваются половые органы. Содержание в организме личинки ювенильного гормона, возможно, зависит от получаемой ею пищи или же регулируется материнскими гормонами, оказывающими свое действие в процессе эмбриогенеза.

Механизмы определения касты в процессе развития изучала Даэна Вилер (Diana Wheeler, 1986); полученные ею данные суммированы на рис. 23.22. У большинства видов муравьев личинки бипотенциальны почти до окукливания. У *Myrmica rubra* бипотенциальными остаются только те личинки, которые перезимовали. По прошествии зимы матка стимулирует рабочих таким образом, чтобы они не

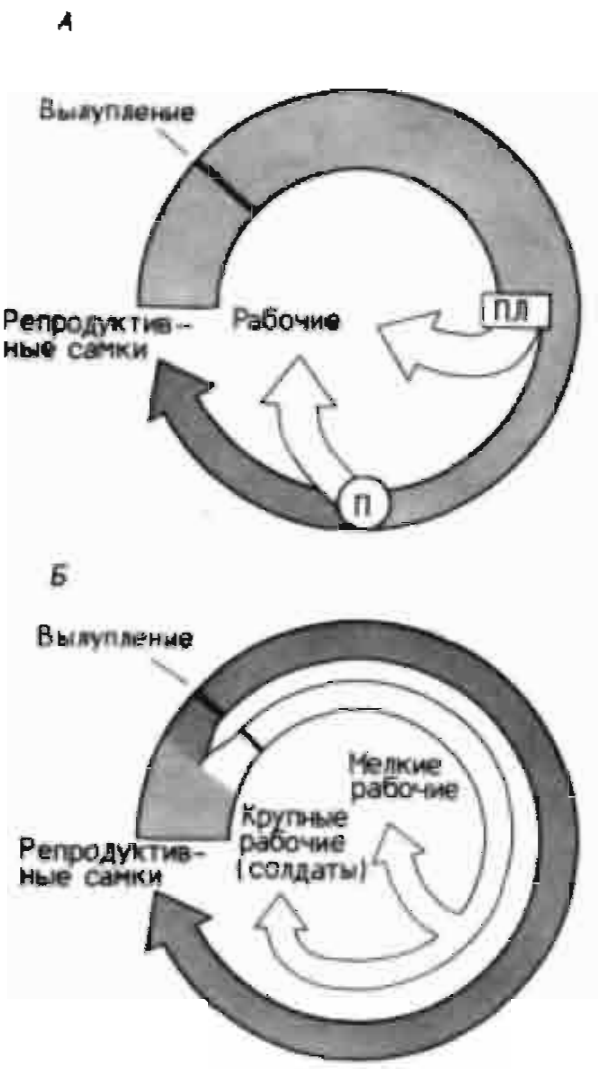


Рис. 23.22. Возможная передача компетенции при формировании репродуктивной самки (матки) у муравьев. Светлые участки представляют бипотенциальных особей, т. е. особей, которые могут превратиться либо в рабочих, либо в репродуктивных самок. П – переключатель питания, регулируемый средой, в которой находятся личинки. *А. Myrmica rubra*, у которых бипотенциальность сохраняют только перезимовавшие личинки (ПЛ). *Б. Pheidole pallidula*, у которых матка контролирует детерминацию репродуктивных самок с помощью гормонов, действующих во время эмбриогенеза. (По Wheeler, 1986.)

докармливали личинок последнего возраста. Это означает, что до тех пор, пока в семье есть матка, возникновение новых маток невозможно. Если личинок кормить, то они могут превратиться в репродуктивных самок. Таким образом, личинки сохраняют бипотенциальность почти до конца последнего возраста.

У *Pheidole pallidula* матки, по-видимому, контролируют определение касты во время эмбриогенеза. У этого вида нет бипотенциальных личинок, поскольку каста каждого данного индивидуума детерминируется на эмбриональной стадии. Репродуктивные самки развиваются из яиц, отложенных сразу после окончания зимовки, а поэтому считается, что яйца, отложенные в разные сроки, различны по своим биохимическим свойствам. Хотя вопрос о том, чем отличаются яйца, дающие репродуктивных самок, от яиц, дающих рабочих, вызывает

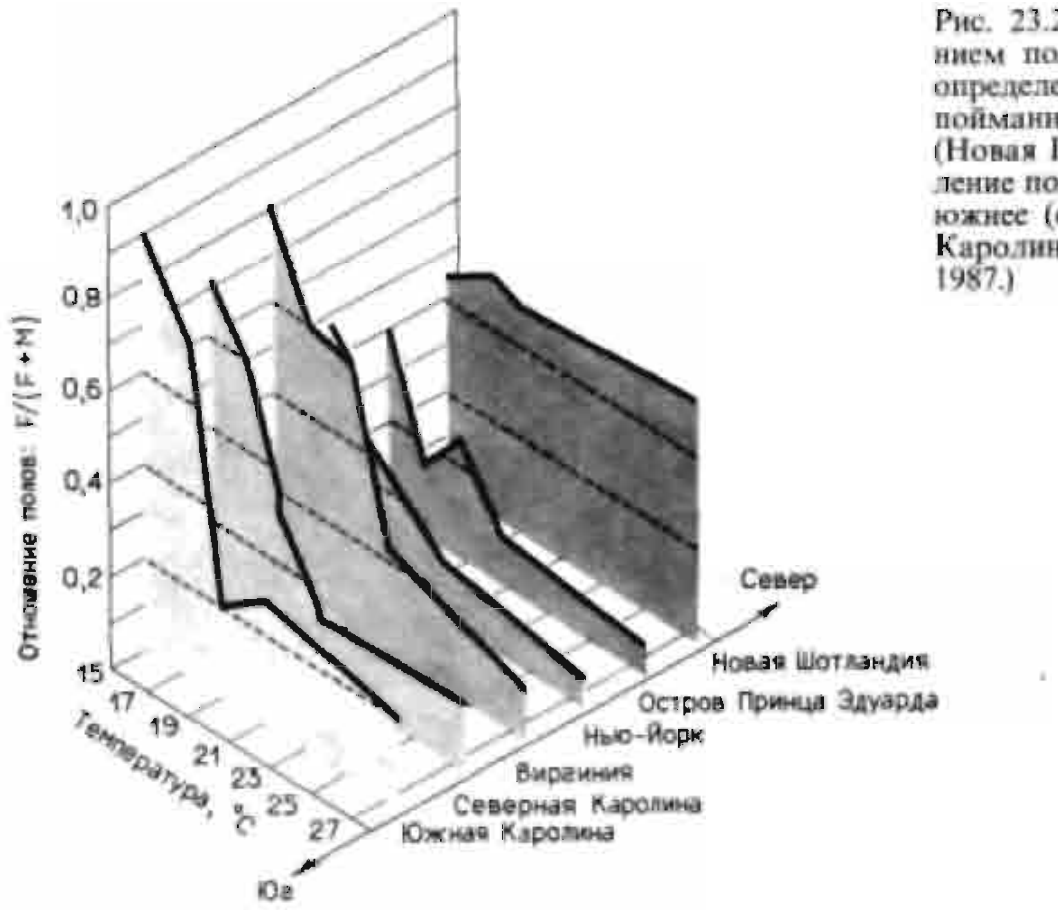


Рис. 23.23. Зависимость между температурой и соотношением полов [F/(F + M)] в период, когда происходит определение пола у рыбы *Menidia menidia*. У экземпляров, пойманных в самой северной части ареала *M. menidia* (Новая Шотландия), температура мало влияет на определение пола. Влияние среды на зародышей рыб, пойманных южнее (особенно в областях от Виргинии до Южной Каролины) было выражено сильнее. (Из Conover, Heins, 1987.)

разногласия, перед нами пример детерминации касты, происходящей внутри самого зародыша.

Как показывает пример *Pheidole*, детерминация, зависящая от среды, может быть интернализована. Следует также иметь в виду, что у этих муравьев касте рабочих присущ полиморфизм. Среди них сформировались солдаты – крупные рабочие. Уилсон (Wilson, 1971) указывал, что из 260 известных нам родов муравьев только у семи среди рабочих наблюдается полный диморфизм. Если полиморфизм рабочих особей дает преимущество (Oster, Wilson, 1978), то почему он не возникает и в других родах муравьев? По мнению Уиллера, полиморфизм у рабочих проявляется только в тех группах, в которых детерминация репродуктивных самок наступает очень рано. После того как произойдет детерминация, становится возможным варьировать питание личинок, создавая разные касты рабочих.

ВОЗМОЖНАЯ ПЕРЕДАЧА КОМПЕТЕНЦИИ ПРИ ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА У РЫБ. Если компетентная ткань способна заменять средовые индукторы, воздействующие на развитие, на внутренние индукторы, закодированные в геноме, то можно допустить и обратное. Можно ожидать, что при некоторых селективных условиях генетическая индукция заменяется средовой индукцией. Возможно, что именно это имеет место при некоторых типах детерминации пола под действием факторов среды. Такая детерминация пола наблюдается у ряда беспозвоночных и позвоночных – рыб, амфибий и рептилий (гл. 21). Чарнов и Булл (Charnov, Bull, 1977) утверждали, что в пятнистых местообитаниях детерминация пола под действием среды должна носить адаптивный характер, поскольку в одних участках таких местообитаний выгоднее быть самцом, а в других выгоднее быть самкой. Коновер и Хейнз (Conover, Heins, 1986) приводят данные, указывающие на то, что у некоторых рыб крупные размеры самок создают преимущество, поскольку это обеспечивает более высокую плодовитость. Самки атерины рода *Menidia*, вылупившиеся из икры в начале сезона размножения, обладают преимуществом, так как при этом период нагула оказывается у них более длительным и они достигают бóльших размеров. Для самцов размеры не имеют значения. Коновер и Хейнз установили, что в южной части ареала *Menidia* самки действительно вылупляются в начале сезона размножения. Температура, очевидно, играет во всем этом важную роль. Однако у того же вида вблизи северных границ его ареала никакой детерминации пола, обусловленной факторами среды, не наблюдается; соотношение полов при любой температуре равно 1:1 (рис. 23.23). По мнению авторов, это объясняется тем, что у популяций, обитающих в северных частях ареала, период нагула очень короткий, так что раннее вылупление не дает самке никакого преимущества. Таким образом, у этого вида рыб детерминация пола зависит от средовых факторов в тех областях, где такая детерминация имеет адаптивное значение, в других же частях ареала пол детерминируется генотипически. И опять, как видим, половой фенотип может индуцироваться средой или же детерминироваться геномом, как у большинства млекопитающих.

Задержка имплантации

Один вероятный пример передачи компетенции от одного индуктора другому относится к виду, у одних подвидов которого индуктивные стимулы являются внутренними, тогда как у других подвидов тот же самый процесс контролируется другим индуктором. Это явление можно наблюдать при имплантации бластоцист в матку у пятнистого скунса. У восточного подвида этого скунса, *Spirogale putorius*, имплантация протекает нормально. Спаривание происходит в апреле, беременность продолжается около двух месяцев, и детеныши рождаются в июне или июле, когда пищи для них много. Западный же подвид обитает на бо́льших высотах и не может спариваться в апреле. Западные скунсы спариваются в сентябре. Если бы у этого подвида зародыши развивались с такой же скоростью, как у восточного, и беременность продолжалась два месяца, то детеныши рождались бы в ноябре и декабре, и им пришлось бы голодать. Однако у западного подвида в процессе эволюции выработалась **задержка имплантации.** Несмотря на то что оплодотворение и ранние стадии дробления начинаются в сентябре, имплантация бластоцисты задерживается до апреля (т. е. происходит в то же самое время, что и у настоящего подвида). Продолжительность этой задержки, вероятно, регулируется длиной дня, поскольку у ослепленных скунсов она больше. (У других животных с задержкой имплантации фотопериод иногда воспринимается эпифизом.) К концу периода задержки у самки начинает вырабатываться прогестерон, под действием которого матка становится способной принять бластоцисту, ожидающую этого 210–230 сут (Renfree, 1982). Задержка имплантации составляет часть жизненного цикла многих млекопитающих.

Дополнительные сведения и гипотезы

Передача компетенции путем переноса рецепторов

Согласно Уоддингтону, у компетентной клетки в процессе эволюции выработался путь реакции на индуктор, контролируемый генетически. Когда компетенция клетки передается от одного индуктора другому, рецептор, воспринимающий данный сигнал, изменяется, но отрезок пути, дистальный по отношению к этому сигналу, остается прежним. Мы можем убедиться в этом по компетенциям различных клеток к митогенным факторам. Вспомним описанное в гл. 16 деление компетентного В-лимфоцита. При связывании антигена своими поверхностными иммуноглобулинами В-клетка приобретает поверхностные рецепторы для факторов роста. Иными словами, специфическая компетенция создается рецептором антигена. Если презентируется другой антиген, то компетенцию к делению и дифференцировке в плазматические клетки, вырабатывающие антитела, приобретает другая группа В-клеток. Таким образом, связывание антигена с антигенными рецепторами В-клеток запускает *созданную заранее программу* (preset programm) деления и дифференцировки клеток.

Передача компетенции происходит также на пути клеточного деления В-клеток. G-белок, связанный с иммуноглобулином на клеточной поверхности, активирует фосфолипазу С. Фосфолипаза С расщепляет фосфатидилинозитолбисфосфат ($ФИФ_2$) на инозитолтрифосфат, который высвобождает кальций из эндоплазматического ретикулума, и диацилглицерол, активирующий протеинкиназу С, что приводит к повышению внутриклеточного pH. Совместно эти сигналы активируют ядерные протоонкогены, инициирующие клеточное деление. Интересно, что те же самые реакции происходят при соединении антигенов с рецепторами Т-клеток. Таким образом, создается впечатление, что клеточное деление как В-, так и Т-лимфоцитов следует по одному и тому же пути. Точно так же некоторые нейрогормоны, такие, как серотонин и ацетилхолин, оказывают свое действие, активируя G-белки и запуская аналогичную последовательность реакций. Реакции одни и те же. Изменяется лишь поверхностный рецептор клетки.

Однако эта история должна быть нам уже знакома. В сущности лимфоциты и нейроны стали на этот путь далеко не первыми; ибо этот путь – тот ряд реакций, с помощью которых происходит деление каждой клетки тела. Известна более общая схема, в которой с рецептором фактора роста связывается фактор роста (гл. 20). Этот рецептор в свою очередь активирует G-белок, который активирует фосфолипазу С, приводящую в движение весь процесс. Но и на этом дело не кончается. Такой же путь прослеживается в реакциях, активирующих оплодотворенное яйцо (гл. 2). В этом случае в роли активатора выступает не антиген и не пептидный фактор роста, а спермий. Итак, этот путь не зависит от природы стимула, инициирующего клеточное деление. В мембрану можно вводить различные рецепторы, в результате чего этот путь становится способным активироваться новыми соединениями. В самом деле, если активировать яйца *Xenopus*, вводя в них мРНК,

детерминирующие рецепторы ацетилхолина и серотонина, то при воздействии на яйца этих медиаторов они начинают делиться (Kline et al., 1988). В этом случае внутренний индуктор (нейромедиатор) заменил собой внешний индуктор (спермий) путем простой замены рецептора. Поэтому, изменяя поверхностные рецепторы клетки, можно изменить ее компетенцию, в результате чего она будет реагировать на другой индуктор.

Новый эволюционный синтез

Одним из важных событий в развитии эволюционной теории был «современный синтез» эволюционной биологии и менделевской генетики (Mayr, Provine, 1980). Одним из результатов этого объединения, достигнутого с большим трудом, было новое определение эволюции как изменения частоты генов в популяции с течением времени. «Поскольку эволюция – это изменение генетического состава популяций – писал Добржанский (Dobzhansky, 1937), – механизмы эволюции представляют собой проблемы популяционной генетики». Это определение встретило широкую поддержку в США, Англии и бывшем Советском Союзе; тем самым морфологии и эмбриологии в современной эволюционной теории отводилась лишь небольшая роль (Adams, 1991). Крупные морфологические изменения, наблюдаемые на протяжении эволюционной истории, можно объяснить накоплением небольших генетических изменений. Иными словами, макроэволюцию (значительные морфологические различия, существующие между видами, классами и типами) можно объяснить механизмами микроэволюции – «различной адаптивной ценностью генотипов или отклонениями от случайного спаривания или одновременным действием этих двух факторов» (Torrey, Feduccia, 1979).

Однако у этой точки зрения были свои критики (свои «еретики», как сказали бы некоторые). Быть может, главным среди них был Рихард Гольдшмидт. Гольдшмидт начинает свою книгу «Материальные основы эволюции» (Goldschmidt, 1940), бросив вызов «современному синтезу». Этот синтез, возможно, способен объяснить *выживание* наиболее приспособленных, но не их *появление*.

> Я хочу предложить приверженцам строго дарвинистского взгляда, который мы здесь обсуждаем, попытаться объяснить накоплением и отбором мелких мутаций эволюцию следующих признаков: волосяной покров млекопитающих; перья птиц; сегментация у членистоногих и позвоночных; превращения, претерпеваемые в процессе филогенеза жаберными щелями вместе с дугами аорты, мышцами, нервными волокнами и т. п.; далее, зубы, раковины моллюсков, наружные скелеты, сложные глаза, кровообращение, чередование поколений, статоцисты, амбулакральная система и педицеллярии иглокожих, стрекательные капсулы, ядовитые железы змей, китовый ус и, наконец, такие химические различия, как гемоглобин или гемоцианин.

Гольдшмидт считал, что возникновение новых видов не связано с микроэволюционными механизмами и что популяционная генетика не в состоянии объяснить структуры новых типов, для появления которых необходимо одновременное изменение нескольких компонентов. Такое макроэволюционное изменение «требует другого эволюционного метода – настоящего накопления микромутаций». Гольдшмидт рассматривал гомеозисные мутации как «макромутации», способные превращать одну структуру в другую и, возможно, создавать новые структуры или новые комбинации структур. Эти мутации должны были затрагивать не структурные, а регуляторные гены. Новый вид, утверждал Гольдшмидт, должен начинаться как «многообещающее чудовище» (довольно неудачное выражение, заимствованное у Мечникова).

В то же самое время Уоддингтон пытался найти механизмы развития, способные создавать такие новые виды. Он также рассматривал гомеозисные мутации у мух как модели возникновения совершенно новых фенотипов и сформулировал концепцию передачи компетенции («генетической ассимиляции») для объяснения некоторых аспектов морфологической эволюции. Работы Гольдшмидта и Уоддингтона привлекли к себе внимание лишь немногих ученых; эти работы не касались популяционно-генетической парадигмы современного синтеза, и предлагавшиеся их авторами научные программы были сомнительными. (Гольдшмидт не верил в моргановское представление о гене как об отдельной единице, а работа Уоддингтона была неверно воспринята как поддержка концепции наследования приобретенных признаков.) Однако в 1970-х годах события в палеонтологии (теория прерывистого равновесия), события в общественной жизни (креационисты уступают микроэволюцию биологам, но оспаривают макроэволюцию) и события в молекулярной биологии (в особенности опубликованная в 1975 г. статья Кинга и Уилсона, в которой было доказано, что ДНК шимпанзе и ДНК человека идентичны более чем на 99%) заставили ученых серьезно отнестись к точке зрения, согласно которой мутации регуляторных генов могут вызывать серьезные морфологические изменения.

Возникает новый морфологический синтез, вобравший в себя все лучшее из модели «микроэволюция дает макроэволюцию» и из модели «макроэволюция как самостоятельное явление». Из последней

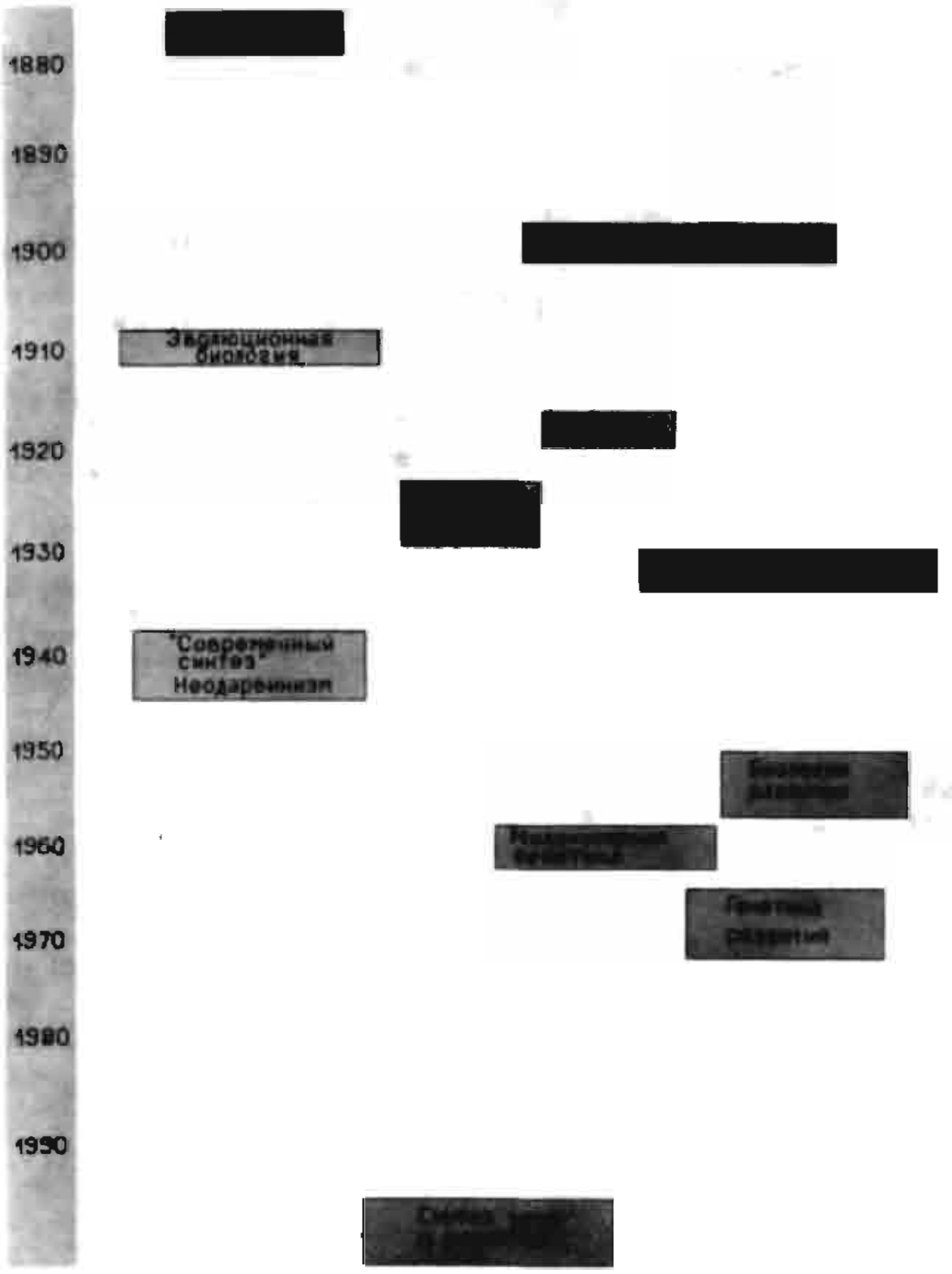


Рис. 23.24. Пути развития биологических дисциплин, связанных с изучением эволюции, начиная от 1880 г. до настоящего времени. Для ясности другие пути (ведущие, например, от генетики к генетике человека или от эволюции к иммунологии) в схему не включены.

модели этот синтез заимствовал представление о том, что мутации регуляторных генов могут создавать «скачки» от одного фенотипа к другому без всяких промежуточных ступеней. Из первой – представление о том, что генные мутации позволяют объяснить такие варианты и что под действием отбора они могут элиминироваться или оставаться в популяциях. Этот новый синтез сохраняет также множественность парадигм. В одних случаях (таких, как создание клеток нервного гребня) происходит качественное изменение; в других (таких, как образование защечных мешков у гофера) – после какого-то порога количество переходит в качество.

В настоящее время мы переживаем особый момент в нашем понимании природы, ибо синтез генетики развития с эволюционной биологией может привести к переоценке наших представлений о механизмах, лежащих в основе эволюционного изменения и разнообразия животных. Такой синтез – это в сущности возврат к более всеобъемлющей эволюционной теории, которая раздробилась на части в конце прошлого века (рис. 23.24). В конце XIX в. эволюционная биология объединяла в себе несколько разных наук, которые мы теперь называем эволюционной биологией, систематикой, экологией, генетикой и эмбриологией. К началу нашего века из эволюционной биологии выделились «вопросы наследственности», т.е. генетика и развитие. Генетика в конечном счете разделилась на популяционную и молекулярную генетику, а эмбриология превратилась в биологию развития (Gilbert, 1979,

1988). К середине XX в. популяционная генетика слилась с эволюционной биологией, образовав эволюционную генетику «современного синтеза», тогда как молекулярная генетика слилась с биологией развития, чтобы образовать генетику развития. Возникшие в результате две обширные области – генетика развития и эволюционная генетика – находятся на пороге слияния, которое может объединить эти давно разделившиеся ветви биологии и произвести на свет теорию генетики развития, способную объяснить макроэволюцию.

Когда Вильгельм Ру (Wilhelm Roux, 1894) провозгласил создание «механики развития», он не вполне порвал с эволюционной биологией. Напротив, он утверждал: что «необходимо совершенствовать *онтогенетическую* и *филогенетическую механику развития*». Он отмечал далее, что механика развития зародышей (онтогенетическая ветвь) должна развиваться быстрее, чем филогенетические исследования, «но вследствие тесных каузальных связей между этими двумя ветвями многие заключения, сделанные на основании изучения онтогенеза, прольют свет на филогенетические процессы». Мы сейчас находимся в той точке, из которой мы можем наблюдать за рождением второй из названных Ру механик развития и создавать единую теорию эволюции.

ЛИТЕРАТУРА

Adams M. (1991). Soviet perspectives on evolutionary theory. In: L. Warren, M. Meselson (eds.), New Perspectives in Evolution, Liss/Wiley, New York.

Alberch P., Gale E. (1983). Size dependency during the development of the amphibian foot. Colchicine induced digital loss and reduction, J. Embryol. Exp. Morphol., **76**, 177–197.

Alberch P., Gale E. (1985). A developmental analysis of an evolutionary trend. Digit reduction in amphibians, Evolution, **39**, 8–23.

Alexandrov D. A., Sergievsky S. O. (1984). A variant of sympatric speciation in snails, Malacol. Rev., **17**, 147.

Ambros V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*, Cell, **57**, 49–57.

Bateson W. (1894) Materials for the Study of Variation, Cambridge University Press, Cambridge.

Berg R. L. (1960). Evolutionary significance of correlation pleiades, Evolution, **14**, 171–180.

Berrill N. J. (1955). The Origins of the Vertebrates, Oxford University Press, New York.

Berrill N. J. (1987). Early chordate evolution. I. Amphioxus, the riddle of the sands, Int. J. Invert. Repr. Dev., **11**, 1–27.

Brylski P., Hall B. K. (1988). Ontogeny of a macroevolutionary phenotype: The external cheek pouches of geomyoid rodents, Evolution, **42**, 391–395.

Burke A. C. (1989a). Epithelial-mesenchymal interactions in the development of the chelonian Bauplan, Fortschr. Zool., **35**, 206–209.

Burke A. C. (1989b). Development of the turtle carapace: Implications for the evolution of a novel bauplan, J. Morphol., **199**, 363–378.

Buss L. W. (1987). The Evolution of Individuality, Princeton University Press, Princeton, NJ.

Charnov E. L., Bull J. J. (1977). When is sex environmentally determined? Nature, **266**, 828–830.

Chernyak L., Tauber A. I. (1988). The birth of immunology: Metchnikoff, the embriologist, Cell. Immunol., **117**, 218–233.

Chernyak L., Tauber A. I. (1991). From Metaphor to Theory: Metchnikoff and the Origin of Immunology, Oxford University Press, New York.

Clack J. A. (1989). Discovery of the earliest known tetrapod stapes, Nature, **342**, 425–427.

Clark B., Murray J. (1969). Ecological genetics and speciation in land snails of the genus *Partula*, Biol. J. Linn. Soc., **1**, 31–42.

Clarke C. A., Sheppard P. M., Thornton I. W. B. (1968). The genetics of the mimetic butterfly *Papilio memnon*, Philos. Trans. R. Soc. Lond., [B], **254**, 37–89.

Conklin E. G. (1915). Heredity and Environment in the Development of Men, Princeton University Press, Princeton, NJ.

Conover D. O., Heins S. W. (1987). Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish, Nature, **326**, 496–498.

Conway Morris S., Whittington H. B. (1979). The animals of the Burgess Shale, Sci. Am., **240(1)**, 122–133.

Darwin C. (1859). The Origin of Species, John Murray, London.

Dobzhansky T. G. (1937). Genetic and the Origin of Species, Columbia University Press, New York.

Elinson R. P. (1987). Changes in developmental patterns: Embryos of amphibians with large eggs. In: R. A. Raff and E. C. Raff (eds.), Development as an Evolutionary Process, Alan R. Liss, New York, pp. 1–21.

Fraser S., Keynes R., Lumsden A. (1990). Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions, Nature, **344**, 431–435.

Gans C. (1989). Stages in the origin of vertebrates: Analysis by means of scenarios, Biol. Rev., **64**, 221–268.

Gans C., Northcutt R. G. (1983). Neural crest and the origin of vertebrates: A new head, Science, **220**, 268–274.

Garstang W. (1922). The theory of recapitulation: a critical restatement of the biogenetic law, J. Linn, Soc. Zool., **35**, 81–101.

Garstang W. (1928). Presidential address to the British Association for the Advancement of Science, Section D, Republished in Larval Form and Other Zoological Verses, 1985. University of Chicago Press, Chicago, pp. 77–98.

Gasman D. (1971). The Scientific Origins of National Socialism: Social Darwinism in Ernst Haeckel and the German Monist League, MacDonald, London.

Gemmill J. F. (1912). The development of the starfish *Solaster endica* (Forbes). Trans. Zool. Soc. Lond., **20**, 1–72.

Gilbert S. F. (1978). The embryological origins of the gene theory, J. Hist. Biol., **11**, 307–351.

Gilbert S. F. (1988). Cellular politics: Ernest Everett Just, Richard B. Goldschmidt, and the attempt to reconcile embryology and genetics. In: R. Ranger, K. R. Benson and J. Maienschein (eds.), The American development of Biology, University of Pennsylvania Press, Philadelphia, pp. 311–346.

Gish D. T. (1973). Evolution? – The Fossils Say No! Creation-Life Publishers, San Diego.

Goldschmidt R. B. (1940). The Material Basis of Evolution, Yale University Press, New Haven.

Gould S. J. (1977a). Ever Since Darwin, Norton, New York.

Gould S. J. (1977b). Ontogeny and Phylogeny, Harvard University Press, Cambridge, MA.

Gould S. J. (1989). Wonderfull Life, Norton, New York.

Gould S. J. (1990). An earful of jaw, Natural History 1990(3), 12–23.

Gould S. J., Lewontin R. C. (1979). The spandrels of San Marcos and the Panglossian paradigm: A critique of the adaptationist program, Proc. R. Soc. London [B] **205**, 581–598.

Grant P. (1978). Biology of Developing Systems, Holt, Rinehart and Winston, New York.
Haeckel E. (1900). The Riddle of the Universe. Harper and Bros, New York.
Hampé A. (1959). Contribution à l'étude du développement et al régulation des déficiences et excédents dans la patte de l'embryon de poulet, Arch. Micr. Morph. Exp., **48**, 347–379.
Henry J.J., Amemiya S., Wray G.A., Raff R.A. (1989). Early inductive interactions are involved in restricting cell fates of mesomeres in sea urchin embryos, Dev. Biol., **136**, 140–153.
Holder N. (1983). Developmental constraints and the evolution of vertebrate limb patterns, J. Theor. Biol., **104**, 451–471.
Holland P.W.H. (1990). Homeobox genes and segmentation: co-option, co-evolution, and convergence, Sem. Dev. Biol., **1**, 135–145.
Hopson J.A. (1966). The origin of the mammalian middle ear. Am. Zool., **6**, 437–450.
Jefferies R.P.S. (1986). The Ancestry of the Vertebrates, British Museum of Natural History, London.
Jones M.L., Gardiner S.L. (1989). On the early development of the vestimentiferan tube worm *Ridgeia* sp. and observations on the nervous system and trophosome of *Ridgeia* sp. and *Riftia pachyptila*, Biol. Bull. **177**, 254–276.
Kauffman S.A. (1993). Origins of Order, Oxford University Press, New York.
Kemp T.S. (1982). Mammal-Like Reptiles and the Origin of Mammals, Academic Press, New York.
King M.-C., Wilson A.C. (1975). Evolution at two levels in humans and chimpanzees, Science, **188**, 197–116.
Kline D., Simoncini L., Mandel G., Maue R.A., Kado R.T., Jaffe L.A. (1988). Fertilization events induced by neurotransmitters after injection of mRNA in *Xenopus* eggs, Science, **241**, 464–467.
Kovalevsky A. (1871). Weitere Studien II. die Entwicklung der einfachen Ascidien, Arch. Micr. Anat., **7**, 101–130.
LaBarbera M. (1990). Principles of design of fluid transport systems in zoology, Science, **249**, 992–1000.
Langille R.M., Hall B.K. (1989). Developmental processes, developmental sequences and early vertebrate phylogeny, Biol. Rev., **64**, 73–91.
Langman J. (1981). Medical Embryology, William and Wilkins, Baltimore.
Larson A., Wake D.B., Maxson L.R., Highton R. (1981). A molecular phylogenetic perspective on the origins of morphological novelties in the salamander of the tribe plethodontini (Amphibia, Plethodontidae), Evolution, **35**, 405–422.
Lillie F.R. (1898). Adaptation in cleavage, Biological Lectures from the Marine Biological Laboratories, Woods Hole, Massachusetts, Ginn, Boston, pp. 43–67.
Margulis L., Schwartz K.V. (1988). The Five Kingdoms, 2nd Ed., W.H. Freeman, San Francisco.
Mayr E. (1963). Animal Speciation and Evolution, Harvard University Press, Cambridge.
Mayr E., Provine W. (1980). The Evolutionary Synthesis: Perspectives on the Unification of Biology, Harvard University Press, Cambridge.
Metchnikoff E. (1886). Embryologische Studien an Medusen. Ein Beitrage zur Genealogie der Primitive-Organe, Vienna.
Metchnikoff E. (1891). Zakon zhizni. Po povodu nekotorykh proizvedenii gr. Tolstogo, Vest. Evropy, **9**, 228–260, Quoted and translated in Chernyak and Tauber, 1990, From Metaphor to Theory: Metchnikoff and the Origin of Immunology, Oxford University Press, New York.
Mivart St.G. (1871). On the Genesis of Species, Macmillan, London.
Müller F. (1864). Für Darwin, Engelmann, Leipzig.
Müller G.B. (1989). Ancestral patterns in bird limb development: A new look at Hampé's experiment, J. Evol. Biol., **1**, 31–47.
Ospovat D. (1981). The Development of Darwin's Theory, Cambridge University Press, Cambridge.
Oster G.F., Wilson E.O. (1978). Caste and Ecology in the Social Insects, Princeton University Press, Princeton, N. J.
Oster G.F., Shubin N., Murray J.D., Alberch P. (1988). Evolution and morphogenetic rules: The shape of the vertebrate limb in ontogeny and phylogeny, Evolution, **42**, 862–884.
Owen R. (1848). On the Archetype and Homologies of the Vertebrate Skeleton, London.
Rabinow L., Dickinson W.J. (1986). Complex *cis*-acting regulators and locus structure of *Drosophila* tissue-specific ADH variants, Genetics, **112**, 523–537.
Raff R.A., Kaufman T.C. (1983). Embryos, Genes, and Evolution, Macmillan, New York.
Raff R.A., Wray G.A. (1989). Heterochrony: Developmental mechanisms and evolutionary results, J. Evol. Biol., **2**, 409–434.
Raff R.A., Wray G.A., Henry J.J. (1991). Implications of radical evolutionary changes in early development for concepts of developmental constraint. In L. Warren, M. Meselson (eds.), New Perspectives in Evolution, Liss/Wiley, New York.
Reichert C.B. (1837). Entwicklungsgeschichte der Gehorknochelchen der sogenannte Meckelsche Fortats des Hammers. Müller's Arch. Anat. Phys. vissensch. Med., 177–188.
Renfree M.B. (1982). Implantation and placentation. In: C.R. Austrin and R.V. Short (eds). Reproduction in Mammals 2: Embryonic and Fetal Development, Cambridge University Press, Cambridge.
Romer A.S. (1970). The Chanares (Argentina) Triassic reptile fauna VI, A chiniquodontid cynodont with and incipient squamosal-dentary jaw articulation, Breviora, **344**, 1–18.
Roux W. (1894). The problems, methods, and scope of developmental mechanics, Biological lectures of the Marine Biology Laboratory, Woods Hole, Ginn, Boston, pp. 149–190.
Schmalhausen I.I. (1949). Factors of Evolution: The Theory of Stabilizing Selection, Blakiston, Philadelphia.
Slack J.M.W. (1983). From Egg to Embryo: determinative Events in Early Development, Cambridge University Press.
Slijper E.J. (1962). Whales (Translated by A.J. Pomerans). Basic Books, New York.
Spemann H. (1901). Über Correlationen in der entwicklung des Auges, Verh. Anat. Ges. [Vers. Bonn], **15**, 61–67.
Stein G.J. (1988). Biological science and the roots of Nazism, Am. Sci., **76**, 50–58.
Stockard C.R. (1941). The genetic and endocrine basis for differences in form and behavior as elucidated by studies of contrasted pure-line dog breeds and their hybrids, Am. Anat. Memoirs 19.
Thomson K.S. (1988). Morphogenesis and Evolution, Oxford University Press, New York.
Torrey T.W., Feduccia A. (1979). Morphogenesis of the Vertebrates, Wiley, New York.
Van Valen L.M. (1976). Energy and evolution, Evol. Theor., **1**, 179–229.
von Baer K.E. (1828). Entwicklungsgeschichte der Thiere: Beobactung und Reflexion, Bornträger, Koningsberg.
von Baer K.E. (1886). Autobiography of Dr. Karl Ernst von Baer. (Translated by H. Schneider.) Science History Publications, Canton, MA, pp. 261–262.
Waddington C.H. (1938). The morphogenetic function of a vestigial organ in the chick, J. Exp. Biol., **15**, 371–376.
Waddington C.H. (1940). Organisers and Genes, Cambridge University Press, Cambridge.
Waddington C.H. (1956). Principles of Embryology, Allen and Unwin, London.
Waddington C.H., Needham J., Brachet J. (1936). Studies on the nature of the amphibian organization centre. III. The activation of the evocator, Proc. R. Soc. London [B] **120**, 173–198.
Wake D.B., Larson A. (1987). A multidimensional analysis of an

evolving lineage, Science, **238**, 42–48.
Wheeler D. (1986). Developmental and physiological determinants of caste in social hymenoptera: Evolutionary implications, Am. Nat., **128**, 13–34.
Whittington H. B. (1985). The Burgess Shale, Yale University Press, New Haven.
Wilson E. B. (1898). Cell lineage and ancestral reminiscence, Biological Lectures from the Marine Biological Laboratories, Woods Hole, Massachusetts, Ginn, Boston, pp. 21–42.
Wilson E. O. (1971). The Insect Societies, Harvard University Press, Cambridge, MA.
Winsor M. P. (1969). Barnacle larvae in the nineteenth century: A case study in taxonomic theory, J. Hist. Med. Allied Sci., **24**, 294–309.
Wolpert L. (1983). Constancy and change in the development and evolution of pattern. In: B. C. Goodwin, N. Holder and C. C. Wylie (eds.), Development and Evolution, Cambridge University Press, Cambridge.
Zangerl R., Williams M. E. (1975). New evidence on the nature of the jaw suspension in Paleozoic anacanthus sharks, Paleontology, **18**, 333–341.

Эпилог

Очерк некоторых нерешенных проблем

Не тебе суждено закончить работу.
Но тебе не удастся уклониться от ее выполнения.

РАББИ ТАРФОН (ПРИМЕРНО 70 г.)

Наши знания в области биологии необычайно расширились с того времени, когда проводили свои эксперименты и предлагали новые гипотезы. Ру, Шабри и Вейсман. Отпраздновав, однако, столетие их работ, мы в еще большей степени, чем они, осознали огромную сложность процессов развития. Когда-то Спенсер сравнил науку с находящимся в океане непознанного воздушным шаром, который продолжают надувать: чем больше становится объем шара, тем большая площадь его поверхности соприкасается с областью неизвестного. Именно на поверхности шара и происходит становление разных наук.

Если судить о состоянии важнейших научных проблем по учебникам, то создается впечатление, что большая часть этих проблем уже решена. Между тем интригующая сторона современной биологии развития как раз и заключается в том, что наиболее интересные проблемы еще ждут своего решения. Более того, не существует какого-то одного конкретного пути их решения. Замечательная особенность биологии развития заключается в том, что при изучении ее проблем можно не ограничиваться каким-то одним набором видов животных, условий окружающей среды или уровней организации. Для их изучения можно использовать методы морфологии, молекулярной, клеточной и эволюционной биологии; объектом исследования может быть любой организм, обитающий на Земле. Ниже представлен лишь небольшой перечень важнейших вопросов, сгруппированных в соответствии с тремя частями книги, и заслуживающих того, чтобы уделить их рассмотрению свое время и силы.

Часть I

Не многие аспекты биологии развития подверглись столь кардинальным изменениям, как изучение оплодотворения; здесь возникли совершенно новые направления исследований. Содержит ли плазматическая мембрана яйца рецептор для спермия? Каковы молекулярные механизмы слияния спермия и яйцеклетки? Почему разные ионные каналы открываются в нужное время? Как кальций высвобождается из мембранных пузырьков и как он индуцирует слияние мембран? Какова механика миграции пронуклеусов? Как осуществляется капацитация спермия млекопитающих? Чем объясняются различия между мужским и женским пронуклеусами у млекопитающих и как возникают эти различия?

Объяснить полностью механизмы дробления также пока не удается; мы до сих пор не понимаем процессов, ответственных за положение и угол наклона митотического веретена. Неизвестен и временной механизм клеточного деления, а изучение координации между синтезом ДНК, кариокинезом, синтезом мембраны, цитокинезом и цитоскелетом еще только началось. Переход на стадию средней бластулы (midblastula transition), по-видимому, контролируется удлинением клеточного цикла, но мы не знаем, какой фактор (или факторы) регулирует изменчивость продолжительности интерфазы между митозами.

Координация гаструляционных движений на молекулярном уровне пока непонятна ни у одного организма, неизвестна и связь между клеточными делениями, гаструляцией и экспрессией генов. Механизмы направленного движения клеток во многом остаются тайной. Не разгаданы и механизмы, посредством которых эктодермальные клетки получают инструкции, побуждающие превратиться их либо в эпителиальные, либо в нервные. Проблемы развития мозга или нервной системы составляют отдельную дисциплину – нейробиологию развития, в сферу компетенции которой входят следующие вопросы: каким образом нейроны мигрируют в специфические области коры головного мозга; почему нейроны с одними клетками образуют синапсы, а с другими – нет.

Мы обсудили некоторые механизмы формирования сердца, но многие вопросы в этой области до сих пор еще остаются без ответа. Если сердце формируется на средней линии зародыша, то как оно перемещается на одну сторону тела? Как крупные кровеносные сосуды, отходящие от сердца, соеди-

няются с капиллярами, образующимися в органах? Каковы механизмы, определяющие дифференцировку мезодермы? Не изучены и эволюционные аспекты многих процессов развития. Например, как возникает хорда и каковы ее изначальные функции? Недавно Беррил (Berrill, 1987) завершил 50-летнюю работу над этой проблемой, предложив гипотезы, касающиеся биомеханики и экологии низших хордовых.

Другой эволюционный аспект связан с происхождением плаценты. Один из подходов к решению этой проблемы (Renfree, 1982) заключается в изучении внезародышевых оболочек сумчатых и однопроходных, таких, как утконос. (Это яйцекладущее млекопитающее с носом, похожим на утиный, считалось «грубой австралийской мистификацией» до 1884 г., когда Колдуэлл (Caldwell) телеграфировал в Британское общество: «Однопроходное яйцекладущее, яйцо меробластическое».) Способы развития плаценты и ее функции только начинают проясняться.

Часть II

Как и в большинстве учебников, содержащих разделы по молекулярной биологии, в соответствующих главах этой книги представлены прежде всего успехи, достигнутые в этой области. И это нетрудно сделать, потому что и достижения молекулярной биологии, и энтузиазм молекулярных биологов достойны восхищения. Однако было бы ошибкой полагать, что молекулярный анализ процессов развития в основном завершен. Молекулярным биологам еще предстоит решить сложные проблемы дифференцировки и морфогенеза. Один из моих друзей однажды начал свою лекцию так: «Уотсон и Крик выполнили наиболее легкую часть задачи – разрешили проблему передачи генов. Более сложная проблема – экспрессия генов – остается нерешенной».

Молекулярный анализ развития сфокусирован главным образом на терминальных этапах дифференцировки. Так, нам уже известны *цис*- и *транс*-регуляторные элементы для небольшого числа продуктов дифференцированных клеток. Но эти белки (например, иммуноглобулины, глобины, вителлогенины) образуются на последних стадиях долгого пути развития и являются в той же мере следствием дифференцировки, в какой и ее причиной. Мы знаем, что гены легкой цепи иммуноглобулинов в В-лимфоцитах активируются специфическими *транс*-регуляторными белками, связывающимися с промотором и энхансером. Но мы не имеем ни малейшего представления о том, чем активируются эти регуляторные гены. Яйцо и В-лимфоцит отделяют друг от друга многие поколения клеток, перед которыми по ходу развития неоднократно вставала задача решающего выбора (внутренняя клеточная масса, а не трофобласт; гемангиобласт кровяного островка, а не фибробласт; предшественник лимфоцита, а не предшественник клеток крови; В-клетка, а не Т-клетка), и молекулярная основа этих событий почти полностью неизвестна.

Кроме того, нам до сих пор не понятны молекулярные механизмы детерминации и индукции. И если мы знаем, что у оболочников желтый серп играет важную роль в инструктировании бластомеров к дифференцировке в мышечные клетки, то ни химическая природа детерминанта, ни то, как он взаимодействует с геном, нам неизвестны. Возможность клонировать гены и выявлять их продукты открыла пути для поиска цитоплазматических детерминантов. Наиболее удобными организмами для генетического анализа процессов детерминации оказались дрозофила и крошечная нематода *Caenorhabditis elegans*. В обоих случаях, чтобы добиться каких-либо успехов в поисках генов, ответственных за детерминацию судьбы клеток, молекулярные биологи объединяются с биологами развития (а иногда ими становятся). Несомненно, упомянутые организмы в ближайшие годы будут использоваться для конструирования путей развития, на которых будет прослежена экспрессия генов от зиготы до формирования сложных органов. Обнаружив, что можно изменить судьбу клетки с помощью дифференциального процессинга РНК, исследователи создали новую область науки.

Однако в развитии этих двух видов индукционные взаимодействия играют лишь весьма незначительную роль. А между тем в 1987 г. были опубликованы две работы, авторы которых – Ф. Х. Уилт и Дж. Б. Гердон – призвали к изучению сложных, но эмбриологически так много значащих проблем, связанных с индукционными взаимодействиями. В обеих статьях утверждалось, что молекулярная биология достигла возраста, достаточно зрелого для того, чтобы приступить к решению действительно сложных проблем эмбриологии. Нет сомнения в том, что многие нерешенные молекулярные проблемы останутся для следующего поколения биологов развития.

Молекулярная биология потенциально способна объяснить многие явления, происходящие в процессе развития, однако существуют такие аспекты развития, которые непосредственно геномом не контролируются. Не всегда можно предсказать фенотип организма, исходя из его генотипа или генотипа его родителей. Как уже обсуждалось ранее, дифференцировка плазматических клеток направляется антигенами, присутствующими в их микроокружении; детерминация пола у рептилий контролируется температурой, а нервные связи могут быть усилены или отменены в зависимости от использования или неиспользования нейронов. У книдарий

геном может дать либо гидрант, либо медузу. В этих ситуациях гены обеспечивают возможный набор фенотипов (называемый **нормой реакции**), а условия среды вызывают реализацию одной из возможностей. Механизмы взаимодействия условий среды с наследственным потенциалом особи – еще одна область, требующая новых исследований.

Дополнительные сведения и гипотезы

Молекулярная биология и эмбриология

Одна из наиболее сильных и замечательных сторон биологии развития – это свобода выбора. Полноправным биологом развития может считать себя и тот, кто занимается переносом мышиных глобиновых генов в культивируемые клетки, и тот, кто изучает оседание личинок моллюсков в эстуарии. На первом заседании Симпозиума по росту (позже ставшим Обществом биологии развития) Н. Дж. Беррил перечислил 15 дисциплин, каждая из которых вносит свой вклад в обсуждаемые на Симпозиуме проблемы развития. В последние годы этот список пополнился новыми дисциплинами, и среди них – иммунология, онкология и молекулярная биология.

Ясно, что биология развития представляет собой продукт синтеза целого ряда дисциплин, однако традиционно она основывается на данных эмбриологии. Именно эмбриология определила основные проблемы биологии развития и в значительной степени методологию исследователей. В последние годы, однако, молекулярная биология несколько потеснила ведущее положение эмбриологии, послужив источником противоречий внутри биологии развития. Многие биологи развития опасаются подмены эмбриологии молекулярной биологией не из-за результатов применения молекулярно-биологических методов, а по причине радикальных отличий методологии молекулярной биологии от методологии эмбриологии. В самом деле, противостояние эмбриологии и молекулярной биологии сравнимо с противостоянием натурализма и абстрактного формализма. Различие между ними легко увидеть, представив себе скульптуру Микеланджело рядом со скульптурой Бранкузи.

Абстрактный формализм (подобный тому, который мы наблюдаем в современном искусстве) старается проникнуть во внутреннюю сущность явлений, пытаясь выявить скрытую реальность, «более реальную, чем сама реальность». Молекулярная биология рассматривает организм как результат проявления его генов, сводя всю эмбриологию к изучению дифференциальной экспрессии генов. Точно так же, как художник-абстракционист может изобразить стол в виде линии, не заботясь о том, какой он – из дуба, пластика или металла, красный или белый, – молекулярные биологи исторически игнорируют видовые различия, пытаясь найти скрытую общность живых организмов. Эстетический пафос молекулярной биологии – простота и единообразие. Все организмы рассматриваются как кибернетические системы, генетический код которых содержит программу определяющую поток информации к тем или иным клеткам. Все клетки пользуются одинаковым кодом и преобразуют закодированную информацию с помощью одинаковых расшифровывающих механизмов (Oyama, 1985; Kaye, 1986).

Этот редукционистский формализм находится в явном противоречии с натуралистическим организмом эмбриологической традиции. Эмбриология взывает к чувствам. Во главу угла она по традиции ставит сложность организмов и их индивидуальные особенности. И экспериментальной, и описательной эмбриологии свойствен сенсуалистический подход к явлениям развития; эмбриологи неустанно подчеркивают важность организма как целого и среды его обитания. И если усилия молекулярных биологов сосредоточены на анализе генов, манипулировать которыми можно и вне организма, то эмбриологи подчеркивают, что «организм в его целостности так же необходим для понимания отдельных его элементов, как и элементы – для понимания целостности организма» (Haraway, 1976). В соответствии с эстетикой эмбриологии организм воспринимается в его развивающейся целостности, как источник удивления и вдохновления на дальнейшие исследования. Так, Гольтфретер (Holtfreter, 1968) говорил, что по мере его наблюдений над развивающимся зародышем амфибий он «все больше приближается к пониманию внутренней гармонии, интеграции, исполненности смысла и взаимозависимости структур и функций». Для него, как и для его коллеги Виктора Гамбургера, «истинным учителем всегда был и остается зародыш».

Эти различия в перспективе ярко проявились на одном из последних семинаров, когда докладчик заметил, что гомеозисные мутации, наблюдаемые у дрозофилы, не встречаются у млекопитающих. Эмбриолог ответил, что конечности дрозофилы формируются в результате выворачивания имагинальных дисков, а конечности млекопитающих – в

результате взаимодействий между мезодермой и апикальным эктодермальным гребнем, следовательно нет оснований для поисков у млекопитающих мутаций, подобных мутации *Bithorax*. Молекулярный биолог возразил, что этот аргумент рассыпается в прах перед результатами 30-летних исследований, показавших, что фундаментальные генетические механизмы у всех организмов одинаковы.

Между молекулярной биологией и эмбриологией существует целый ряд взаимодействий. Биологию развития чрезвычайно обогатили открытия в области молекулярной биологии, а будущее сулит ей еще большие выгоды. В свою очередь молекулярная биология во многом изменилась, встретившись со сложностью зародыша. Теперь уже невозможно согласиться с господствовавшей ранее в молекулярной биологии точкой зрения, в соответствии с которой считалось, что молекулярная биология уже решила все основные проблемы биологии и молекулярный анализ эмбриогенеза – это всего-навсего правильное приложение существующих знаний. Биология развития многое приобрела в результате взаимодействия этих двух дисциплин. Биология развития больше не является ни частью молекулярной биологии, ни продолжением эмбриологии. Поэтому при распределении фондов и ресурсов следует обеспечивать условия, при которых ни одна из этих дисциплин не развивалась бы за счет другой.

Различия между традициями эмбриологии и молекулярной биологии можно проследить исторически вплоть до противоречий между Аристотелем и Платоном. Еще Риттер (Ritter, 1919) утверждал, что некоторые из фундаментальных противоречий биологии колеблются между абстрактным формализмом и органицизмом. Пока мы не сможем их разрешить, биология развития, которая помимо всего прочего изучает любую часть любого организма как функцию времени, должна включать оба направления.

Часть III

Одна из важнейших задач биологии развития – перевод рабочих дефиниций в действительные вещества и процессы. Такими рабочими дефинициями, ждущими своего воплощения в реальные физические сущности, изобилует область морфогенеза. Например, что такое «поле»? Можно экспериментальным путем убедиться в его существовании, но как у организма образуется поле, и каким образом решается вопрос о том, какие клетки будут входить в его состав, а какие – нет? Изучение щелевых контактов, молекул клеточной адгезии и гомеозисных генов может объяснить, как возможность формирования глаза, конечности или челюсти передается от генома к полю и, наконец, реализуется организмом.

Точно так же существуют многочисленные явления, объяснить которые можно было бы наличием градиента некоего вещества. В большинстве случаев такие вещества не обнаружены. Выделению соответствующих молекул могло бы способствовать применение иммунологических методов. Кроме того, механизмы дифференциального ответа клеток на разные концентрации морфогена все еще неизвестны. Каким образом осуществляется инструктирование клеток к синтезу различных продуктов в зависимости от этой концентрации?

Одна из основных составляющих морфогенеза – направленность и число клеточных делений. Что заставляет клетку сделать определенное число делений и не больше? Что инструктирует клетку к выбору направления клеточных делений? В предыдущих главах обсуждалось несколько моделей клеточной миграции, клеточной адгезии, сегментации и метаморфоза. Бóльшая часть этих моделей не была подтверждена на молекулярном или клеточном уровнях. Мы до сих пор не можем заполнить огромный пробел в наших знаниях, касающийся связи между экспрессией генов и формированием органов.

Одна из наиболее увлекательных областей исследования касается путей, на которых эволюционные изменения определяются закономерностями онтогенеза. Если знания генетических законов достаточно для объяснения микроэволюционных изменений (на уровне вида и ниже), то анализ макроэволюционных процессов (надвидовой уровень) требует знаний законов развития. Эти законы (если бы они были известны) могли бы показать нам, к каким изменениям могут привести тканевые взаимодействия того или иного типа. Эйнштейн заметил когда-то, что его работы были направлены на то, чтобы определить, был ли у Бога выбор при сотворении Вселенной. Современные эволюционные биологи задаются аналогичным вопросом: были ли животные, сформированные в течение прошедших миллиардов лет, единственно возможными животными в соответствии с законами морфогенеза? Специалисты в области эволюционного учения ждут от биологии развития свода правил, которые позволили бы предсказать возможные эволюционные трансформации данных структур и отношений (Wake, Larson, 1987). Эти законы развития предстоит еще открыть. Генетик и эмбриолог Уоддингтон (Waddington, 1962), обсуждая проблемы генетики и морфогенеза, писал:

«Генетика сделала прорыв... Но следующий прорыв, который нужен нам для понимания фунда-

ментальных биологических процессов,– это прорыв в области эмбриологии. Будем надеяться, что он произойдет в скором времени».

Быть биологом развития – это значит всегда продолжать учиться. Необходимо сохранять это состояние академической неотении в научной отрасли, способной дать столь обширные фундаментальные знания.

ЛИТЕРАТУРА

Berrill N. J. (1939). Forward. Growth Suppl. **1**, i–ii.
Berrill N. J. (1987). Early chordate evolution. I. Amphioxus, the riddle of the sands. II. Amphioxus and ascidians: To settle or not to settle. Inter. J. Invert. Rep. Dev. **11**, 1–27.
Gurdon J. B. (1987). Embryonic induction – Molecular prospects. Development. **99**, 285–306.
Haraway D. J. (1976). Crystals, Fabrics and Fields: Metaphors of Organicism in Twentieth-Century Developmental Biology. Yale University Press, New Haven.
Holtfreter J. (1968). Address in honor of Victor Hamburger. In *M. Locke* (ed.), The Emergense of Order in Developing Systems, Academic, New York, pp. ix–xx.
Kaye H. L. (1986). The Social Meaning of Modern Biology. Yale University. Press, New Haven.
Oyama S. (1985). The Ontogeny of Information. Cambridge University Press, Cambridge.
Renfree M. B. (1982). Implantation and placentation. In *C. R. Austin* and *R. V. Short*, Reproduction in Mammals 2: Embryonic and Fetal Development. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 26–99.
Ritter W. E. (1919). The Unity of the Organism. Gorham Press, Boston.
Waddington C. H. (1962). New Patterns in Genetics and Development. Columbia University Press, New York, p. 241.
Wake D. B., Larson A. (1987). Multidimentional analysis of an evolving lineage. Science, **238**, 42–48.
Wilt F. H. (1987). Determination and morphogenesis in the sea urchin embryo. Development, **100**, 559–575.

Литература к эпиграфам

Bender W., Peifer M. (1987). Oncogenes take wings, Cell, **50**, 519–520.

Borges J. L. (1962). "The Library of Badel" in Ficciones, Grove Press, New York, pp. 87–88.

Boveri T. (1904). Ergebnisse über die Konstitution der chromatishen Substanz des Zelkerns, Jena (G. Fischer), p. 123.

Claude A. (1974). The coming of age of the cell. Nobel lecture, reprinted in Science, **189** (1975), 433–435.

Coleridge S. T. (1885). Miscellanea, Bohn, London, p. 301.

Conrad J. (1920). The Rescue: A Romance of the Shallows, Doubleday, Page, and Co., Garden City, NJ (1924), p. 447.

Darwin E. (1791). Quoted in Ghiselin M. T. (1974). The Economy of Nature and the Evolution of Sex, University of California Press, Berkeley, p. 49.

Doyle A. C. (1891). "A Case of Identity" in The Adventures of Sherlock Holmes, Reprinted in The Complete Sherlock Holmes Treasury (1976), Crown, New York, p. 31.

Einstein A. (1953). Aphorisms for Leo Baeck, Reprinted in Ideas and Opinions (1954), Crown, New York, p. 28.

Eliot T.S. (1936). "The Hollow Men", Part V, in Collected Poems 1909–1962, Harcourt, Brace and World, New York, pp. 81–82, Copyright by T.S. Eliot.

Eliot T.S. (1942). "Little Gidding", in Four Quartets, Harcourt, Brace end Company, New York (1943), p. 39, Copyright by T.S. Eliot.

Garstang W. (1922). The Theory of Recapitulation: A critical restatement of the biogenetic law. J. Linn. Soc. Zool., **35**, 81–101.

Hardin G. (1968). Exploring New Ethics for Survival: The Voyage of the Spaceship Beagle, Viking Press, New York, p. 45.

Huxley T. (1895). Quoted in Mitchell P. L. (1900), Thomas Henry Huxley: A Sketch of Lus Life and Work, Putnam, New York, p. 279.

Jacob F., Monod J. (1963). Genetic repression, allosteric inhibition, and cellular differentiation. In: M. Locke (ed.), Cutodifferentiation and Macromolecular Synthesis, Academic, New York, p. 31.

Jonas H. (1966). The Phenomenon of Life, Dell, New York, p. χ.

Just E. E. (1939). The Biology of the Cell Surface, Blakiston, Philadelphia, p. 288,

Kant I. (1790). Critique of Judgement, Translated by J. H. Bernard Hafner, New York, pp. 267–268.

Kingsley C. (1863). The Water-Babies: A Fairy Tale for a Land Baby, Chapman and Hall, London, p. 241.

Lessing G. E. (1779). Eine Duplik. In: F. Muncker (ed.) Sämtliche Schriften 13, Goschen, Leipzig (1897), p. 23.

Monod J., Jacob F. (1961). Teleonomic mechanism in cellular metabolism, growth, and differentiation, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., **26**, 389–401.

Muller H. J. (1922). Variation due to change in the individual gene, Am. Nat., **56**, 32–50.

Needham J. (1967). Order and Life, M. I. T. Press, Cambridge, MA, p. χv.

Rabbi Tarfon (ca. 54), Pirke Abot 2, 16.

Rastand J. (1960). Carnets d'un biologiste, Librairie Stock, Paris.

Rexroth K. (1952). "Golden Section" In: Natural Numbers, New Directions, New York.

Roux W. (1894). The problems, methods, and scope of developmental mechanics, Biol. Lect. Woods Hole, 3, 149–190.

Rushdie S. (1989). The Satanic Verses. Viking, New York, p. 8.

Russel E. S. (1916). Form and Function: A Contribution to the History of Animal Morphology, John Murray, London, p. 324.

Shelley M. W. (1831). Frankenstein, or The Modern Prometheus, Oxford University Press, (1969), p. 36.

Spemann H. (1943). Forschung und Leben, Quoted in Horder T. J., Witkowski J. A. and Wyley C. C. (1986), A History of Embryology, Cambridge University Press, Cambridge, p. 219.

Tennyson A. (1886). Idylls of the King, Macmillan, London (1958), p. 292.

Thomas L. (1979). "On Embryology". In: The Medusa and the Snail, Viking Press, New York, p. 157.

Virchow R. (1858). Die cellularpathologie in ihre Begrundung auf physiologische und pathologische Geweblehre, Berlin, p. 493.

Virgil (37 B.C.). Georgics II, 490.

Waddington C. H. (1956). Principles of Embryology, Macmillan, New York, p. 5.

Weiss P. (1960). Ross Granville Harrison, 1870–1959, Memorial minute, Rockfeller Inst. Quarterly, p. 6.

Whitehead A. N. (1919). The Concert of Nature, University of Michigan Press, Ann. Arbor (1957). p. 163.

Whitehead A. N. (1934). Nature and Life, Cambridge University Press, Cambridge, p. 41.

Whitman C. O. (1894). Evolution and epigenesis, Biol. Lect. Woods Hole, 3, 205–224.

Whitman W. (1855). "Song of Myself". In: S. Bradley (ed.), Leaves of Grass and Selected Prose, Holt, Rinehart & Winston, New York (1949), p. 1.

Whitman W. (1867). "Inscriptions". In: S. Bradley (ed.), Leaves of Grass and Selected Prose, Holt, Rinehart & Winston, New York, (1949), p. 1.

Williams C. M. (1958). Quoted in J. A. Miller (1983), A brain for all seasons, Science News, **123**, 268–269.

Wilson E. B. (1925). The Cell in Development and Heredity, 3 ed Ed. Macmillan, New York, p. 1112.

Wolpert L. (1983). Quoted in J. M. W. Slack (1983), From Egg to Embryo: Determinative Events in Early Development, Cambridge University Press, Cambridge, p. 1.

Указатель латинских названий

Номера страниц, набранные **жирным** шрифтом, относятся к рисункам

Acetabularia crenulata I: 16, **17**
– *mediterranea* I: 16, **17**, **18**
Acoelomata I: 31
Adalaria proxima III: 182
Aequoria foskalea III: **297**
Agnata III: 304
Ambystoma III: 99, 105
– *gracilis* III: **172**
– *jeffersonianum* I: **63**
– *maculatum* III: 98, **99**
– *mexicanum* III: 95, 170–171, **172**, **306**
– *platineum* I: **63**
– *tigrinum* III: 171, **172**
Amphioxus II: 253
Aplysia californica III: 182
– *juliana* III: 182
– *parvulata* III: 182
Apterigota III: 303
Arbacia I 43, **58**; II: **207**
– *punctulata* I: 42, 45, 65, **208**; III: **9**, 181
Archaeopterix III: 59
Arthrobacter luteus II: **83**
Arthroleptella I: 76
Ascaris, I: **41** (См. также *Parascaris*)
Atrophaneura aristolochiae III: 314
– *coon* III: 314

Bacillus amyloliquifaciens II: 81, **82**
Bankia gouldi III: 182
Bolitoglossa occidentalis III: 171
– *rostrata* III: 171
– *subpalmata* III: 171
Boltenia II: 15
Bombyx mori II: 127, **191**
Bonellia III: 316
– *viridis* III: 255
Branchiostoma I: **41**
Brachydanio rerio I: **98**
Buccinum undatum II: **18**

Caenorhabditis III: 76, 110, 236, 269
– *elegans* II: 20–23, 130, 132, **133**; III: 78–80, 251–252, 267, **268**
– *ramanei* III: 252
Calcichordata III: 304
Cataglyphis bombyana III: 200
Cecropia III: 12, 179, 181
Centipeda III: 304
Cephalohordata III: 304
Cerebratulus I: **41**
Chaetopterus I: 41
Chelydra scepentina III: **309**
Chironomus II: 65, 100, **201**
– *pallidivitatus* II: **102**
– *tentans* II: 67, 101, **103**, 184
Chlamydomonas I: 21, 22, 23, 24, 25
Chondrococcus hornemanni III: **182**
Chordata III: 304
Cidaris II: 206
Ciona II: 13
Clava squamata III: 297
Clypeaster japonicus I: 59
Cnemidophorus uniparens III: 274
Cnidaria I: 31
Cobeledus aculentes III: 311
Conodonti III: 304
Coregonus III: **274**
Crassostrea virginica III: **182**
Crepidula fornicata III: 255

Dendraster excentricus III: 182
Dentalium I: **41**; II: **17**
Dictyostelium II: 202, III: 25
– *discoideum* I: 28, **29**
Dicyema I: **41**
Dinophilus I: **41**
Diptera III: 302
Discoglossus pictus I: **69**
Doridella obscura III: **182**
Drosophila II: 65, **92**, **121**, **122**, **132**, 202, 213; III: 76, 78, 80, 110, 176, 236, 246–248, 281, **282**, 283
– *formella* II: 154; III: 302
– *hawaiiensis* II: 154; III: 302
– *hydei* III: 271
– *melanogaster* II: **66**, **68**, **90**, **101**, **104**, 120, **216**; III: **247**, 271, 274, 284
Dysdercus III: 183

Echinus II: 206
– *microtuberculatus* II: 43
Echinodermata III: 304
Electracrustulenta III: 182
– *pilosa* III: 182
Eleotherodactylus coqui III: 172, **173**
Elysia chlorotica III: 182
Escherichia coli I: **15**, II: 14, 83, **84**, 90, 91, 94, 141, **142**, 148, 210, **238**
Eudorina I: 24
– *elegans* I: **25**
Eurycea neotenes III: **172**
Euscelis III: **133**

Gonium I: **24**
Gnatostomata III: 304
Grantia I: **41**

Haemophilus aegyptius II: **83**
– *haemolyticus* II: **83**
– *influenzae* II: **83**
Haliotis I: 53
Hallucigenia III: **298**
Haminoea solitaria III: 182
Heliocidaris erithrogramma III: 173, **174**
– *tuberculata* III: 173, **174**
Helisoma III: 115, **116**
Hemichordata III: 304
Hemidactylium scutatum III: **306**
Herpes simplex II: 87, 88, **150**
Histriobdella I: 41
Homo sapiens I: 153; III: 310
Hyalophora cecropia III: **283**
Hydra attenuata III: **91**
– *magnipapillata* III: 93
– *pirardi* III: **91**
Hyla III: **99**

Hyanassa I: 84; II: **19**, **20**
– *obsoleta* II: 17

Lampsilis ventricola I: **86**p
Laurencia pacifica III: 182
Leptasterias hexactis III: 59, 309
Limnaea peregra I: 84
Liopelma I: 76
Lithophillum III: 182
Lithothamnion III: 182
Lyngbya majuscula III: 182
Lytechinus I: 54, **115**, II: 206, **208**
– *pictus* I: **77**, **117**; III: 174, 181
– *variegatus* I: **45**, **113**, **114**, **116**

Manduca III: 179
Marmota flaviventris III: 202
Megalocerus giganteus III: 200
Menidia menidia III: 318
Mercenaria mercenaria III: **182**
Metazoa III: 310
Micrococcus II: 159
Moraba virgo III: 274
Morpho peleides III: 90
Musca domestica III: 282
Mus domesticus III: 239, 240, 241
– *musculus* II: 216; III: 223, 239–240
Myrmica rubra III: 317
Mytilus edulis III: 182

Naegleria I: 19
– *gruberi* I: 18
Nassarius obsoletus III: 182

Necturus III: 171, 172
Neottiella III: **265**
Nereis I: **41**

Oltmannsiella I: 24
Oncopeltus fasciatus II: 165
Opabina III: 298
Ophlitaspongia pennata III: 182
Orthopyxis caliculata I: 42
Ostrea edulis III: 182
Otomesostoma I: **41**

Pandorina I: 24
Papilio memnon III: 314
Paracentrotus II: **43**
Parascaris II: 25–26
– *aequorum (Ascaris megalocephala)* II: 24
Patella vulgata I: **87**; II: 16; III **301**
– *coerulea* II: 16
Patiria I: **117**
Pectinaria I: **41**
Penaeus III: **295**
Peripatopsis I: 41
Pikaia gracilens III: 298, 299
Pheidole III: 318
– *pallidula* III: 317
Phestilla sibogae III: 182
Philippia radiata III: 182
Physarum polycephalum II: 220
Placopecten magellanicus III: 182
Planococcus citri II: 110
Pleodorina I: **24**
– *californica* I: 25
Podarke III: **300**
Polygordius III: **301**
Porites compressa III: 182
– *lobata* III: 182
Proteus anguinus III: **306**
Pterigota III: 302
Pycnoscelus surinamensis II: 275

Rana I: 67; III: 105, 172
– *catesbeiana* III: **169**
– *esculenta* II: 43
– *pipiens* I: **75**; II: 71, **72**, **74**, 75; III: **162**, 260, 275
– *temporaria (fusca)* II: **43**
Rheidole bicarinata III: 199
– *instabilis* III: **199**
Rostanga pulchra III: 182

Saccocirrus I: **41**
Serratia marcescens II: 83
Servanus scriba III: 252
Siren III: 171
Smittia II: 35; III: 134
Smyrna blomfildia III: **90**
Solaster III: 309
Sparus auratus III: 253
Spherechinus II: 206
Spirogale putorius III: 319
Spisula I: 41, 56; II: 202, 214
Streptomyces albus II: 83
Strongylocentrotus II: 206
– *drobachiensis* I: 45
– *franciscanus* I: **46**
– *purpuratus* I: 42, 45–47, **113**; II: **106**, 216
Styela II: 15
– *partita* I: 67, **68**, 87–88; II: 8, **9**
Stylocheilus longicauda III: 182
Stylonychia I: **16**
Synapta I: 77, 78
– *digita* I: 76

Teredo navalis III: 182
Tetraclita III: 295
Tetrahymena II: 191
Thalassema I: **41**
Thomomys III: **316**
Tonicella lineata III: 182
Toxoplasma gondii I: 179
Toxopneustes lividus I: 36
Treponema pallidum I: 179
Trinchesia aurantia III: 182
Triturus cristatus II: 52, 122
– *vulgaris (taeniatus)* II: **50**, 52
Trochus I: **84**
Trypanosoma brucei II: 99
Tubifex III: **300**
Tubularia indivisa III: 182

Uca pugnax III: 198, **199**
Ulva III: 182
Unio I: 86; III: 296
Urechis I: 54

Veratrum californicum I: 197
Vertebrata III: 304
Vestimentifera III: 301
Volvox I: **24**, 26–28
– *carteri* I: 25

Wachtiella II: 26
– *persicariae* II: 25

Xenopus: I: **68**, 69, 102; II: 16, 57–**60**, 85, 104, **106**, 129, 141, 146, 166, 169, 185, 202, 210, **211**, **217**, **218**, 228; III: 12, 13, 28, 45, 53, 74, **80**, 117–119, 123, 167, 172, 173, **260**, 276–277, 279, 280, 302, 320
– *laevis* I: 101, 106, 118, **119**, 129; II: 74–75, **105**, 115–118, 127, **128**, **195**, **216**; III: 116, **166**, 168, 259, 275, 278

Предметный указатель

Номера страниц, набранные жирным шрифтом, относятся к рисункам

Агрегация гистотипическая III: 9
– дифференциальное сродство клеток III: 9
– клеток III: 6–7
– молекулы клеточной адгезии III: 25–27
– у губок I: 31–32
–– слизевиков I: 29–30
АДГ *см.* Алкогольдегидрогеназа
Адгезионные молекулы субстрата III: 34–43
Адгезия III: 8. *См. также* Молекулы клеточной адгезии; Молекулы адгезии к субстрату
– дифференциальная III: 42
– лимфоцитов III: 73
– миграция нейронов III: 110–113
– термодинамическая модель III: 13–15
Аденилатциклаза III: 170
– мембранный транспорт III: 170
Адреналин: II: 6
Адренергические нейроны I: 174–175
Адренокортикотропный гормон (АКТГ), посттрансляционная регуляция II: 219–220
Адэпителиальные клетки III: 171
5-Азацитидин II: 156, 157
Акрозин I: 49
Акросомная реакция I: 43–45
–– у млекопитающих I: 48
Акросомный вырост I: 37
– пузырек I: 37
–– и сперматогенез III: 271–272
Аксолотль мутации, обусловленные материнским эффектом II: 209–211
– неотения III: 170–171
Аксон(ы) I: 157, 160–163
– контактное ориентирование III: 12–13, 110
– конус роста I: 160, **162**, III: 112
––– выделение серотонина III: 115
– микрошипы I: 160, **162**
– рост и миграция III: 109–116
–– направленный III: 110–116
– спинного мозга III: 114
Аксонема I: 38–39
АКТГ *см.* Адренокортикотропный гормон
– надмолекулярная сборка II: 226–227
– образование акросомного выроста I: 45
– формирование нервной трубки I: 151
Активатор плазминогена I: 95, 210; III: 287
Активация генов II: 109–110
– эмбрионального генома II: 216–217
– яйца I: 61–67
Актин II: 6
– мембранные белки III: 17–19
– миграция клеток III: 40–42
Актиномицин D I: 13, 18
– и метаморфоз III: 169–170
–– энуклеация ооцитов II: 207–208
Алкоголь, врожденные дефекты I: 179
Аллантоис I: 33, 200, 201
Аллельное исключение II: 188
Аллергическая реакция III: 74
Аллометрический рост III: 194, 197–201
–– черепа у павиана III: 199, 200
Аллометрия III: 314–315
Аллофенная регуляция I: 96–97
Аллофенные мыши I: 93–96
Альбумин II: 6, 218
Альдолаза II: 93
α-Аманитин III: 119
Амбистома, гаструляция I: 118
– неотения III: 170–171
– почка конечностей III: 98–99
– регенерация конечностей III: 95, 105–107
АМГ *см.* Антимюллеровский гормон
Аминокислоты
– адресование белка II: 224–226
– аминоконцевые и стабильность белка III: 222
– карбоксильные концы иммуноглобулинов II: 183
Аммониотелические животные, выделительная система III: 163
Аммония ионы и синтез белка III: 65
Амнион I: 33, 138, 140, **201**
– близнецы I: 96
Амниотическое яйцо I: 33
Амниоты: I: 33, 200
Ампициллин, устойчивость II: 83
Амплификация генов II: 114–119
–– хориона дрозофилы II: 120
– и онкогенез III: 220
Амфибии, *см. также* Лягушки, Тритон
– амплификация генов рРНК II: 114–118
– гаструляция I: 118–131
– детерминация половых клеток II: 29–30, 31
– индукция балансёров III: 57
–– хрусталика III: 53–54
– клонирование II: 71–77
– материнский эффект II: 209–211
– метаморфоз III: 161–171
– миграция нейронов III: 114
–– половых клеток III: 259–260
– многоногость III: 99
– образование почки конечности III: **81**
– перемещение цитоплазмы I: 67–69
– поле конечности III: 98–99
– ретиноиды III: 106
– созревание ооцитов (оогенез) II: 275–281
– тип дробления I: 81–83
– формирование нервной трубки I: 148, 150, **152**
– хромосомы типа ламповых щеток II: 122–123
– эволюция головного мозга I: 159
Анафаза I: **15**, 23; III: **264**, 265
Ангиобласты I: 205
Ангиогенез I: 203–205
– индуцированный опухолью I: 209–211
Ангиогенин I: 209
Ангиогенные скопления (кровяные островки) I: 205
– факторы I: 205
Анимальная чаша I: 127
Анимальное полушарие I: 75. *См. также* Полярность
–– локализация материнских мРНК II: 211
–– мезодермальная индукция II: 58–60
–– развитие морского ежа I: 77–78, II: 43–47
Аномальные зародыши, спонтанные аборты I: 178
Антибиотики, устойчивость к ним II: 83–84. *См. также* Актиномицин D
Антиген(ы), беременность I: 141–142
– главного комплекса тканевой совместимости I: 141
– детерминация лимфоцитов II: 93–94, 97–99
– дифференцировка В-клеток III: 70–72
– дифференцировочные II: 183–184; III: 22

– клеточной поверхности Мезо I: 114
– нейронные связи III: 120
– поверхностные III: 6
– процессинг РНК иммуноглобулинов II: 186–187
– фоторецептора у дрозофилы III: 24
– H-Y, детерминация пола III: 239–240
Антимюллеровский гормон (АМГ), ген III: 240
–– и формирование мужского фенотипа III: 242–243
––– развитие гонад III: 234, 236
Антитела *см.* Иммуноглобулины
Антрум III: 286
Анэнцефалия I: 151
Аорта I: 202, 203, 204, 206, 207, 208, 209, 218
Апикальная эктодермальная шапочка III: 94
Апикальный эктодермальный гребень (АЭГ) III: 81, 82
––– индукция конечности III: 82–84
––– полярность конечности III: 98–102
Аполипопротеин B (apo-B) II: 219
Артериальный проток у плода *I: 209*
– ствол I: 202, **204**, **207**, 262
Артерии, формирование I: 203–207
Архентерон (гастроцель) I: 116
– у амфибий I: 119–120, 125–127
–– морского ежа I: 116–118
Археоцит I: 31–32
Архипаллиум (старая кора) I: 159
Аутокринная стимуляция III: 213
Аутосомы III: 239–240, 247, 252
Аутофосфорилирование III: 216
Ацетилгалактозамин (N-ацетилгалактозамин), синапсы III: 120–121
Ацетилглюкозамин (N-ацетилглюкозамин), прикрепление гамет I: 49–50
Ацетилхолин I: 174, 175; II: 6
Ацетилхолинэстераза и дифференцировка у оболочников II: 9–11
Ацинусы (ацинарные клетки) III: 63–64
АЭГ *см.* Апикальный эктодермальный гребень

Базальная мембрана I: 112–114, 188, 189, 205; III: 34
–– и гаструляция у морского ежа I: 114
––– дифференцировка клеток III: 42–43
–– сомита I: 188
– пластинка III: 34, 39, 40, 43, 70
Базальный диск III: 91
– (герминативный) слой эпидермиса I: 175, 176
Бактерии, половой процесс I: 20, 21. *См. также* Кишечная палочка
Белки, *см. также* Коллаген, Гемоглобин, Иммуноглобулины
– адресование в лизосомы II: 224–225
––– мембраны II: 224–225
––– митохондрии II: 225–226
––– ядра II: 225
– альтернативный синтез II: 186–189
– группы высокой подвижности (HMG) II: 166–167
– клеточной поверхности и компактизация I: 91–92
– комплексы с нуклеиновыми кислотами II: 228
– концевые аминокислоты и стабильность II: 222
– молока III: 183, 186
– надмолекулярная сборка II: 226–228
– ооциты амфибий III: 276
– регулятор транскрипции (TFIIIA) II: 127–130
– сборка II: 226–228
– секреция II: 224
– слюнных желез насекомых II: 101–103
– спермий-специфические III: 271–272
– субклеточная компартментализация II: 224–226
– синтез после оплодотворения I: 65
–– в энуклеированных ооцитах II: 207–208
–– ингибирование антибиотиками I: 18
–– у прокариотов и эукариотов *I:* 14–16
– «фузогенные» I: 53
– NF II: 153–154
G-белок **64**, 67
Белочная оболочка (tunica albuginea) III: **235**, 236
Беременность, иммунное подавление III: 72–73
– и тератогены I: 178–181
– продолжительность I: 159
– развитие молочной железы III: 185–186
Бесполое размножение у вольвокса I: 27–28
––– гидры III: 91
Бесхвостые амфибии, метаморфоз III: 162. *См. также* Лягушки
Библиотека клонов II: 85, 104
Бивалент (тетрада) III: 265
Билатеральное дробление см. Дробление
Биндин I: 45–46, **47**
– роль в слиянии клеток I: 53
Биогенетический закон III: 309–310
Биполярные нейроны I: 165–166
Бластема регенерационная III: 94
–– регенерация конечности III: 15, 95–94
Бластодерма I: **97**, 99, **100**
– клеточная у насекомых I: 99–100; II: 26–28; III: 134
– синцитиальная I: 99–100, II: 26–29; III: 134
Бластодиск I: 97, 131
Бластомеры I: 12, 74; II: 8–12, 16–19, **20**; III: 8–11
Бластопор I: 116, 119–120
– губа(ы) I: 120–125, **126**
–– спинная I: 123–125
––– как организатор II: 53
– роль в формировании гастроцеля I: 125
Бластоцель I: 77, **120**, **130**
– крыша I: **130**
– компактизация I: 90
– у морского ежа III: 114–118
–– птиц I: **132**, 133–135
– формирование у лягушки I: 81–83
––– морского ежа I: 78–81
Бластоциста I: 91
– дифференцировка I: 93–94
– компактизация I: 91–92
– освобождение от прозрачной оболочки I: 95–96
Бластула I: 12, **76**, 77, **132**; III: 8
– задержанная (dauerblastula) II: **44**, **45**, **46**, **47**
– ограничение потенций ядер I: 71–73
– у иглокожих I: 78–81
– фермент вылупления I: 81
– формирование после энуклеации II: 308
– яРНК II: 180–181
Ближние взаимодействия III: 51. *См. также* Эпителио-мезенхимные взаимодействия
–– инструктивные III: 51–52
–– индукция хрусталика III: 52–55
–– разрешающие III: 51
Близнецы I: 95–97
– фримартины III: 240
Блоттинг, методы II: 88–90, 105, 106
Боковые коленчатые тела III: 123
Бокс *Голдберга – Хогнесса* (ТАТА-бокс) II: 142–144
Большие полушария I: 153
Борозда дробления I: **81**, **82**, 103–106
Боуменова капсула III: 61
Бронхи III: 62–63
Бугорок оплодотворения I: 51
Бурсин I: 215
Бэра законы I: 145–147

Вариабельная область молекулы иммуноглобулина II: 95–99
Васкуляризация и рост опухоли I: 209
Вегетативная пластинка I: 111, **112**
–– инвагинация I: 115–117
Вегетативное полушарие I: 75
Вегетативный полюс I: **77**. *См. также* Полярность
–– детерминация половых клеток II: 29–30
–– индукция мезодермы II: 58
–– материнские мРНК II: 211
Веллюс I: 177
Венозный синус I: 202, **204**
Вентральная борозда III: 132
Веретено I: 15
Взаимодействие клетка–субстрат, гипотеза дифференциальной адгезивной специфичности III: 111–113
––– контактной ориентации III: 110
––– меченых путей III: 110
––– хемотаксиса III: 113–115
Вирус(ы)
– вакуолизирующий (SV40) II: 185–186
– иммунодефицита человека (СПИД) II: 154; III: 72
– как онкогены III: 209–213
– кори III: 75

– кошачьей саркомы *Мак-Доноу* III: 215
– крысиной саркомы *Гарвея* III: 220
– мышиной лейкемии *Абельсона* III: 211, 213
— саркомы *Молони* III: 211
—— *Гарвея* III: 212, 216
—— *Кирстена* III: 212, 216, 220
– обезьяньей саркомы III: 211
– осповакцины II: 186
– остеосаркомы FBJ III: 212
– поперечные связи с поверхностью клетки III: 73–76
– птичьего лейкоза (ВПЛ, ALV), инсерция промотора и канцерогенез III: 221
— миелоцитоматоза III: 212
— эритробластоза III: 211–212, 213
– рака молочной железы мыши II: 164
– саркомы *Payca* III: 210, 211, 216
– Синдай II: 77, 93
Вирусные онкогены III: 209–213
— список III: 211–212
Витализм II: 43
Витального окрашивания методы I: 188
Витамин А I: 179–180; III: 103–106, 163
Вителлогенез у амфибий III: 275–277
Вителлогенин II: 218; III: 276, **277**
Вложения теория II: 6
Внезародышевые оболочки I: 200, **201**. *См. также* Амнион, Аллантоис, Желточный мешок, Хорион
Внеклеточный матрикс III: 34–42
— индукция дифференцировки III: 42–43
— миграция клеток нервного гребня I: 172–174
— формирование кости I: 197
Внутренняя клеточная масса I: 91
Водорода ионы и активация яйцеклетки I: 64–67
Волокна стресса III: 13
Волос(ы) I: 176–177
Волосяная луковица I: 177
Волосяной фолликул I: 177; III: **8**
Вольфов канал III: 234–236, **237**, 242
Вольфовская регенерация II: **70**
Воронка I: 219, III: 187
– яйцевода II: 123
Воспринимающий бугорок III: 51
Временной энхансер II: 146
— транскрипция II: 137–141
— трансфекция II: 87–88
Врожденные аномалии I: 178–182. *См. также* Тератогены
— анэнцефалия I: 151
— двойное сердце (cardia bifida) I: 202
— недостаточность гликопротеина LFA-1 III: 73
— spina bifida I: 159
Вторичная индукция II: 61–62; III: 61–63
Вторичная мезенхима, гаструляция у морского ежа I: **112**, 117–118
Вторичные половые признаки III: 187
Вторичноротые I: **31**, 32–33
«Второй посредник» III: **170**
Выворачивание III: 176-**178**

ГАГ см. Гликозаминогликаны
Галактоза и связывание гамет I: 150
β-Галактозидаза и lac-оперон II: 41
– концевые аминокислоты и стабильность II: 222
Галлицы II: 25–26, **35**
Гальванотаксис III: 12
Гаметогенез I: 12, **13**; III: 259
– у вольвокса I: 25
Гаметы I: 12, 35. *См. также* Яйцо; Ооциты; Спермий
Ганглий(и) I: 169
– дорсальных корешков I: 169, **170**
– миграция нейронов III: 113–114
– у пиявки III: 131
– элиминация синапсов III: 124–125
Ганглиозные клетки сетчатки I: 164–166
—— синаптическая специфичность III: 117–121
Гаптотаксис III: 10–12
Гастроцель *см.* Архентерон
Гаструляция I: 12, 110–111
– дифференциальная экспрессия генов II: 30–36
– изменение потенции клеток II: 50
– роль гликозилтрансферазы III: 32–34
– у амфибий I: 13, 118–131
— дрозофилы III: 131
— морского ежа I: 111–118
Гель-электрофорез *см.* Электрофорез
Гем II: 202, **203**
Гемиметаболические насекомые (с неполным превращением) III: 175
Гемин II: 202, **203**. *См. также* Глобиновые гены
Гемоглобин II: 6
– серповидно-клеточная анемия II: 228
– строение II: 202
– трансляционный контроль синтеза II: 202–204
– фетальный (плода) и взрослый I: 207, 208–209
– эмбриональный II: 126
Гемопоэз (кроветворение), локализация I: 212–217
Гемопоэтин I: 215
Гемопоэтические факторы роста III: 213–215
Гемопоэтическое индуцирующее микроокружение (ГИМ) I: 215
Ген(ы)
– алкогольдегидрогеназы II: 90
– аутосомные III: 239–240
– гаплоидный ген, экспрессия III: 272
– глобиновые, контроль над уровнем трансляции II: 202–206
— метилирование II: 155–156
— последовательность нуклеотидов II: **138**
— промотор II: 143
— сайты сплайсинга II: 190–191
— транскрипция II: 125–127
— чувствительность к ДНКазе II: 166–167
– гомеозисные III: 147–151
— строение III: 153, 154, 155
— эволюция III: 157
– иммуноглобулинов, легких цепей II: 95–99
—— транскрипция II: 151–154
— тяжелых цепей II: 99
—— транскрипция II: 154
– индукция II: 57–59
– клонирование II: 81–85
– контроль путем метилирования ДНК II: 155–159
– лимфоцитов II: 93, 95–99
– с материнским эффектом III: 133–139
– с отповским эффектом II: 272
– продукция хлорамфениколацетилтрансферазы (ХАТ) III: 152–153
– промотор III: 153
– сегментации III: 134–139, 142–144
— дрозофилы III: 142–146
— последовательная экспрессия III: 144–147
– регуляторное взаимодействие III: 147, 151–153
– регуляция и эволюция III: 59–60
– специфические, *abd* III: 148, 150
— Antennapedia, комплекс III: 147–148, 303
— Antennapedia (Antp) III: 147, 152, 154–156
— *Deformed* (*dfd*) III: 148
— *sex comb reduced* (*scr*) III: 148, 152
— мутации III: 148, 157–158
— эволюция насекомых III: 157, 303
— *bucaudal* (*bic*) II: 33–34; III: 151
— *Bicaudal D* (*Bic*) III: 135, 138
— *bicoid* (*bcd*) II: 33, III: 134–138, 151, 155, 284
— bithorax, комплекс III: 148–151, 157, 303
— *anterobithorax* (*abx*) III: 150
— *bithorax* (*bx*) III: 148, 150
— *Polycomb* (*Pc*) III: **149**, 150
— *posterobithorax* (*pbx*) III: 150
— *Ultrabithorax* (*Ubx*) III: 148, **149**, 151–152, **154**
— мутации III: 148–151
— эволюция насекомых III: 151, 303
— *bithoraxoid* (*bxd*) III: 150, 151
— *caudal* (*cad*) II: 33–35; III: 147, 151, 155
— *c-fos* II: 206; III: 212, **215**, 218
— *c-mos* III: 290
— *c-myc* III: 212, **215**, 218, 220–221
— пролиферация клеток крови III: **209**
— *doublesex* (*dsx*) II: **189**, 190; III: 248, 250
— *daughterless* (*da*) III: 249
— *engrailed* III: 146, 155
— *even-skipped* III: 155
— *exuperantia* III: 134, **135**, 137, 284
— *fem* III: 252, 267
— *fog* III: 267–269
— *fs* (*1*) *N* III: 134, **135**
— *fs* (*1*) *ph* III: 134, **135**
— *fushi tarazu* (*ftz*) III: 143–144, **147**, 151–155
—— гомеобокс III: 155

—— элемент «Зебра» III: 153, **155**
— gap, группа III: 132–133, 143, **144**, 151
—— регуляторные элементы III: 153, **154**
— *glp* III: 267
— *grandchildless* II: 29
— *hairy* III: **155**
— *her* III: 252, **268**
— *Hox* III: 105, 156, 303
— *hunchback* (*hb*) III: 136–137, 139, **143**, 144, **145**, 151
— *jun* III: 212
— *intersex* (*ix*) III: 248
— *knirps* III: **145**, 143
— *Krüppel* (*Kr*) III: 134, 138, 143, 144
— *lin* II: 130–133; III: 79–80
— *mog* III: 268, 269
— *multiple wing hair* III: **140**
— *nanos* (*nos*) III: 134, **135**, 137–138, **139**
— *oskar* II: 33; III: 134, **135**
— *ovarian-determining* (*Od*) III: 241
— pair-rule, группа III: 132–133, 144–146
— *pumilio* (*pum*) III: **135**, 138
— *runt* III: 143, 155
— *Sdc* III: 252
— segment-polarity, группа III: 132–133, 143
— *Sex-lethal* (*Sxl*) III: 247–250, 252
— *sevenless* II: 132
— *sisterless* (*sis*) III: 249
— *src* III: 210
— *SRY* III: 239
— *staufen* (*stau*) III: **134**, 135
— *swallow* III: 134, **135**, 137, 284
— *tailless* III: **134**, 139
— *Tas* III: 240, 241
— *Tdf* III: 237, 241
— *Testis determining-Y* (*Tdy*) III: 241
— *torsoless* III: 139
— *torsolike* (*tsl*) III: **134**, 135
— *transformer* (*tra*) II: 190, III: 250, 252, 267–269
— *trunk* (*trk*) III: **134**
— *tudor* (*tud*) III: **134**, **135**
— *valios* (*val*) III: **134**, **135**
— *vasa* (*vas*) III: **134**, **135**
— *white* II: 100
— *zerknult* (*zen*) II: 33
— *XO-lethal* (*XOl*) III: 252
– тимидинкиназы II: 87–88
– хориона, амплификация II: 120
– Y-хромосомы III: 236–239
строение I: 14
трансфекция II: 87–88
Генетика и развитие II: 109–110
– развития II: 65, III: 321
Гензеновский узелок I: 131, **132**, **150**
— индукция нервной трубки II: 53
— у млекопитающих I: **150**
—— птиц I: **150**
— изменения II: 99–100
Геном, сложность II: 83
– сроки активации II: 216–217
Гепарансульфат III: 36, 37
Гепатоцит II: 6
Гермафродитизм III: 251–253
– синхронные гермафродиты III: 252
– у *C. elegans* II: 20; III: 251
Герминативный серп III: 261
– слой эпидермиса см. Базальный слой эпидермиса
Гетерогамия I: 25
– у вольвокса I: 25–28
Гетерогенная ядерная РНК (гяРНК) II: 177–178. *См. также* яРНК
Гетерохроматин II: 110
– конститутивный и факультативный II: 110
– отцовский II: 110
Гетерохрония III: 170–175, 314
Гиалин I: 55, 114
Гиалиновый слой I: 55, 112–113, 114
Гиалуронидаза I: 48
Гиалуроновая кислота в матриксе яйца I: 40, 42, 48, 61
— и гаструляция у птиц I: 135–136
—— индукция хрусталика III: 56
—— миграция клеток нервного гребня I: 173–174
— как компонент протеогликанов III: **35**, **36**
Гибель клеток III: 124–125
— в молочных железах самцов III: 184–185
—— процессе метаморфоза у амфибий III: 165–167
—— морфогенеза III: 5
—— формирования кости I: 195–197, 198
Гибридизация in situ II: 92, 122
Гибридома III: 22
20-Гидроксиэкдизон *см.* Экдистерон
Гидролиз ГТФ в ГДФ III: 217
– и формирование микротрубочек II: 227
Гидроцель III: 59
– прямое развитие III: 172
Гинандроморфы III: 247
Гиперплазия III: 202
Гипертрофия III: 202, **203**
Гиперстриатум I: 159
Гиперчувствительность к ДНКазе II: 163–164, **165**
Гипобласт I: 98, 131, **134**
– и формирование первичной полоски I: 135
– у млекопитающих I: 137–139
— птиц I: 135, **136**
Гиподерма у *C. elegans* II: **21**, 22
Гипоксантинфосфорибозилтрансфераза (ГФРТ) II: 112, 156; III: 21, **22**
Гипостом у гидры III: 91–92
Гипоталамус (эпифиз) III: **154**
– и метаморфоз амфибий III: 163–164, **165**, 171, **172**
— половое созревание III: 187–189
— эстроген III: 245
Гипофиз I: 219, **220**
– и менструальный цикл III: 284–287
— метаморфоз у амфибий III: 164–165, 172
— половое созревание III: 187–180
— посттрансляционная модификация гормонов II: 220
– происхождение I: 219
Гиппокамп (старая кора) *см.* Архипаллиум
Гистамины, поперечные связи III: 74–75
Гистиобласты III: 176
Гистоны I: 14; II: 159–162
– ацетилирование II: 221
– в ооците III: 275
– и посттрансляционная модификация II: 220–221
Гистотипическая агрегация III: 9
Глаз, вторичная индукция II: 61–63
– имплантация опухоли I: 209, **210**
– развитие I: 163–169
– регенерация хрусталика II: **70**
– сенсорная депривация в зрительной системе млекопитающих III: 122–124
– смещение при метаморфозе III: 167, 168
Глазная чаша I: 164; II: 62
Глазной пузырь I: 153, **154**, 163–165; II: 62
— индукция хрусталика III: 52–56
– стебелек I: 153, 154, 164
Гликозаминогликаны (ГАГ) во внеклеточном матриксе III: 35
– и миграция клеток I: 188–190
—— нейронов III: 113
– переваривание клетками мезенхимы III: 70
Гликозилтрансфераза клеточной поверхности III: 32–34
– связывание гамет I: 49–50
Гликопротеины I: 40, 49, 50; III: 37–44, 72–74
Глотка I: 219, **221**
Глоточные карманы I: 219
Глохидий I: 86
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФД) и инактивация Х-хромосомы II: 112–113
β-Глюкуронидаза, внутриклеточная локализация II: 225
Голобластическое дробление I: 75, **76**
Головная (цефалическая) складка III: 132
Головной отросток I: 133
– мозг, дифференцировка I: 155–157
— эволюция I: 159–163
Голометаболические насекомые (с полным превращением) III: 175
Гомеобокс III: 155–156
Гомеодомен III: 155–156
Гомеозисные мутации III: **69**
Гомункулус I: 36
Гонадотропины III: 187, **188**, 277, 289–290
– менструальный цикл III: 284–285. *См. также* Фолликулостимулирующий гормон; Лютеинизирующий гормон
Гонады I: 12
– дифференцировка у человека III: 234–236
– индифферентная стадия III: 236
– нематоды *Caenorhabditis elegans* II: 20, 22, 23
– протоки III: 235, 236, 237
– развитие в пубертатный период III: 187–189
Гонидии I: 27

Гонохористическая детерминация пола III: 252
Гормон роста (соматотропин, ГР) II: 144; III: 204–205
— пролиферация хрящевых клеток I: 196
— стабилизация специфических мРНК II: 218
Гормон(ы) III: 161, 170
– вторичная детерминация пола III: 241–244
– дифференцировка клеток нервного гребня I: 175
– мероистический оогенез у насекомых III: 283
– метаморфоз у амфибий III: 163–172
— насекомых III: 179–181
– оогенез у амфибий III: 277–278
– первичная детерминация пола III: 234, 236
– поведенческие реакции, обусловленные полом III: 241–244
– половое созревание III: 187–189
– посттрансляционная модификация II: 219–220
– развитие молочных желез III: 183–186
– регуляция менструального цикла человека III: 285–288
– рост III: 204–207
– стабилизация специфических мРНК II: 217–218
– транскрипционная регуляция II: 146–147, 150–151
– формирование костей I: 198
– хориона I: 140–141
Граафов пузырек III: **285**
Гранулоциты, развитие I: 212–213
Гранулярный (зернистый) слой эпидермиса I: 175–176
Гребневики, радиальная симметрия I: 32
ГТФ I: **66**, 67; II: 203, 227; III: 216–217
Гуанофоры I: 170
Губки I: 31–32
ГФРТ *см.* Гипоксантинфосфорибозилтрансфераза
гяРНК *см.* Гетерогенная ядерная РНК

DALA-синтетаза II: 202
Двустворчатые моллюски, тип дробления и эволюция I: 85–86
Дедифференцировка II: 70
– после ампутации конечности у амфибий III: 94
Дезоксинуклеотиды II: 85, **86**
Дезоксирибонуклеаза *см.* ДНКаза
Деламинация I: 110
Деление ядер *см.* Кариокинез
Дендритный аппарат I: 157
Дендриты I: 160
Дерма *см.* Кориум
– I: 176–177
– агрегаты клеток III: 7–8
Дермамиотом I: 173, **174**, 190
Дерматансульфат III: 36
Дерматом I: 190
Десмосомы I: **152**; III: 44
Детерминанты полярности II: 30–36
Детерминация II: 5
– и спецификация III: 90
– пола вторичная III: 241–244
— и альтернативный процессинг РНК II: 189–190
— аутосомные гены III: 239–240
— условия окружающей среды III: 254–256
— первичная III: 240–241
— у дрозофилы III: 246–250
— млекопитающих III: 240–241
– половых клеток II: 24–30, 31
— у *C. elegans* II: 20–23
– хрусталика III: 55
Диакинез III: **264**, 265
Диапауза III: 179
Диапедез III: 261–262
Диацилглицерол II: **64**, 66–67
Дивертикул щитовидной железы I: 219
Дигидротестостерон III: 212
Дидезоксинуклеотиды II: 85, **86**
Диктиатная стадия III: 285
Диминуция хроматина *см.* Хроматин
Динеин, I: 38
Динозавры, определение пола и вымирание III: 254
Диплотена III: **264**, 265
Дискоидальное дробление I: 97
Дискоидин I: 30
Дистальная трансформация *см.* Правило полного круга дистальной трансформации
Дифференциальная специфичность III: 111–115, 119–121
– экспрессия генов II: 65, 92
— временная и тканеспецифическая II: 105–106
— образование пуфов хромосом II: 100–101
— парадигма II: 107
Дифференциальное сродство клеток III: 6–10
Дифференциальной адгезии гипотеза II: 14
– адгезивной специфичности гипотеза (гаптотаксиса) III: 111–113
Дифференцировка I: 12, II: 5, III: 5
– значение внеклеточного матрикса III: 42–43
– и гормоны III: 161
— эволюция I: 17–31
– нейробластов у кузнечика III: 110–111
– одноклеточных протист I: 18–19
– у слизевиков I: 29–31
Диффузия и план строения тела III: 193
– морфогена ЗПА III: 103
– морфогенов III: 93
– растворимых сигналов III: 64
Диэтилстильбэстрол (ДЭС) II: 125
ДКЗ *см.* Дорсальная краевая зона
ДНК, амплификация генов II: 115–118
– генов антител II: 95–99
– гибридизация II: 81, **82**
– денатурация II: **28**
– дидезокси-метод секвенирования II: 85–87
– затравка (праймер) III: 85, **86**
– как *цис*-регулятор II: 402
– метилирование II: 155–158, 164
– образование пуфов II: 102
– «плутеус-плюс» и «плутеус-минус» II: 181
– повреждение и старение III: 272
– повторяющаяся II: **179**, 180
– прокариот и эукариот I: 12–16
– связь с ядерным матриксом II: 167–169
– синтез в процессе оогенеза III: **281**
– специфическая для Y-хромосомы III: 237–239
– типы Z и B II: 169–171
– трансфекция II: **87**
– хроматина II: 159–162
B-ДНК II: 169–171
ДНКаза II: 91
– активация хроматина II: 162–164
– гиперчувствительность II: 164
– и метаморфоз у амфибий III: 165
ДНК-блоттинг II: 88–89
ДНК-лигаза II: 81
ДНК-полимераза *см.* ДНКаза
ДНК-связывающие «пальцы» II: **129**
Дорсальная губа бластопора *см.* Губа бластопора
– краевая зона (ДКЗ) II: 186–199
– (параксиальная) мезодерма *см.* Мезодерма
Дорсальный мезентерий, миграция первичных половых клеток III: 260–261
Дот-блоттинг II: 105, **106**
Древняя кора (палеопаллиум) I: 159
Дробление I: 12, 74
– в отсутствие ядра II: 207
– голобластическое I: 75, **76**
— билатеральное I: 87–88
— неравное I: 81–82
— радиальное I: 33, 76–83
— спиральное I: 33, 83–87
— чередующееся I: 88–91
– и материнские мРНК II: 215–216
— эволюция I: 85–87
– инициация I: 101–102
– меробластическое I: 75
— дискоидальное I: 75, 97, **98**
— поверхностное I: 75, 97, 99–101
– перемещение цитоплазмы I: 69, 120–122
– роль циклинов II: 216
– скорость I: 74
– спецификация у оболочников II: 8
– у амфибий III: 81–82
— моллюсков II: 16–20
Дрожжи, типы спаривания II: 99
Дрозофила (*Drosophila*), активация генома II: 216–217
– амплификация генов хориона (оболочки яйца) II: 115, 120
– гаструляция III: 132
– ген алкогольдегидрогеназы II: 90
– гены желточных белков II: 92
— с материнским эффектом II: 32–33; III: 142, 151
– детерминация пола II: 189–190; III: 246–250
— половых клеток II: 25–29

– дорсовентральная полярность и мутации II: 31–36
– дробление I: 97–101
– имагинальные диски II: 67, III: 176–178
– крыловые диски III: 141–142
– мероистический оогенез III:
– мутации как маркеры II: 27–29
– политенные хромосомы II: 121–123
– пути образования хромосомных пуфов II: 101–105
– развитие (обзор) III: 130–132
– регуляторное взаимодействие генов III: 151–153
– рекрутирование мРНК II: 213
– скорость митозов при дроблении I: 74–75
– трансдетерминация II: 67–70
– транспозоны и мутации II: 100
– фоторецепторные клетки III: 22–23
– хромосомы типа ламповых щеток III: 281–284
– цитоплазматические детерминанты II: 30–36
– эволюция и гомеозисные гены III: 157
– энхансеры желточных белков II: 147–150
Дуги аорты I: 203–207
Дупликация пальцев III: 95
ДЭС *см.* Диэтилстильбэстрол

Евстахиева труба I: 219
Единица миграционной активности I: 111

Жаберные дуги III: 311–312
— дефекты развития I: 180
– щели I: 219
Жгутик(и) спермиев I: 38–39; III: 271
– у амебофлагеллаты *Naegleria* I: 18–19
Железы сальные I: 177
Желтое тело III: 287
Желток I: 33
– и гаструляция у птиц I: 131
– роль в процессе дробления I: 75–76, 97
Желточная оболочка I: 40, **41**
— биндиновые рецепторы I: 46
— у птиц I: 136, 137
– пробка I: 119
Желточные белки I: 39–40
— гены II: 92
— синтез у дрозофилы III: 283
— энхансеры II: 147–150
– вены I: 202, **204**, 205
– пластинки I: 69, II: **30**
— и полярность ооцита III: 276–277
Желточный мешок I: 33, 200, **201**
— и система кровообращения у зародыша I: 205, 206
— миграция половых клеток у млекопитающих III: 260
— образование стволовых клеток крови I: 215–219
– проток I: 200
Желтый серп I: 67–**68**; II: 6, 8, 12, 15
Желудок III: 119, **120**
Желудочки сердца I: **204**, 209
Желчный пузырь I: 219–220
Жидкостно-мозаичная модель мембраны III: 15–16
«Жизненная энергия» (Vis essentialis) II: 7
Жизненный цикл слизевиков I: 28–31
— лягушки I: **13**
Жировые клетки (адипоциты), гипертрофия III: 202
– тела, синтез желточных белков II: 147–149

Задержанная бластула *см.* Бластула
Задний мозг (Metencephalon) I: 153, **154**
Замораживания–скалывания метод III: 16
Зародышевая плазма I: 30
– полоска I: **90**
Зародышевой плазмы теория II: 39–40
Зародышевые листки I: 12. *См. также* Эктодерма; Энтодерма; Эпителио-мезенхимные взаимодействия; Мезодерма
— и формирование сердца I: 201–202
— производные I: 187
— у амфибий I: 120
— — дрозофилы III: 132
— — оболочников I: 88; II: 8–11
— — позвоночных I: 147
— — птиц I: 131, 133
Зародышевый пузырек III: 274
— дезинтеграция III: 277, 278
Звезды митотического веретена и борозды дробления I: 104–106
Зернистый слой мозжечка I: 157
Зигота I: 11, 53, 59
Зиготена III: 263, **264**
Зона поляризующей активности (ЗПА) III: 102–105
— — реакционно-диффузионная модель III: 157
– прогресса (ЗП) III: **95**, 100, **101**
Зрительная кора III: 123
— сенсорная депривация III: 123–124
Зрительный нерв I: 164
– тектум III: 117

Игазин II: 225
Иглокожие, метаморфоз и окружающая среда III: 181–182
– тип дробления I: 77–81
– эволюция плана строения тела III: 59
Избирательное сродство III: 7–10
Изогамия I: 25
Изолецитальное яйцо I: 75, 76
Изометрический рост, логарифмическая спираль III: 194–197
Изоцитратдегидрогеназа I: 192
Изоферменты II: 222–224
Изоформы I: 199–200
– гемоглобина I: 208–209
ИКЗ см. Инволюирующая краевая зона
Имагинальные диски II: 67–70; III: 176–177
— гиперплазия III: 202
— детерминация клеток III: 157–158
— крыла III: 141–142
— трансдетерминация II: 69
— формирование III: 140–142
Имитация переносчиков сигнала и онкогены III: 216–217
Иммунная система, старение III: 224–225
Иммуноглобулин(ы) II: 6. *См. также* Ген(ы)
– дифференциальный процессинг РНК II: 186–188
– и онкогенез III: 221–222
– мембранные и секретируемые формы II: 186–187
– переключение классов II: 99
– поперечные связи III: 73–74
– сплайсинговые сайты II: **188**
– строение II: 95
– транскрипция гена легкой цепи II: 151–154
– энхансеры II: 144–145, **146**
Имплантация зародыша I: 91
– задержка III: 319
Импринтинг II: 158
Инвагинация I: 110
– у морского ежа I: 115–118
Инверсия у вольвокса I: 27
Инволюирующая краевая зона (ИКЗ) I: 126–127
Инволюция I: 110
Ингибиторы роста III: 208–209
Ингрессия (иммиграция, выселение) мезенхимы I: 110
— у морского ежа I: 111–114
Индуктор полового процесса I: 28
Индукция II: 53, 61–62. *См. также* Эмбриональная индукция, Ближние взаимодействия, Вторичная индукция
– апикального эктодермального гребня (АЭГ) III: 82–84
– балансёров III: 57
– ветвления III: 68–70
– и поперечные связи III: 73–75
– конечности III: 81–84
– лифоцитов и плазматических клеток III: 70–73
– первичная эмбриональная I: 147, III: 53
— — механизмы II: 56–63
— — региональная специфичность II: 53–56
– реципрокная III: 60
Инициирующий комплекс II: 467
Инсулин II: 6
– активация синтеза глюкозой II: 218
– аминокислотная последовательность II: **220**
– предшественник II: 219
Инсулиноподобные ростовые факторы (ИРФ) см. Соматомедины
Интегрины III: 40–42
Интегрирующие регуляторные единицы транскрипции (ИРЕТ) II: 184
Интеркаляция и регенерация конечности III: 96–97
Интеркинез III: **264**
Интерлейкин III: **71**, 72
– как гемопоэтический ростовой фактор I: 215
Интерфаза

– мейоза I: **23**
– митоза I: **8**
γ-Интерферон (γ-ИНФ) III: 208–209
Интрамембранное окостенение I: 194
Интроны II: 137, **139**, 140, 141, 190–193
Информосомы II: 218, 221
Ионофор A23187 I: 56, 63
Ионы I: 64–67; III: 12. *См. также* Кальция ионы; Натрия ионы.
ИРЕТ *см.* Интегрирующие регуляторные единицы транскрипции
Иридофоры I: 170
ИРФ *см.* Инсулиноподобные ростовые факторы

Кавитация I: 91
Кадгерины III: 27–28
Казеин II: 217–218; III: 183, 186
Каллус II: 78
Кальций и акросомная реакция I: 43–44
– роль в формировании кости I: 194–198
Кальцитонин II: 188
Кальцификация (обызвествление) I: 194–198
Кальция ионы
–– активация яйцеклетки I: 63–67
–– высвобождение гистамина («аллергические реакции») III: 74–75
–– инициация дробления I: 102
–– кортикальная реакция I: 55–58
–– миогенез I: 191
–– молекулы клеточной адгезии III: 27
– фосфат и перенос генов II: 87–88
Капацитация I: 46
Капиллярные сплетения, образование I: 205
Карбамоилфосфатсинтаза III: **164**, 170
Кариокинез (деление ядра) I: 99, 103–104
Карликовость I: 178
Карман *Ратке* I: 218, 219, 220
Карта, *см. также* Зародышевые листки
– активности позиционного сигнализирования III: 103
– делеций II: 128, III: 239
– клеточных линий *C. elegans* II: **21**
–– оболочников II: 11
– нормальных ретино-тектальных проекций III: 117
– презумптивных зачатков I: 118
––– у амфибий I: **119**, **128**
––– птиц I: 131–133
Карцинома мочевого пузыря III: 219
Катепсин III: 165, **166**
кДНК *см.* Комплементарная ДНК
Кератин I: 175–176; II: 6
Кератинсульфат III: 36
Кератиноциты I: 176; II: 6
КЕТ *см.* Конструктивная единица транскрипции
Кислород и активация яйца I: 64
–– формирование кости I: 195
Кишечная палочка (*Escherichia coli*) и рекомбинантные ДНК II: 83
–– *lac*-оперон II: 141
–– сайт-специфичный мутагенез II: 90
–– трансляция разрыва (ник-трансляция) II: 91
Клетка(и) бокаловидные у вольвокса I: 28
– бурстообразующие эритроидного ряда (БОЕ-э) I: 213
– вегетативные, индукция мезодермы II: 56
– вульвы у *C. elegans* II: 133
–– предшественники II: 22; III: 79
– гипертрофия и гиперплазия III: 202
– глубокие краевой зоны I: 126–127
– гранулезы III: 286–287, 290
– деление, *см. также* Дробление; Мейоз; Митоз
–– скорость (гиперплазия) III: 202, **203**
–– у личинки *Drosophila* III: 177
–– уровни контроля III: 204
– детерминированные II: 52
– дистальная верхушечная III: 121
– дифференциальное сродство III: 6–8
– дифференцированные типы II: 6
– колбовидные I: 118
–– у птиц I: 135
–– формирование архентерона I: 125
– крови
–– дифференцировка III: **209**
–– формирование и развитие III: 212–219
– *Лейдига* II: 6; III: 212
– морфогенез III: 5
– NIH3T3 III: 217, 219
– нервного гребня
––– врожденные дефекты I: 180
––– дифференцировка I: **161**, 169
– контактное ингибирование движения III: 13
– миграция I: 169–174
– поверхностные краевой зоны I: 126–127
– поджелудочной железы II: 218
– полипотентность I: 174–175
– *Сертоли* III: 42–43, **234**, 236
–– выделение антимюллеровского гормона III: 240, 242–243
–– и сперматогенез III: 269
– соматические I: 12, II: 112–113
–– у вольвоксовых I: 24–25
– старение III: 226–227
– теки III: **234**, 285
– трохобласта II: 16
В-клетки (В-лимфоциты) II: 93–95. *См. также* Иммуноглобулины, Лимфоциты
– дифференцировка III: 70–75
– и лимфоцитарные опухоли III: 221
–– моноклональные антитела III: 21–22
–– старение III: 225
– обнаружение дифференцировочного антигена III: 22–25
– передача компетенции путем переноса рецепторов III: 319
– процессинг РНК II: 186–187
– созревание III: 152–154
Клеточная мембрана, изменения в процессе развития II: 21–23
–– локализация белков II: 224–225
–– строение III: 15–21
Клеточные контакты III: 20–21, 43–45. *См. также* Щелевые контакты; Плотные контакты
– онкогены *см.* Протоонкогены
Клеточный цикл и влияние факторов роста III: 206–207
––– дробление I: 101–102
––– старение III: 226–227
Клоакальная мембрана I: 219
Клональной селекции теория II: 95
Клонирование II: 76–79
– векторы II: 81
– генов II: 81–91, 142–146
– растений II: 78
– с вычитанием II: 104–105
– у амфибий II: 71–77
–– млекопитающих II: 78
– ядер II: 73
Коготь, индукция III: 57
Кодон АТГ II: 137
– терминации трансляции II: **138**, 139
КОЕ *см.* Колониеобразующая единица
Кожа, гистотипическая агрегация III: 9
– региональная специфичность индукции III: 57
Кожное сало I: 177
Коллаген II: 6, 220; III: 35
– во внеклеточном матриксе III: 35
– гидроксилирование, синтез II: 229
– и индукция пера III: 66–67
––– почки III: 61–62
––– хрусталика III: 56
–– инициация ветвления III: 68–70
–– контактное ориентирование III: 13
–– ламинин III: 39
–– миграция нейронов III: **112**
– посттрансляционная регуляция синтеза II: 228–229
– типы II: 6; III: 35
– формирование щели III: 68–70
Колониеобразующая единица (КОЕ) I: 212–215
Колониестимулирующий фактор (КСФ) I: 214–215
–– ген для него II: 88–90
–– и регуляция по типу обратной связи III: 209
––– онкогены III: 215
Кольцевые каналы III: 281
Кольцо *Бальбиани* II: 101, **102**
Компактизация I: 89–91
– хроматина II: **160**, **161**
Компартментализация у дрозофилы III: 139–142
Компенсация дозы гена II: 111
Компетенция II: 62
– и вторичная индукция II: 61–63; III: 52
Комплементарная ДНК (кДНК) II: 81
–– гибридизация in situ II: 92
–– к вирусным онкогенам III: 210
–– метод получения II: **82**
Конвергентное растяжение I: 127
Конверсионная гипотеза III: 246
Конечности, дупликация (увеличение

числа) пальцев III: 95
– морфогенез путем специфической гибели клеток III: 125
– правила формирования III: 305
Конечный мозг (telencephalon) I: 153–**154**
Контактная плацента I: 140
Контактное ингибирование движения III: 13
– ориентирование III: 12–13
— и рост аксонов III: 110
Константная область иммуноглобулина II: 95–99
— — и процессинг РНК II: 186–188
Конститутивная единица транскрипции (КЕТ) II: 184
Конститутивный гетерохроматин *см.* Гетерохроматин
Контроль на посттрансляционном уровне I: 19; II: 219–230
Концепция порога III: 165–166
Конъюгация I: 20–22
Координированная регуляция экспрессии генов II: 150–151
Кориум (собственно кожа, дерма) I: 173, 176
– скорость митозов в нем III: 202–203
Коррелированное развитие III: 310
Кортикальная реакция I: 55–57
Кортикальные половые тяжи III: 236
Кортикальный слой яйца I: **39**, 40, **41**, 103–104
— — и поворот (перемещение) цитоплазмы I: 67–69, 120–122
Костный матрикс I: 193–194; II: 6
Кость, развитие I: 194–199
Краевая зона I: 118
— инволюирующая I: 126–129
— и формирование архентерона I: 118, 125–127
Краевой слой I: 157
Красные кровяные клетки *см.* Эритроциты
Креатинфосфат II: 203
Креатинфосфокиназа I: 192–123; II: 203
Кривые C_0 *t* II: 179–183
Кристаллины I: 167, **168**; II: 6
Кровеносные сосуды и миграция половых клеток III: 261–262
— индуцированные опухолью I: 209–211
— формирование I: 202–207
Кроветворные стволовые клетки I: 212–213
Кровяные островки I: 205–216
Кроссинговер III: 265
Крыловые диски III: 141–142
Ксантофоры I: 170
Куколка насекомых III: 176
— кутикула III: 175
— синтез «белка клея» II: 122
Кумулюс III: 286, 289
Курица, активация вителлогенинового гена II: 164
– внезародышевые оболочки I: 200
– индукция конечности III: 80–84
— пера I: 66
— производных покровов тела III: 57
– кальцификация I: 197–198
– кровеносная система зародыша, ангиогенный фактор I: 205
– мезодерма и развитие сердца I: 202
– миграция клеток нервного гребня I: **179**, **172**, **174**
— половых клеток III: 261–262
– миобласты I: **191**, **192**
– морфогенез ноги III: 125
– мутация *Ametopodia* III: 59
– мышечная дистрофия I: 199
– нейруляция I: **149**, **155**, **158**
– пересадка гензеновского узелка II: **53**
– поведение III: 122
– развитие мезодермы I: 198, 199
— конечности III: 99–102
– ретинотектальные синапсы III: 119–121
– синтез овальбумина II: 123–125
– химеры курица–перепел I: 217
– хрусталиковая плакода I: **166**, 167
Кэп-группа, регуляция трансляции II: 213–214
Кэп-последовательность II: 137, **140**
Кэп-связывающий белок II: 199, **200**

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ), активация в спермии II: 219
– и сперматогенез III: 272
– изоферменты II: 222–224
Ламеллоподии I: 38; III: 13
– и миграция клеток III: 40
Ламинин III: 33, 39
– и миграция клеток нервного гребня I: 173; III: 33
— развитие почки III: 61
– строение и области связывания III: 39
Лануго I: 177
«Лариаты» II: 118
– и амплификация генов II: 116–118
— сплайсинг интронов II: 191–194
Ларинготрахеальная борозда I: 221
Латеральное ингибирование III: 79
ЛГ *см.* Лютеинизирующий гормон
ЛДГ *см.* Лактатдегидрогеназа
Легочная артерия I: **204**, 207
Лептотена III: 263, **264**
Лидерная последовательность II: 137
Лизины I: 48–49
Лизосомы, адресование белков в них II: 224–225
Лимб I: 209
Лимфоидные органы III: 122
Лимфокины III: 73
Лимфома Бёркитта III: 221–222
Лимфоциты
– гены II: 95–99
– детерминация и структура II: 93–95
– индукция III: 70–76
– кроветворная стволовая клетка I: 212–215
– миграция III: 122
– созревание II: 153
– хемотаксис предшественников III: **10**
Линейного роста закон *Брукса* III: 194
Липовителлин III: 276, 277
γ-Липотропин, постранслящионная модификация II: 219, **221**
Липопротеины низкой плотности (ЛНП) II: 154
Личинка, *см. также* Метаморфоз; Плутеус
– гетерохрония III: 170–172
– субстрат и развитие III: 182
Лордоз III: 245
Лучистый венец (corona radiata) I: 40
Лютеальная фаза менструального цикла III: **286**, 287–288
Лютеинизирующий гормон (ЛГ)
— и менструальный цикл III: 284–288
— — половое созревание III: 187–189
— регуляция фолликулярных клеток III: 288–289
Лютеотропин III: 288
Лягушки, *см. также* Амфибии; Шпорцевая лягушка
– дробление I: 81
– гаструляция I: 118–119
– зародышевая плазма II: 30
– клонирование ядер III: 72
– метаморфоз I: **13**; III: **162**
– миграция половых клеток III: 259–260
–мозаичное развитие II: 40–41
– морфогенетические детерминанты II: 14–15
– нейруляция I: **148**
– прямое развитие III: 172, **173**
– развитие мезодермы I: 199
– регенерация конечности III: 105
– скорость делений при дроблении I: 74–75
– формирование бластоцеля I: **89**, 82–83

Магнум II: 123–124
Макромеры II: 43–49
– у моллюсков I: 83–84
— морских ежей I: **77**, 78
Макронуклеус I: 20
Макрофаг III: 71
Максимальная продолжительность жизни III: 224
Мальпигиев (ростковый) слой эпидермиса I: 175–176
Малые ядерные рибонуклеопротеидные частицы (мяРНП) II: 191–194
Маркеры клеточной поверхности III: 121–122
Маскированные мРНК II: 211–214
Материнская регуляция II: 206–216. *См. также* Цитоплазматическая локализация; Цитоплазма ооцита
«Маточное молочко» III: 182
Мезенхима, *см. также* Эпителио-мезенхимные взаимодействия
– выселение у морского ежа I: 111–115
– головы I: 186–**187**
– и гаструляция у птиц I: 133
— гиалуроновая кислота III: 135–136
— инструктивные взаимодействия III: **53**
— молекулы клеточной адгезии III: 28–31

— формирование конечности III: 82
– индукция хрусталика III: 55–56
– контактное ориентирование III: 12–13
– метанефрогенная III: 60–61, **65**
– первичная I: 111, **112**
Мезенхимный фактор III: 68
Мезодерма I: 12
– боковых пластинок I: 186, 199
— — образование почки конечности III: 80–81
– дорсальная (параксиальная) I: 186–199
– индукция конечности у куриного зародыша III: 80–81
— кожных производных III: 57–58
— у моллюсков II: 17
— энтодермой II: 56–57
– несегментированная I: 186
– области I: 186–188
– производные I: 187
– промежуточная I: 186, **187**, 199
– соматическая (париетальная) I: **187**, 199, **201**
– спланхническая (висцеральная) I: **187**, 199, **203**
— формирование сердца I: 201–202
– у амфибий I: 126–129
— позвоночных I: 147
Мезодермализующий фактор II: 60
Мезолецитальное яйцо I: 75
Мезомеры I: 78
Мезэнтобласты II: 18
Мейоз III: 263–266, 273–275
– блок (блокирование) III: 278, 288
– в процессе оогенеза III: 273–274
— — сперматогенеза III: 270, 271
Меланин II: 6
Меланома, рост и метастазирование I: 211
Меланосомы II: 70
Меланоциты I: 169, **170** II: **6**
Мелатонин III: 187
Мембраны, молекулы клеточной поверхности III: 74
– образование новых мембран при дроблении I: 106
– потенциал покоя и полиспермия I: 54
– строение III: 15–20
— жидкостно-мозаичная модель III: 18–19
Мембранный потенциал покоя I: 54
Менструальный цикл III: 187, 285–288
Мерогоны II: 45
Мероистический оогенез III: 281–284
Метаморфоз III: 161
– гемиметаболический и гомометаболический III: 175
– гормональная регуляция III: 161–172
– детерминация (трансдетерминация) II: 69
– преждевременный II: **181**, 182–183
– у амфибий III: 162–171
— морских ежей III: 161, 172–175
— насекомых III: 175–181
Метаморфозный климакс III: 164, **165**
Метаплазия II: 70–71
Метастазирование I: 210
Метафаза мейоза I: **23**; III: **264**
– митоза I: **15**
Метилирование глобиновых генов II: 155–156
– ДНК II: 155–156
– сайты II: 158
Механика развития (Entwiklungsmechanik) II: 71; III: 60, 321
Меченых путей гипотеза III: 110–111
Миграция клеток и морфогенез III: 5
— — развитие зачатка конечности III: 80–84
— механизмы III: 9–13
— нервного гребня I: 169–174
— половых III: 259–262
— роль фибронектина I: 114, 172–173, 188–190
Миелинизация I: 163
Миелиновая оболочка I: 163
Микроворсинки I: 51
Микроинъекции II: 88
Микромеры и модель двойного градиента II: 45–49
– у моллюсков I: 83
— морских ежей I: **77**, 78, 114
Микронуклеус I: 20–21, 25
Микроорганизмы как тератогены I: 179. *См. также* Бактерии
Микропиле I: **58**
Микротрубочки I: 38; III: 17–20
– и дробление у насекомых I: 99, **100**
— жгутик спермия I: 38–39
— механизм деления I: 69, 102–104
– ориентация и миграция клеток I: 114–115, **116**, III: 40
– роль в формировании нервной трубки I: 151–153
– рост II: 226–227
– сборка I: **20**
– строение I: 38–39
Микрофиламенты
– и движение Р-гранул у *C. elegans* II: 22
— дробление у насекомых I: 99–101, 103
— миграция клеток III: **40**
– роль в формировании нервной трубки I: 151–153
– связь с клеточной мембраной III: 17–20
Миксамебы I: 28–29
Миобласты I: 190–194
– изоформы I: 199
– протеогликановая оболочка III: **37**
– слияние I: 190–192
Миогенез I: 190–194
Миозин II: 6
– дифференцировка и процессинг РНК для него II: 189
– и формирование миобластов I: 193
— — нервной трубки I: 151
– изоформы I: 199
Миотом I: 190
Миоциты II: 6
Митоз, *см. также* Деление клеток; Дробление; Кариокинез
– скорость при дроблении I: 74–75
– стадии I: **15**
– у прокариотов и эукариотов I: 14
Митохондрии, адресование белков в них II: 225–226
– репликация в процессе оогенеза III: 275, 277
МКА *см.* Молекулы клеточной адгезии
Млекопитающие, *см. также* Человек; Мышь
– активация генома II: 216, 217
– гаструляция I: 136–140
– дробление I: 88–97
– инактивация Х-хромосомы II: 111–114
– миграция половых клеток III: 260–261
– пересадка ядер в энуклеированные клетки II: 77–78
– развитие поведения III: 122–124
– соединение гамет I: 46–50
– эволюция головного мозга III: 159
– элиминация синапсов III: 125
Многоклеточность, эволюция I: 22–31
Множественность путеводных вех нейронов III: 115–116
Мобильные элементы *см.* Транспозоны
Модель градиентная позиционной информации (модель французского флага) III: 89–90
– катящегося кольца II: 117–118
– полярных координат III: 95–98
– реакционно-диффузионная III: 106–109
– ретино-тектальной специфичности III: 120
Мозаичное развитие II: 8, 63
— гипотеза Ру II: 40–41
— у моллюсков II: 14
— — оболочников II: **10**
Мозг, *см. также* Нейроны
– белое вещество I: 157
– зрительная система млекопитающих III: 122–134
– контрлатеральная и ипсилатеральная стороны III: 123
– области связывания эстрогена III: **245**
– позвоночных III: 109–110
– половой диморфизм у птиц III: **244**
– серое вещество I: 157
– формирование отделов I: 153–155
– эволюция коры I: 159
Мозжечок (cerebellum) I: 154
– дифференцировка I: 157
– зернистый (гранулярный) слой I: 157
Молекулы адгезии к субстрату III: 20
– клеточной адгезии (МКА) III: 20, 24–25
— — идентификация III: 25–27
— — лимфоцитарные (L-МКА) III: 27
— — нейральные (N–CAM, N–МКА) III: 25–26, 28–31
— — и индукция пера III: 67
— — сахарид-опосредование III: 27, 32–34
— — распределение III: 30–32
– клеточной поверхности III: 20–23

Моллюски II: 213. *См. также* Улитки
– выводковая камера (marsupium) I: 86–87
– локализация цитоплазматических компонентов II: 14–18
– метаморфоз III: 182
– спиральное дробление I: 83–87
– характер роста раковины III: 194–197
Молочная железа III: 183–184
— влияние гормонов на развитие III: 184–185
– (млечная) почка III: 183
Молочный гребень III: 183
Моноклональные антитела III: 21–25
— к клеткам нейральной сетчатки III: 120
— установление синаптической специфичности III: 121
Морская звезда, бластула I: 78–79, **80**
— инвагинация I: **117**
Морской еж, акросомная реакция спермиев I: 43–45
— активация генома II: 216
— яйца I: 64–67
— быстрый блок полиспермии I: 54
— видоспецифическое узнавание спермиев и яиц I: 45–46
— гаструляция I: 111–118
— гистотипическая агрегация бластомеров III: 9
— плутеус и ингибиторы синтеза белка II: **208**
— материнская регуляция II: 206–207
— метаморфоз III: 161, 172–175
— оплодотворение I: 36, 63, 64
— опыты *Дриша* с изоляцией бластомеров II: 41
— полиспермия I: 54
— последовательная трансляция мРНК II: 214–215
— привлечение спермиев I: 42–43, 45
— прямое развитие III: 172–175
— слияние спермия и яйца I: 51–53
— ядер I: 59
— сложность мРНК II: 181
— субстрат и метаморфоз III: 181
— тип дробления I: 77–81; III: **77**
— яйцо I: 39–42
— яРНК III: 180–183
Морула I: 82, 90, **91**, 94
Морфалаксис III: 91
Морфоген(ы) III: 88
– градиент III: 88–93
– секреция зоной поляризующей активности (ЗПА) III: 102–103
Морфогенез I: 12; III: 5
– и контактные модификации III: 43–45
– при развитии ацетабулярии I: 16–18
– путем специфической гибели клеток III: 124–125
Морфогенетические детерминанты (факторы) II: 8, 12. *См. также* Морфогены
— внутриклеточная локализация II: 14–16
— в цитоплазме яйцеклетки I: 40, 67
— сегрегация по бластомерам II: 17–19
— у оболочников II: 8–14
– правила строения III: 304
мРНК I: 16
– без кэп-группы II: 213–214
– библиотеки II: 85
– вегетативная (Vg1) II: 15–16
– и старение III: 227
— вителлогенез III: 277
– классы II: 183–184
– ооцита I: 40, 65; II: 15–16, 207–211
– регуляция развития II: 107
– сложность II: 180, 181, 183
– спецификация полярности II: 31–33
– специфическая для эктодермы II: **106**
– специфичные для мышечных белков I: 194
– трансляция II: 199–202
– транспорт из ядра II: 194–196
– у ацетабулярии I: 17–18
— прокариотов I: 16
Мюррея закон III: 193
Мутагенез, специфические сайты II: 90–91
Мутагены и беременность I: 178–181
Мутации гомеозисных генов III: 147–151
– детерминации пола у дрозофилы III: 189–190; III: 247–248
– и инициация трансляции II: 467
— онкогенез III: 219–220
– как маркеры первичных половых клеток II: 27–29
— следствие встраивания в ген транспозонов II: 100
– нарушающие образование 3′-конца РНК II: 194–195
— полярность у дрозофилы II: 32–35
— сегментацию у дрозофилы III: 142–149
– неврологические у мышей I: 157–158
– обусловленные материнским эффектом II: 209
— отцовским эффектом II: 110
– при развитии конечности цыпленка III: 83
– специфические, *agametic* II: 29
— *Ametopodia* III: 59
— *Anterobithorax* (*abx*) III: 150
— *bicoid* II: 33
— *bicaudal* (*bic*) II: 33–**35**
— *bride* III: 76, 78
— *bride of sevenless* (*boss*) III: 78
— *Caudal* (*cad*) II: 33–**35**
— *Danforth's short tail* III: 65
— *dappled* II: 112
— *Deformed* (*Dfd*) III: 148
— *ebony* (*e*) II: 27
— *engrailed* III: 143
— *eyeless* I: 164
— *eudiplopodia* III: 83
— *hunchback* III: 143, 144, **145**, 151
— *knirps* III: 143, **145**
— *Krüppel* III: 143, 144, **145**
— *lin*-12 II: 130; III 78–79
— *multiple wing hair* (*mwh*) II: 27; III: 140
— *Notch* II: 130–132
— *oskar* II: 33
— *polydactylous* III: 83
— *posterobithorax* (*Pbx*) III: 150, **151**
— *Q* I: 209
— *rough* III: 78
— *scaleless* III: 66–67
— *sevenless* III: 76, 78
— *singed* (*sn*^{3}) II: 28
— *snake* II: 32
— *staggerer* I: 157–158
— *Toll* II: 32
— *weaver* I: 158
— *white* (*w*) II: 28
— *white-apricot* II: 100
— *yellow* (*y*) II: 28
Мышечная дистрофия I: 199
Мышечные трубочки I: 190–193; II: 189
Мышцы, *см. также* Миоциты
– в регенерирующих конечностях III: 94
– гипертрофия III: **203**
– дифференцировка I: 190–194
– элиминация синапсов III: 124–125
Мышь(и), гомеобокс *Hox* III: **155**, 156
– детерминация пола III: 239–241
– дробление I: **90**
– имплантация III: **91**
– инактивация Х-хромосомы II: 111–112, 114
– компактизация I: **90**
– миграция нейронов III: 113–114
– мутация *eyeless* III: 164
— *White* I: **172**
– пересадки ядер II: 77–78
– половые клетки III: 260
– процессинг РНК и развитие II: 183
– развитие молочных желез III: 183–186
— спермиев III: 271
– реконструкция кожи из суспензии клеток кожи III: **8**
– слияние клеток II: 93
– сплайсинг интронов II: 141
– средняя вероятностная продолжительность жизни III: 223
– трансгенные II: 88
– формирование клеток крови I: 215
– эмбриональные тератокарциномы I: 221–224
– эпителий слюнных желез III: 68–70
Мюллеров проток, гормоны и половой фенотип III: 242–243
— дифференцировка гонад III: 236, **237**

Надмолекулярная сборка белков II: 226–228
Надпочечники, мозговое вещество I: 169
Наружные эндотелиальные венулы (НЭВ) III: 122
Насекомые, *см. также* Дрозофила
– детерминация половых клеток II: 25–29
– меронстический оогенез III: 283–284
– метаморфоз III: 175–183

284
– общественные III: 198–199
– поверхностное дробление I: 97–101
– типы нейронов III: 110–114
– эволюция на основе гомеозисных генов III: 157
Натрия ионы, активация яйца I: 63–64, 66–67
— блок полиспермии I: 54
— освобождение от прозрачной оболочки I: 94
Нейволюирующая краевая зона I: 127, **128**
Независимое (автономное) развитие II: 51–52
Нейральный эпителий I: 155
Нейробласты I: 155–157
– дифференцировка III: 110
Нейромедиаторы I: 174–175
Нейрон(ы) (нервные клетки) II: 6. *См. также* Аксон, Дендриты, Мозг, Сетчатка, Фоторецепторные клетки
– агрегация III: 27, 28
– адренергические и холинергические I: 174
– гальванотаксис III: 12
– дифференцировка I: 157, 160
– зернистого слоя мозжечка I: 157–158
– изменения в процессе метаморфоза амфибий III: 167–168
– и регенерация конечности у амфибий III: 94
– насекомых III: 179
– межклеточные взаимодействия III: 110–113
– Пуркинье I: 157
– специфическая гибель клеток в процессе развития III: 124–125
– тело (сома) I: 60
– число в мозгу человека III: 109
Нейронной специфичности гипотеза III: 118
Нейропептид CGRP I: 188
Нейропор, передний и задний I: 150–151
Нейрула I: 147; III: 173, 259
Нейруляция I: 147, 182
Нематода (*Caenorhabditis elegans*), карта клеточных линий II: 21
– детерминация II: 20–23
— клеток вульвы II: 132–134
— пола III: 251–252
— половых клеток II: 24–25
– локус *lin*-12 II: 130–132
– трансдетерминация III: 266–269
Неотения III: 170, 171
Нервная пластинка I: 147–149
Нервная трубка I: 147–153
— дефекты смыкания I: 150–151
— дифференцировка клеток I: 153–158
— индукция хордомезодермой II: 61; III: 67–68
— индукция гензеновским узелком II: 53
— формирование I: 147–153
Нервный валик I: 148
– гребень I: **147**, 148
— миграция клеток из него, влияние ретиноловой кислоты I: 180
— основные производные I: 169–175
– желобок I: 148
Нетранскрибируемый спейсер II: 116, 117
Нефротом I: **190**
Ник-трансляция *см.* Трансляция разрыва
Нимфа III: 175
Новая кора (неопаллиум, неокортекс) I: 154, 158–159
Нозерн-блот II: 89–90
Нуклеиновые кислоты, гибридизация II: 80–81
— комплексы с белками II: 228
Нуклеосомы II: 159–162
– влияние Z-ДНК на их образование II: 170–171
– и транскрипция ДНК II: 164–166

Область (поле) проспективной конечности III: 98–99
– промотора II: 137–144
Оболочка оплодотворения I: 55, 64
Оболочники, дробление I: 87–88
– перемещение цитоплазмы I: 67, **68**
– цитоплазматическая спецификация II: 8–14
Обонятельная доля мозга (rhinencephalon) I: **154**, **159**
«Обратная генетика» III: 24
– транскриптаза II: 81
Овальбумин II: 143; III: 6, 191
– синтез II: 123–125
– стабилизация мРНК для него гормонами II: 218
Овальное отверстие I: 209
Овариальные фолликулы *см.* Фолликулярные клетки
Овуляция III: 285–288
Одноклеточные эукариоты I: 16–22
Одонтобласты I: 170
Окостенение I: 194–196
– интрамембранное I: 194
– эндохондральное I: 194–195
Окраска кошек и инактивация Х-хромосомы II: 114
Октабокс II: 152
Олигодендроциты I: **161**, 163, 170
Омматидии III: 76
Онкогенез III: 209
Онкогены вирусные (v-) и клеточные (c-) III: 209–219
– и клеточный рост III: 209–218
———— варианты переносчиков сигнала III: 216
———— рецепторов фактора роста III: 213
———— фактора роста III: 213
———— ядерных факторов III: 217
– список III: 211–212
– c-*fos* III: 218
– c-*myc* III: 218, 220–222
– v-*alb* III: 213
– v-*erb*-B III: 211, 213–215, 216
– v-*fms* III: 211, 215
– v-*fos* III: 218
– v-*ras* III: 212, 216–217
– v-*sis* III: 211
– v-*src* III: 216

Оогенез
– мероистический (у насекомых) III: 281–284
– у амфибий III: 275–281
— человека III: 284–288
Ооцит(ы) I: 40, **41**. *См. также* Оогенез
– компоненты III: 275
– первичные и вторичные (первого и второго порядка) III: 273–274; I: **41**
Оперон *lac* II: 114, 177
Оплодотворение I: 12, 35
– моноспермное I: 53
– у лягушки I: **13**
— млекопитающих I: 59–61
— морского ежа I: 59
Опухолевый фактор ангиогенеза I: 209
Опухоль(и), *см. также* Онкогенез
– Вилма III: 63
– индукция ангиогенеза I: 209–211
– образованная В-лимфоцитами III: 73–74, 221–222
– факторы, подавляющие рост III: 208–209
Организующий центр III: 133
— задний III: 133, 137–138
— передний III: 133–137
Органогенез I: 12, 147, III: **6**
Оси, ретино-тектальная проекция III: 117. *См. также* Полярность
Остеобласт I: 194, **197**; II: 6
Остеогенез I: 194–198
Остеокласт I: **195**, 198–199
Остеоцит I: 194
Островки Лангерганса III: 63
Отпадающая (децидуальная) плацента *см.* Плацента

Палеопаллиум (старая кора, гиппокамп) I: 154
Пангенеза гипотеза II: 40
Параксиальная мезодерма I: 186, 188
Паранеопластический синдром III: 25
Парасегменты у дрозофилы III: 143–146
Паращитовидные железы I: 219
Паренхиматозные органы, формирование III: 60–64
— ветвление III: 68–70
— индукция III: 60–64
Париетальная мезодерма I: **187**, 199, **201**
«Партеногенетические мерогоны» II: 207
Партеногенез I: 62
Пахитена III: **264**, 265
Пахитенная шапочка II: 117
Пептидные гормоны III: 170
Первичная бороздка I: 131, **132**, **134**, **150**
– кишка I: **218**, 134
– мезенхима I: 111, **112**
– полоска I: 131–133, **150**
— регрессия I: 133
—— у млекопитающих I: 139
——— птиц I: **150**
– эмбриональная индукция, *см.* Индукция
– ямка I: 131, **150**

Первичноротые I: **32–33**
Первичные половые клетки (ППК) I: 12; II: 25–26, 30–31; III: 259–262, 269
—— биотенциальность III: 266
—— миграция III: 259–262
—— процесс формирования спермиев I: 37
— признаки III: 187. *См. также* Гонады, Семенник(и), Яичник(и)
—— развитие III: 234–236
— тяжи III: 236
– фолликулы III: 285
Первичный гребень I: **150**
– задний мозг (rhombencephalon) I: 153, **154**; III: 245
– передний мозг (prosencephalon) I: 153, 154
– проток (млечный тяж) III: 184–185
Передача компетенции и эволюция III: 316–317
—— внутренние и средовые индукторы III: 318
Передний промоторный ЦААТ-бокс II: 142–144
Переключение классов *см.* Иммуноглобулины
Перемешивание экзонов II: 152
Переход к средней бластуле (ПСБ): I: 101; II: 145
Перешеек II: 124
Перивителлиновое пространство I: **60, 61**
Перидерма I: 175
Перикардиальная полость I: 202
Периост (надкостница) I: 194, 195
Перо, индукция III: 66–67
R-петля II: 140
Печеночный дивертикул I: 219–220
Печень, роль в гемопоэзе I: 216, 217
— оогенезе амфибий III: **277**
Пигмеи III: 206
Пигментация зерен кукурузы, роль транспозонов II: 100
– мышей, гетерозиготных по гену *dappled* II: **112**
Пигментная сетчатка I: 164
Пигментные клетки (меланоциты) I: 169–172
— сетчатки III: 163
Пили половые (фимбрии) I: **20**, 21
Пионерские нервные волокна III: 109
Питающие клетки III: 281, **282**
Пиявки, нейроны III: 121
Плазматическая мембрана яйца I: **39**, 40–42. *См. также* Мембрана
Плазматические клетки III: 94, 99, 107
– индукция III: 70–73
Плазмида рекомбинантная II: 83, **84**
— pBR322 II: 83, **84**
Плацента I: 137, 140–142
– и кровоснабжение зародыша I: 205–209
– индукция онкогенных белков III: **218**
– как приспособление к внутриутробному развитию I: 76
– контактная I: 140
– отпадающая (децидуальная) I: 137, 140–142
Плацевой слой I: 155–157
Плоские черви, стратегия роста III: 193
Плоскости делений дробления I: 77
— у амфибий II: 49, 50
—— иглокожих I: 89; II: 41
—— млекопитающих I: 89
Плотные контакты III: 43
— и компактизация I: 90
Плутеус I: 11, **112**; II: **208**; III: 172–175
– эксперименты Дриша II: 41
— Гёрстадиуса III: 43–45
Поведение, развитие III: 122–124
– связанное с полом III: 245–246
Поверхностное дробление *см.* Дробление
Поворот (смещение) сетчатки у *Xenopus* III: 118–119
– цитоплазмы зиготы у амфибий I: 121–123
Поджелудочная железа I: 219, 220; II: 146–150
— морфогенез III: 63–**64**
Подзародышевая полость I: 97, **98**
Подключичная артерия I: **204**, 207
Позвоночные, амниоты I: 33, 200
– пространственная организация нейронов III: 109
– филогенез и онтогенез I: 145–147
– эволюция головного мозга I: 159
Позиционная информация, градиентная модель III: 88–91
—— образование «пятен-глаз» на крыльях бабочек III: 90
– модель полярных координат III: 95–98
– память и регенерация конечности III: 14–15
Пол I: **20**
Поле конечности III: 99
Поли(А)-конец (хвост) II: 139
– и активация мРНК ооцита III: 281
— 3'-конец РНК II: 194–195
— механизм старения III: 227
— рекрутирование мРНК II: 204
— трансляция мРНК II: 201–202, 213
Поликлоны III: 140
Полипотентные кроветворные клетки I: 212
Полипотентность I: 174
– клеток нервного гребня I: 174–175
Полипоэтин I: **215**
Полисахариды и миграция клеток I: 135–136
Полисомы II: 103, **200**, 201
– и рекрутирование мРНК II: 212–213
Полиспермия I: 53
– быстрый блок I: 54
– медленный блок I: 54–55
Политенные хромосомы II: 65–67
— гибридизация in situ II: 92
— Z-ДНК II: 171
— последовательность пуфов II: 100–101
— пуфы экдистерон-чувствительные II: 100–101, 104, 121
Половая дифференцировка у млекопитающих III: 234–236
Половое созревание III: 187–189
– размножение I: 21. *См. также* Оплодотворение
— происхождение I: 20
— у вольвокса I: 25–28
Половой валик III: **235**
— и миграция половых клеток III: 260–261
– диморфизм мозга у птиц III: 244–245
Половые клетки I: 12. *См. также* Ооцит; Сперий; Яйцо
— и теория зародышевой плазмы II: 39–40
— локализация цитоплазматических детерминантов II: 24–30
— реактивация X-хромосомы II: 113
— у вольвоксовых I: 27
– гормоны III: 187
– пили см. Пили
– тяжи III: **235**, 236
Полосатое тело (corpus striatum) I: **159**
Поляризация и компактизация I: 91–92
Полярная лопасть II: 17–19
– плазма II: 26–29
Полярность анимально-вегетативная III: **276**, 277
— зародышей амфибий I: 120–122
– дорсовентральная II: 31
– и почкование у гидры III: 91–93
— цитоплазматические детерминанты II: 30–36
– модель полярных координат III: 95–98
– переднезадняя II: 33–34; III: 132–138
– развивающейся конечности III: 95–105
– регенерирующей конечности III: 93–95
– яиц *Drosophila* III: 284
Полярные гранулы II: 26–29
– клетки I: 99; II: 26–28; III: **313**
– тельца I: **60, 61**
— первое III: 274
Поперечные связи II: 73–76
Порфиропсин III: 163
Последовательное сигнальное адресование белка II: 224
Потенции клеток, ограничение II: 71–79
Потовые железы I: 177
Почечные канальцы III: 60–63
Почка, морфогенез III: 60–63
– конечности III: 80–83, 114, 172
Почкование у гидры III: 91
ППК *см.* Первичные половые клетки
Правило кратчайшей интеркаляции III: 96
– полного круга для дистальной трансформации III: 97
Превителлогенная фаза у амфибий *см.* Профаза
Предсердие I: **204**
Предшественник инсулина II: 219–220
Прекоцены III: 183
Преформации гипотеза II: 6–7
Привлечение спермиев I: 42–43
Прогенез III: 170, 171–172

Прогерия III: 224
Прогестерон I: 140
– влияние на развитие молочных желез III: 185
– и менструальный цикл III: **286**, 287–288
– оогенез III: 278, **279**, 281
Прогрессивное развитие корреляции III: 311–314
Продолговатый мозг (medulla oblongata) I: 153–154
Продольная борозда (sulcus limitans) I: 157
Прозрачная (блестящая) оболочка (zona pellucida) I: 40; III: 32, 287
–– и прикрепление сперматозоидов I: 49–50
––– освобождение бластоцисты I: 94–95
Производные кожи (покровов) I: 176–177. *См. также* Перо; Волосы
–– индукция III: 56, 57–59
Проинсулин II: 218, 219–220
Прокариоты I: 12–13
– РНК и ДНК I: 13–16
Пролактин II: 217–218; III: 186
– и метаморфоз амфибий III: 165
Пролиферация клеток и формирование кости I: 194–198. *См. также* Гиперплазия
Промежуточная мезодерма *см.* Мезодерма
Промежуточный мозг (diencephalon) I: 153–154, 163
Прометаморфоз III: 194, **195**
Промотор(ы) II: 119, **120**, 141–144
– генов иммуноглобулинов II: 151, 152
– инсерция и онкогенез III: 220–221
Пронуклеус(ы) I: 59–62, 67; II: 88
Просома II: 218
Проспективная потенция и проспективная (нормальная) судьба II: 42, 49–50
Простагландины III: 287
Пространственная предорганизация III: 108
Протамины III: 272
Протандрические виды III: 253
Протеинкиназа С III: **216**
– и активация яйца I: 64, **66**, 67
–– синтез гемоглобина III: 203–204
Протеогликаны в межклеточном матриксе III: 35–37
Протеолитические ферменты и метаморфоз амфибий III: 165, **166**
Протисты, дифференцировка I: 18–19; III: 296–297
– половое размножение I: 20–22
Проторакотропный гормон (ПТТГ) III: 179–181
Протоонкогены III: 211–212, 213–218
– механизмы трансформации III: 219–223
– список III: 211–212
– *c-mos* и выход из блока мейоза III: 279–280
Проторакальная железа III: **179**, 181
Профаза мейоза I: **23**
–– вителлогенная фаза у амфибий III: 275
–– подстадии III: **264**
–– превителлогенная фаза у амфибий III: 275
– митоза I: **15**
Проэритробласт I: 213
Прямое развитие I: 76; III: 170, 172–175
Псевдоплазмодий I: 28, **29**
Птицы, *см. также* Курица
– гаструляция I: 131–136
– гибель клеток в зачатке ноги III: 125
– дискоидальное дробление I: 97
– контроль пения III: 244
– миграция половых клеток III: 261–263
– репродуктивная система курицы III: **381**
– эволюция от рептилий III: 59
ПТТГ *см.* Проторакотропный гормон
Пуазейля закон III: 193
Пузырьки матрикса и остеогенез I: 197
Пупочная артерия I: 205, **206**, **208**
– вена I: 205, **206**, **208**
Пупочный канатик I: 140
«Пятна-глаза» III: 90

pH и эффективность трансляции II: 213–214
– роль в активации яйца I: 63, **64**, 65
Радиальная симметрия I: 32
Радиальное дробление I: **32**, 78–83
Радиоактивный распад и онкогенез III: 220
Радужка I: 169
Размножение I: 12. *См. также* Бесполое размножение, Половое размножение
– простым делением I: 20–21
Раковина, логарифмическая спираль и рост III: 194–197
Распознавание молекул клеточной поверхности II: 99–100
Рассортировка клеток III: 6–7
–– термодинамическая модель III: 13–15
Растения, клонирование II: 78
– связь с жизненными циклами насекомых III: 183
– синтез пигментов II: 100
Реакции прозрачной оболочки (реакции зоны) I: 55
Реакционно-диффузионная модель III: 107–109
Регенерационная бластема III: 94
Регенерация, влияние ретиноидов III: 105–106
– Вольфовская II: **70**
– глаза II: 70–71
– конечности III: 15, 93–94, 106–109
–– дифференциальная адгезия клеток III: 14–15
–– полярность III: 94–95
–– саламандры III: 94–95
– правила пространственной организации III: 95–98
– у гидры III: 91
Регуляторные взаимодействия генов дрозофилы III: 151–153
– гены, эволюция III: 151–153
Регуляционное развитие II: 41
–– теория Дриша II: 41–43
Регуляция I: 30–96. *См. также* Транскрипция; Трансляция
– генов прокариот и эукариот I: 15–16
– у слизевиков I: 30–31
– по типу обратной связи продукции фолликулярных клеток III: 288
––––– пролиферации клеток III: 208
––––– синтеза гема II: 202
Резакт I: 42–43
Рекомбинантная ДНК II: 81
Рекрутирование мРНК II: 213
Рентгеновские лучи как тератоген I: 178
Реорганизация генов и созревание лейкоцитов II: 93–99, 151–154
Рептилии, зависимая от температуры детерминация пола III: 254
– миграция половых клеток III: 261–262
– эволюция головного мозга I: 159
Реснички клеток бластулы I: 81
–– трохобласта II: **16**
Рестрикционные ферменты (эндонуклеазы) II: 81
–– сайты метилирования II: 158–159
Ретикулоциты I: 213
Ретикулярная пластинка II: 213; III: 34
Ретинобластома III: 222
Ретиноевая кислота (РК) и врожденные дефекты I: 179–180. *См. также* Витамин А
–– как морфоген III: 102–106
Ретровирусные векторы II: 88
Рецепторные белки III: 20
Рецепторы клеточной поверхности, поперечные связи III: 73–75
Реципрокная индукция *см.* Индукция
Рибонуклеопротеиды (РНП) II: 211–215
Рибосомная РНК *см.* рРНК
Рибосомные субъединицы II: 199–201
Рибосомы, сравнение со сплайсосомами II: 193
– ооцита I: 40; II: 115; III: 275
Рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (РФ-ЛГ) III: 187
– гонадотропного гормона (РФ-ГГ) III: 187, 277
– тиреотропного гормона (РФ-ТТГ) III: 164–165
РНК, *см. также* мРНК; рРНК; яРНК
– дифференциальный процессинг II: 186–190
– 3'-конец II: 194–195
– локализация в ооците II: 15–16
– поли(А)-хвосты II: 194–195
– полярных гранул ооцитов II: 29
– предшественник, не прошедший процессинг II: 185–186
– прокариот и эукариот I: 14–16
– синтез в пуфах II: 101–104
РНК-блот II: 89

РНК-полимераза, классификация II: 119
– первый транскрипционный фактор для нее II: 127–128
РНП *см.* Рибонуклеопротеиды
Роговой слой I: 176
Роговица I: 166
– дифференцировка хрусталика III: 55–56
Родопсин III: 163
Рост I: 12; III: 7. *См. также* Аллометрический рост, Изометрический рост
– и онкогены III: 213–218
Ротовая пластинка I: 219
Роторные культуры III: 8–9
рРНК, гены для нее, амплификация II: 115–120
– и гибридизация нуклеиновых кислот II: 80–81
– регуляция транскрипции фактором TFIIIA III: 127–130
РФ-ЛГ *см.* Рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона
Рыбы, гермафродитизм III: 252–253
– дискоидальное дробление I: 97
– образование нервной трубки I: 148

Сайт-специфичный мутагенез II: 90–91
Сайты, *см. также* Рестрикционные ферменты
– разветвления (в интроне) II: 190–191
– разрезания рестриктазой III: 81–83
– сплайсинга II: 190–191, **192**, 193
Сальные железы I: 177
Самцы, сопряженная эволюция III: 253
– Y-хромосома III: 234
Саркома III: 209
Саузерн-блоттинг II: 88–89
Светлое поле (area pellucida) I: 97, 131, **132**
–– и первичная полоска I: 131
Сегментация у дрозофилы III: 133–134
Сегментная пластинка I: 186
Сегрегация цитоплазмы II: 5
Секвенирование II: 85–87
Селезенка, формирование клеток крови I: 212–213, 215–216
Семенники, развитие III: 234–236
Семявыносящие канальцы III: 236
Сенсорная депривация и зрительная система III: 122–124
– нервная система и нервный гребень I: **170**, 174–175
Сердечная трубка I: 202
Сердце I: 201–202
Серийные пересадки ядер II: **73**
Серотонин III: 115
Серый серп I: 67, **69**
–– и развитие амфибий I: 121, 123; II: 49–50
Серповидноклеточная анемия II: 228
Сетчатка, вторичная индукция II: 62
– дифференциальная специфичность и пространственная организация III: 112–113
– дифференцировка I: 163–166
– множественность путеводных вех III: 116
– молекулы клеточной поверхности III: 22
– нейральная I: 164–166
– пигментная I: 164
– рассортировка клеток III: 13–14
Сеть семенника III: 236
Сиаловая кислота III: 29
Сигнальный рецепторный комплекс II: 224
Симметрия и дивергентная эволюция I: 33
Симпатические ганглии I: 169
Синапсис III: 264
– механизм III: 266
Синапсы, элиминация III: 124–125
Синаптическая специфичность III: 116–121
Синаптонемальный комплекс III: 264
Синдекан III: 35, 62
Синдром Дауна I: 178
– Клайнфельтера I: 178
– Леша–Найхана II: 112
– отсутствия чувствительности к андрогену III: 184, **242**
– приобретенного иммунодефицита (СПИД) III: 72
– Роберта I: 178
– Хатчинсона–Джилфорда III: 224
Синтез РНК в ооцитах амфибий III: 280–281
––– ооцитах насекомых III: 281–283
––– процессе метаморфоза амфибий III: 168–170
–– и активация генома зародыша II: 216–217
––– выворачивание III: 177–179
Синус краевой I: **206**
Синхронные гермафродиты *см.* Гермафродитизм
Синцитиальная бластодерма *см.* Бластодерма
Синцитиальные тяжи I: 111, **113**
Синцитиальный трофобласт I: **137**, **138**, **139**, 140–142
Синцитий I: 26
– морского ежа I: **116**
– образование при развитии спермиев III: 271
Система кровообращения и проблема роста организма III: 192–194
–– плода I: 205–209
–– формирование I: 200–209
– синтеза белков in vitro II: **203**
Сифилис, врожденные дефекты I: 179
Скелетные иглы I: 111, **112**, **113**
Складка(и) головная(ые) (цефалическая) III: 132
–– поперечные, задняя и передняя III: 132
Склеротом I: 173, **174**, 190
Скорлупа II: 123, 124
Слизевики I: 28–31
– транскрипционная регуляция II: 202
– *Dictyostelium* I: 28–31
– *Physarum* II: 220–221
Слияние клеток I: 93
– мембран спермия и ооцита I: 50–53
– миобластов I: 190–191
– ядер I: 56–61; II **93**
Сложность мРНК II: 178–179, 181, 210. *См. также* Кривые C_0t
Слюнные железы, ветвление III: 68–70
Смена поколений I: 26–28
Смешанная культура лимфоцитов I: 141, 142
Соединение гамет I: 46–48
–– млекопитающих I: 48–50
–– морского ежа (узнавание) I: 45–46
Соединительный стебелек I: 140
Сократимая сеть III: 20
Сократимое кольцо микрофиламентов III: 103–104
Соматическая детерминация пола III: **252**
– мезодерма I: **187**, 199, **201**
Соматомедины III: 205–206
Соматоплевра I: 200, **201**, **203**
Соматотропин *см.* Гормон роста
Сомиты I: **150**, **151**, **171**, **172**, 188–190
– и миграция клеток нервного гребня I: 173, 174
Сомитомеры I: 188
Соотношение площадь–объем III: 192–193
Спектрин I: 151
Сперакт I: 42
Сперматиды III: **269**, 270
Сперматогенез III: 269–273
Сперматогонии III: 269–270
Сперматозоиды I: 35
Сперматоциты III: 269–270
Спермии, дифференцировка (сперматогенез) III: 269–273
– исторические концепции I: 35–36
– капацитация I: 46–50
– строение I: 37–39
Сперmiогенез III: 270–271
Спецификация и детерминация III: 90, 157–158
– оси конечности III: 98–102
–– ретино-тектальной проекции III: 118–119
– реакционно-диффузионные процессы III: 106–109
Специфичность гибели клеток III: 165–167. *См. также* Дифференциальная специфичность
Спинной мозг III: 116, **117**
Спиральное дробление I: 32–33, 83–87
Сплайсинг РНК и детерминация пола II: 189–190
––– мяРНП II: 191–194
––– процессинг белка II: 188–189
––––– иммуноглобулинов II: 186–188
–– сплайсинговые сайты II: 190, **191**
Сплайсосомы II: 193
Спланхническая (висцеральная) мезодерма *см.* Мезодерма
Спланхноплевра I: 200, **201**, **203**
Спонгиобласты I: **161**
Срединное возвышение III: **188**
Средний мозг (mesencephalon) I: 153–154, III: **245**

Стабильность генов II: 92–93
Старение III: 223–227
– теория соматических мутаций III: 227
– у вольвокса I: 26–27
Стволовая(ые) клетка(и) I: 212
— коммитированная I: **212**, 213
— кроветворная I: 212–215
— первичные половые II: 24
Стереотропизм III:110
Стерробластула I: 83
Стомодеум I: **218**
Стоп-кодон II: **189**, 190
Стрипсин I: 94–95
Строение клетки I: 12–16
Строма III: 56
Студенистая оболочка яйца I: **39**, 40
Сульфгидрильные группы белка и дробление III: 78, **80**
Суперспирализация II: **170**
Сурфактант I: 236
Сывороточный альбумин II: 6

T_3 *см.* Трийодтиронин
T_4 *см.* Тироксин
Т-клетки (Т-лимфоциты) I: 141–142; II: 6, 99
– индукция В-клеток III: 70–73
– миграция III: 122
– старение III: 224–225
– супрессоры III: 72
– хелпер-индукторные III: 72
Таламус III: 154
Талассемия II: 141, 190, 200
Талидомид I: 180–181
Талин III: 20
ТАТА-бокс (бокс Гольдберга–Хогнесса) II: 142–144, 162
Тектум III: 117–121
Телолецитальное яйцо I: 75
Телофаза мейоза I: **23**; III: **264**
– митоза I: **15**
Тельца Барра II: 111
– Ниссля I: **162**
Темное поле (area opaca) I: 97, 131, **132**
Температура и детерминация пола III: 254
Тенасцин III: 39
Теория ошибок в синтезе белка (катастрофы ошибок) III: 227
– соматических мутаций III: 227
Тератогены I: 178–182
Тератокарцинома I: 92, 221–224; II: 186
– инактивация Х-хромосомы II: 114
Тератология и биология развития II: 7–8
Терминация II: 199
Термодинамическая модель клеточной адгезии III: 13–15
Тестостерон II: 6
– и маскулинизация плода III: 243
— половое созревание III: 187–189
— развитие гонад III: **234**
— молочных желез III: 184–185, **186**
– становление поведенческих реакций у млекопитающих III: 245
— песенного поведения птиц III: 244–245
Тетрада (бивалент) III: 265
Тетрациклин II: 83
Тимопоэтин I: 215
Тимус и глоточные карманы I: 219
— миграция лимфоцитов III: 10
— старение III: 224
Тип спаривания у дрожжей II: 99
Типы дробления *см.* Дробление
Тиреотропный гормон (ТТГ) и мембранный транспорт III: 170
— метаморфоз у амфибий III: 164–165
— неотения III: 171
Тироксин (T_4) III: 163—165
Тканеспецифическая регуляция и метилирование ДНК II: 155–156
Тождество геномов II: 65–67
— биохимические данные II: 92
Топоизомеразы II: 169
Транс-регуляторы II: 141–142, III: 302
– активация хроматина II: 162–163
– и нуклеосомы II: 166
Трансгенные мыши II: 88; III: 205
Трансдетерминация II: 69
Транскрибируемая 3'-концевая область II: 139
Транскрипция II: 137
– амплификация как стратегия этого процесса II: 114–120
– в ооцитах III: 280–281
— процессе сперматогенеза III: 271–273
– инициация II: 199
– рибосомных генов II: 119–120
– селективная II: 120–127
– у прокариот и эукариот I: 14–16
Трансляция II: 137
– изменение эффективности II: 214–215
– механизмы II: 199–202
– разрыва (ник-трансляция) II: 91
– у прокариот и эукариот I: 14–16
– цитоплазматических сигналов ооцита II: 211–216
Трансплантация, *см. также* Клонирование
– конечностей III: 95, **97**
– эксперименты на гидре III: 91, **92**
— *Xenopus* I: 123–124
Транспортные белки III: 20
Транспозоны II: 100; III: 20
Транс-регуляторы II: 141, **142**
Трансфекция II: **87**, 143, **145**
Трансферрин III:
Трансформирующий фактор роста (ТФР) II: 60–61, III: 208
Трахея II: 63
Триада Картедженера I: 38–39
Триглицериды II: 219
Трийодтиронин (T_3) III: 163–165, 170
Трипсин III: 63
Тритон, гаструляция I: **129**, **130**
– нейруляция I: **149**
– регенерация глаза II: 70–71
тРНК и инициация трансляции II: 199–200
– ооцита I: 40; III: 275
Тройничный ганглий III: 114
Тромбопоэтин I: **214**
Тропомиозин I: 4
Тропонин Т II: 189
– и слияние миобластов I: **193**
Трофобласт I: 90, **137**, **138**, 140, **141**
– дифференцировка I: 93
Трофэктодерма I: 90
Трохобласт, дифференцировка клеток II: 16
Трохофора II: 17; III: 301
«Трубка оплодотворения» I: 21–22
Тубулин, изоформы III: 271
– и рост микротрубочек II: 227
— строение микротрубочек I: 18, 38
– образование у *Naegleria* I: 18
Туловищный отдел нервного гребня I: 170
Туникамицин I: 92
ТФР *см.* Трансформирующий фактор роста

Убиквитин II: 222
Увоморулин I: 92
Углеводы в клеточной мембране III: 16, **18**
Углубление бластопора III: 125
Улитка, детерминация пола III: 255–256
– дробление I: 83
– закручивание раковины I: 83–85
– метаморфоз и окружающая среда III: 182
– рост нейронов III: 115, **116**
— раковины III: 194–197
Устрицы, субстрат и метаморфоз III: 181
Утка, морфогенез ноги III: 125
Утрата генетического материала II: 99

Фактор(ы), детерминирующий(ие) семенники III: 234
— ген для него III: 236–239, 241
– дифференцировки В-клеток (ФД-В-клеток, BCDF) I: 214
– ингибирующие рост III: 208–209
— индукция плазматических клеток II: 71–73
– индуцирующий дифференцировку (DIF) I: 30
– полученный из тромбоцитов (ФРТ) (или тромбоцитарный фактор роста, ТФР) III: 207, 208
– роста В-клеток (ФР-В-клеток, BCGF) I: 214, III: 71, 72
— гемопоэтические I: 213–215
— глии (ФРГ) III: 94
— индукция мезодермы II: 60–61
— КСФ-м,г I: 215; II: 88–89, **205**
— нервов (ФРН) III: 114–115
— рецепторы III: 213–215
— фибробластов (ФРФ) II: 60; III: **207**
— эпидермиса (ФРЭ или эпидермальный фактор роста, ЭФР) II: 131–132; III: 207
– стимулирующий В-клетки (BCSF) III: 71, 72
— созревание (ФСС) I: 102
Факультативный гетерохроматин *см.* Гетерохроматин
Фасцилины III: **31**, 32

Фасциляция III: 32
Фермент(ы) вылупления I: 81
– и слияние миобластов I: 191–194
– рассеивающий клетки лучистого венца I: 48
––– *Bam*HI II: 81–84, 97
Фетальный гемоглобин (гемоглобин плода) I: 208–209; II: 126–127
Фиалопор I: **27**, **28**
Фибробласты, изучение процессов старения in vitro III: 225–226
– контактное ингибирование I: **14**
–– ориентирование III: 12–13
Фиброин шелка II: 120, 143, 191
Фибронектин I: 114; III: 37–39
– дифференциальный процессинг II: 188–189
– и организация нейральной сетчатки III: 112–113
–– развитие кожи III: 67
– миграция клеток нервного гребня I: 173
–– опухолевых клеток I: 211
– рецепторы к нему III: 39–42
– роль в процессе гаструляции I: 127–129, 136
– сайты связывания клеток III: 38
– структурные и связывающие домены III: **38**
ФИД *см.* Фактор, индуцирующий дифференцировку
Филаменты Nuage II: 29
Филетические ограничения III: 305
Филоподии I: 111
– аксона I: 160
Фимбрии *см.* Пили половые
Фокомелия I: 180–181
Фокусы трансформированных клеток III: 210
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и менструальный цикл III: 286
––– овуляция III: 284
––– половое созревание III: 187
Фолликулы яичника III: **235**; 236, 285
Фолликулярная (пролиферативная) фаза менструального цикла III: 286–287
Фолликулярные клетки II: 6
–– амплификация генов хориона в них II: 120
–– насекомых II: **282**
Формирование пространственной организации III: 88. *См. также* Позиционная информация
––– в нервной системе III: 109–121
––– при развитии конечности III: 98–109
––– реакционно-диффузионная модель III: 107–109
«Формообразующее стремление» (Bildungstrieb) II: 7
Фосвитин III: 276
Фосфодиэфирные связи и сайты ветвления II: 191, **192**
Фосфолипаза С III: 214, **215**
– активация яйца I: **64**, 66–67
– деление клеток III: 214
Фосфолипидный бислой III: 16
Фосфолипиды и слияние мембран I: **52**. *См. также* Жидкостно-мозаичная модель
Фосфорилаза-киназа II: 220
Фосфорилирование белков ооцита III: **290**
– гистонов II: 221
Фоторецепторные клетки I: 164–166
–– антигены дифференцировки III: 25
ФРТ *см.* Фактор роста, полученный из тромбоцитов
ФРФ *см.* Фактор роста фибробластов
ФСГ *см.* Фолликулостимулирующий гормон
Функции Бесселя III: 108

Хемоаффинитета гипотеза III: 118
Хемотаксис I: 29; III: 10
– и миграция нейронов III: 113–116
— привлечение спермиев I: 42–43
– у слизевиков I: 29–31
Хемотаксиса гипотеза III: 113–115
Хиазма III: **264**, 265
Химеры *см. также* Аллофенная регуляция; Аллофенные мыши
– из клеток тератокарциномы I: 222–224
– курица–перепел I: 217
Хинин и врожденные аномалии I: 179
Хлорамфениколацетилтрансфераза (ХАТ), III: 152–153
Холинергические нейроны *см.* Нейрон(ы)
Хондрогенез I: 195
Хондроитинсульфат II: 6
Хондроциты I: 190; II: 6. *См. также* Хрящ
– изоформы I: 199
– их основные продукты II: 6
– и формирование кости I: **195**, 197
Хорда I: **171**, **174**, **177**, **178**
– у амфибий I: 118–119
– формирование в процессе гаструляции I: 118, 127, **128**
Хордомезодерма I: 119; II: 56, 61, **62**; III: 67
Хориоаллантоисная оболочка I: 200
Хорион I: **33**, 90, 140, 200, **201**
– белки II: 6, 120
– ворсинки II: 114
– гормоны I: 140–141
– у близнецов I: 95–97
Хорионаденома I: 61
Хорионический гонадотропин I: 140
– соматомаммотропин I: 141
Хроматиды I: **15**, **23**, III: 263, **264**
Хроматин III: **15**, **23**, II: 159–162
– активация II: 162–163
– диминуция II: 25
– и интенсивность дробления I: 74–75
– присоединение к ядерному матриксу II: 167–169
– состояние в процессе дробления I: 101
– структура II: 159–162
– типы II: 110
Хромомеры II: 66
Хромосомные пуфы, индукция экдистероном II: 121–123
— на полисомах II: **201**
Хромосомы, *см. также* Политенные хромосомы; X-хромосомы; Y-хромосомы
– детерминация пола III: 233, 235–236, 246–250
– и врожденные дефекты I: 178
– инактивация II: 110–114
– нумераторные элементы III: 248–249
– перестройка и онкогенез III: 221–222
– поведение во время мейоза I: **23**; III: 263–269
––– митоза III: **15**
– прокариот и эукариот I: 12–14
– типа ламповых щеток II: 121–123, III: 265, 271
X-хромосома, инактивация и окрас у кошек II: 114
– синдром Клайнфельтера I: 178
Y-хромосома
– гены III: 236–239
– и мужской фенотип III: 234–239
– образование спермиев у дрозофилы III: 271
Хрусталик, дифференцировка I: **165**, 166–169
– индукция III: 52–54
–– вторичная II: 62
– клетки II: 6
– регенерация II: 70–71
Хрусталиковые плакоды I: 163–164, **165**, 166; III: 55
Хрусталиковый пузырек I: 167
Хрящ, *см. также* Хондроциты
– и формирование костей I: 194–198

ЦАТ среда III: 22
цАМФ и дезинтеграция зародышевого пузырька III: 277
— миграция слизевика *Dictyostelium* I: 29–31
— регуляция созревания ооцита III: 289–290
– как второй посредник III: 170
Целом I: 199
– внезародышевый I: 201
– полости I: 199
– способы образования, схизоцельный (шизоцельный) I: 32
––– энтероцельный I: 32
Центральная нервная система, *см. также* Мозг; Нейроны
––– и нервная трубка I: 151–163
––– клетки нервного гребня I: 169
––– миелинизация I: **162**, 163
––– поведенческие реакции, обусловленные *полом* III: 244–246
––– развитие поведения III: 122–124
––– формирование пространственной организации III: 109–121
Центральный промоторный элемент II: 127
Центролецитальное яйцо I: 75
Центромера I: **15**, **264**, **245**, **271**
Цефалическая складка III: 132
Цикл мочевины III: 163, **164**, **169**, 170
Циклины II: **215**, 216
Циклический аденозинмонофосфат *см.* цАМФ

Циклогексимид II: 208
Циклопия I: 179
Цис-регуляторы II: 141–142, 153; III: 150–151
Цистоциты III: 281, **282**
Цитокинез I: 102
Цитомегаловирус I: 178
Цитоплазма, *см. также* Цитоплазматическая локализация
– взаимодействие с ядром I: 16–18
– и гаструляция у амфибий I: 121–125
— дискоидальное дробление у насекомых I: 99, 101
– у оболочников I: 88
– яйца (ооцита) I: 39–40
— активация генома II: 216–217
— реорганизация и оплодотворение I: 67–69
— содержание мРНК II: 210–216
Цитоплазматическая локализация детерминантов половых клеток II: 24–31
— морфогенетических детерминатов II: 14–16
— у моллюсков II: 14, 16–19
– сегрегация II: 5
— у оболочников II: 9
– спецификация у оболочников II: 8–12
Цитоплазматические детерминанты половых клеток II: 24–30
— полярности у дрозофилы II: 31–36
– мостики *I*: 21, **23**, **28**
— и сперматогенез III: 297
Цитоскелет III: 317–**318**
– и дробление I: 99, **100**, 102–106
— поперечные связи III: 75
Цитостатический фактор (CSF) I: 102; III: 278–279
Цитотрофобласт I: **137**, 140, **141**; III: 213
Цитохалазин В *I*: 103, 104; II: 10
– и удлинение аксона I: 160, **163**
ЦфГ-кластеры II: 157

Человек
– аллометрический рост III: 197, **198**
– врожденные дефекты I: 178–181
– β-глобиновый ген II: 137–141
– глоточные карманы I: 219
– дифференцировка мезодермы I: 190
– и вирус СПИД III: 72
– изменение числа половых клеток в яичнике III: 274
– инактивация Х-хромосомы II: **111**, 112–114
– клетки иммунной системы III: 70–73
– клонирование II: 76–77
– кровеносная система зародыша I: **204**, **206**
– нейруляция I: **151**
– онкогенез III: 219–223
– оогенез III: 284–288
– оплодотворение и имплантация I: **89**
– первичные оогонии III: 273, **274**
– продолжительность жизни III: 223–224
– пубертатный период (период полового созревания) III: 187–189
– развитие волос I: 177
— гонад III: 234–236
— пищеварительной системы I: 219–220
— сетчатки I: 164
— респираторного тракта I: 221
– скорость клеточных делений III: 202–204
– старение III: 223–227
– транскрипция глобиновых генов II: 125–127
– формирование кости I: 194–195
— поджелудочной железы I: 220–221
— сердца I: **204**
– эволюция мозга I: 159–160
Чередующееся дробление *см.* Дробление
Череп, аллометрический рост III: 199–200
Черепной отдел нервного гребня I: 170, 175

Шванновские клетки I: **161**, **162**, 163
Шероховатый (гранулярный) эндоплазматический ретикулум, *см. также* Эндоплазматический ретикулум
— синтез коллагена II: 228–230
Шиповатый слой эпидермиса I: 175, **176**
Шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*), активация генома II: 216–217
— амплификация генов II: 116–118
— библиотека ооцитов II: 210–211
— гибридизация нуклеиновых кислот II: 80–81, 82
— «дот-блоты» II: **106**
— замаскированные мРНК II: 212
— индукция мезодермы II: 56–60
— карта гаструляции I: 128
— презумптивных зачатков I: 118–**128**
— клонирование с вычитанием II: 104–105
— локализация морфогенетических детерминантов II: **16**
— миграция половых клеток III: 259–260
— MM3-гомеобокс III: 156
— перемещение глаз II: 168
— цитоплазмы I: **68**, 69
— переход к средней бластуле I: 118
— регрессия хвоста у головастика III: 165–167
— ретино-тектальная проекция III: 117–119
— роль транскрипции при метаморфозе III: **169**
— созревание ооцитов III: 275–277
— специфическая для гаструлы активность генов II: 104–105
— сравнение с другими лягушками II: 75–74
— TFIIIA контроль рРНК генов II: 127–130
— формирование архентерона I: 125, **126**
— бластопора I: 122–124
— новых мембран I: 106
— хроматин II: **166**
— щелевые контакты III: 45
— эндоплазматический ретикулум кортекса I: 57
— энхансерные последовательности II: **146**
— эксперименты по клонированию ядер II: 74–76
— ядерные поры: II: **195**

Щелевые контакты I: 90; III: 44–45
— и дробление I: 87
— компактизация I: 90
— морфогенез у гидры III: 93
Щелочная фосфатаза и гаптотаксис III: 12
— как морфогенетический детерминант II: 13–14
Щитовидная железа и гормоны метаморфоза амфибий III: 163–170
— дифференциальный процессинг РНК II: 188

Эволюция, возникновение яйца амниот I: 33
– головного мозга I: 150–160
– и аллометрический рост III: 200–201
— гетерохрония III: 170–175
— гомеозисные гены III: 157
— дивергенция I: **31**
— дробление I: 85–87
— индивидуальное развитие I: 145–147
— мужской фенотип III: 253
— процессы индукции III: 59–60
Экварии I: 56
Эквивалентная группа у *C. elegans* II: 22
Экдизон III: 179–181
– и мероистический оогенез III: 283–284
Экдистерон II: 67; III: 179–181
– и выворачивание у насекомых III: 177, 179
— морфогенез у насекомых III: 179
— хромосомные пуфы II: 121–122
Экзон II: 137–139
Экзоцитоз и реакция кортикальных гранул I: 55, **57**
– как акросомная реакция I: 44
Экспрессия гаплоидного гена II: 272
– генов дифференциальная II: 65
Экстрахромосомная РНК II: **118**
Экстрахромосомные ядрышки II: **116**, 117
Эктодерма I: 12
– и гаструляция у амфибий I: 131
— детерминация у амфибий II: 50
— образование нервной трубки I: 147–149
– производные I: 147, **187**
Электрический градиент и миграция клеток III: 12
Электрофорез II: 87
– методы блоттинга II: 88–89
Элемент P II: 147, 148
Элементы ЦААТ II: 142–144
Элонгация II: 199–201
Эмбриология I: 11
Эмбриональная индукция II: 5
Эмбриональные тельца I: 221–222
Эмбриональный гемоглобин II: 126
Эметин II: 208

Эндокард I: 202, **203**
Эндокринные железы (мозговое вещество надпочечников) как производные нервного гребня I: 169, 170
Эндоплазматический ретикулум I: **58**
— белки для него II: 224
— и реакция кортикальных гранул I: 57–58
Эндорфины, посттрансляционная модификация II: 219
Эндотелиальные клетки
— и индукция хрусталика III: 55–56
— формирование кровеносных сосудов I: 205
Эндохондральное окостенение I: 194
Энергиды I: 99
Энтелехия II: 43
Энуклеация II: 71
– изучение материнских эффектов II: 207–209
– яйца млекопитающих II: 76–78
Энхансеры II: 139, 144–145
– реагирующие на гормон II: 150
– с регулируемой во времени активностью II: 145–146
– тканеспецифические II: **145**, 146–151
Эпендимная зона нервной трубки I: 155–157
Эпендимные клетки I: 160, **161**
Эпибласт I: 97, 131, **132**
– у млекопитающих I: 137–140
Эпиболия I: 110
– во время гаструляции у птиц I: 136
– у амфибий I: 119, 129–131
Эпигенез II: 7
Эпидермис I: 175–177
– агрегация из суспензии клеток кожи III: 8–9
– базальный (герминативный) слой I: 39
– и клетки нервного гребня I: 169
– слои I: 175–176
Эпимиокард I: 202, **203**
Эпиморфическая регенерация III: 93, 95–98
Эпителий легкого III: **62**, 63
Эпителио-мезенхимные взаимодействия III: 56
— ближние III: 64–68
— во внеклеточном матриксе III: 34–35
— генетическая специфичность III: 57–58
— индукция конечности III: 80–83
— индукция органов III: 60–63
— клеточные контакты III: **66**
— развитие гонад III: 236
— молочных желез III: 184–185
— региональная специфичность III: 57
Эпифиз I: **154**
Эпифизарные пластинки, слияние I: 193
Эритробласт I: 213
Эритропоэз III:
Эритропоэтин I: 213–214, 215
Эритроциты II: 6. *См. также* Клетки крови
– дифференцировка I: 213, 214
– продолжительность жизни I: 212
ЭРФ *см.* Эпидермальный фактор роста
Эстрадиол III: 246
Эстроген III: 277, **278**
– и дифференцировка мюллерова протока III: 243
— менструальный цикл III: 187
— оогенез у амфибий III: 227
— поведение III: 245–246
— развитие гонад III: 234–236
— синтез овальбумина II: 123–125
— энхансерные элементы II: 153
Эструс III: 284
Эукариотический фактор инициации (эФИ, eIF) II: 199, **200**, 203–204
Эукариоты I: 12
– ДНК и РНК I: 14–16
– колониальные I: 22–25
– одноклеточные I: 16–22
Эухроматин III: 110

Ювенильный гормон (ЮГ) III: **180**, 181–183, 283
— и дифференцировка особей у муравьев III: 199, 317
— оогенез в мероистическом яичнике III: 283
— прекоцены III: 183
— синтез III: 181, 182

Ядерная оболочка I: 12–16, **23**
— и мейоз III: **268**, 269
— транспорт мРНК II: 195–196
Ядерные поры, транспорт мРНК II: 195
– РНК *см.* яРНК
Ядерный матрикс II: 167–169
Ядра мозжечка I: 157
– контролирующие пение III: 244–245
Ядро, адресование белков II: 225
– взаимодействие с цитоплазмой I: 16–18, II: 42–43
– возраст и старение III: 225
– зиготы I: 59
– ооцита I: **39**, 40
– спермия I: **37**
– строение у эукариот I: 12–16
– техника микроинъекций II: 88
– транспорт мРНК II: 195–196
Ядрышки как генетический маркер II: **31**, **75**, **82**
– экстрахромосомные II: 116
Яичники, *см. также* Менструальный цикл
– первичные половые клетки III: 273
– развитие III: **235**, 236
Яйцевод у птиц III: 123, **124**, 125
— человека I: **89**
Яйценосный бугорок (cumulus oophorus) I: 40, 42
Яйцо, *см. также* Половые клетки; Ооциты; Оогенез
– метаболизм и активация I: 63–67
– размеры I: 39
– строение I: 39–42
Якорная клетка у *C. elegans* II: 22, **23**, 130, 132–133
яРНК II: 177–178
– и мРНК II: 178
– контроль развития II: 180–183
– сложность II: 178–180
Ящерицы, зависимая от температуры детерминация пола III: **254**

Оглавление

Часть III. Клеточные взаимодействия в развитии 5

Глава 15. Пространственная упорядоченность клеток: роль клеточной поверхности. *Перевод Д. Г. Полтевой* 5
Введение 5
Дифференциальное сродство клеток 6
Способы клеточной миграции 9
Изменения в строении клеточной поверхности 15
Дополнительные сведения и гипотезы 24
От белка к гену 24
Молекулы клеточной адгезии 25
Морфогенез путем взаимодействия между клеткой и субстратом 34
Контактные модификации и морфогенез . . . 43
Литература 45

Глава 16. Ближние тканевые взаимодействия. Вторичная индукция. *Перевод Д. Г. Полтевой* 51
Введение 51
Инструктивные и разрешающие взаимодействия 51
Каскады межклеточных взаимодействий. Индукция хрусталика 52
Эпителио-мезенхимные взаимодействия . . . 56
Дополнительные сведения и гипотезы 59
Развитие и макроэволюция 59
Природа ближнего взаимодействия при эпителио-мезенхимной индукции 64
Механизм ветвления при формировании паренхиматозных органов 68
Индукция плазматических клеток 70
Дополнительные сведения и гипотезы 73
Поперечные связи и индукция 73
Индукция на уровне одной клетки 76
Индукция конечности у куриного зародыша . . 80
Литература 84

Глава 17. Формирование пространственной организации. *Перевод Д. Г. Полтевой* 88
Введение 88
Градиентная модель позиционной информации 88
Регенерация конечности: модель полярных координат позиционной информации 93
Формирование пространственной организации в ходе развития конечностей: спецификация осей 98
Дополнительные сведения и гипотезы 105
Ретиноевая кислота и формирование пространственной организации 105
Формирование пространственной организации в нервной системе 109
Дополнительные сведения и гипотезы 121
Адреса-маркеры клеточной поверхности и миграция лимфоцитов 121
Дополнительные сведения и гипотезы 124
Морфогенез путем специфической гибели клеток 124
Литература 126

Глава 18. Генетика формирования пространственной организации у дрозофилы. *Перевод А. И. Иванова* 130
Введение 130
Краткий обзор развития дрозофилы 130
Возникновение переднезадней полярности . . . 132
Гены с материнским эффектом 133
Компартментализация в процессе развития насекомых 139
Мутации, нарушающие число сегментов . . . 142
Установление специфичности сегмента: гомеозисные гены 147
Регуляция регуляторов 151
Дополнительные сведения и гипотезы 157
Эволюция на основе гомеозисных генов? . . . 157
Формирование специфического фенотипа клеток: позиционная информация 157
Литература 158

Глава 19. Клеточные взаимодействия на расстоянии. Гормоны как медиаторы развития. *Перевод Д. Г. Полтевой* 161
Введение 161
Метаморфоз. Гормональная реактивация развития 161
Метаморфоз у амфибий 162
Дополнительные сведения и гипотезы 170
Гетерохрония 170
Метаморфоз у насекомых 175
Дополнительные сведения и гипотезы 181
Конец детства; сигнал к началу метаморфоза 181
Множественные гормональные взаимодействия при развитии молочной железы 183
Дополнительные сведения и гипотезы 187
Половое созревание как вариация на тему метаморфоза 187
Литература 189

Глава 20. Рост и онкогенез. *Перевод Д. Г. Полтевой* . . . 192
Математическое описание роста . . . 192
Проблемы роста: физические пределы роста 192
Изометрический рост . . . 194
Аллометрический рост . . . 197
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 200
Эволюция и аллометрия . . . 200
Физиология роста органов . . . 202
Гормоны роста и митоз . . . 202
Факторы, ингибирующие рост . . . 208
Онкогены и клеточный рост . . . 209
Вирусные онкогены . . . 209
Онкогены и клеточный рост . . . 211
Как клеточные онкогены вступают на неверный путь . . . 219
Старение . . . 223
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 227
Механизмы старения . . . 227
Литература . . . 227

Глава 21. Детерминация пола. *Перевод Д. Г. Полтевой* . . . 233
Введение . . . 233
Хромосомная детерминация пола у млекопитающих . . . 233
Контроль детерминации пола у млекопитающих: гены Y-хромосомы . . . 236
Гены Y-хромосомы . . . 236
Контроль детерминации пола у млекопитающих: аутосомные гены . . . 239
Модель первичной детерминации пола у млекопитающих . . . 240
Вторичная детерминация пола . . . 241
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 246
Развитие полового поведения . . . 246
Хромосомная детерминация пола у *Drosophila* 246
Гермафродитизм . . . 251
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 253
Почему существуют самцы . . . 253
Детерминация пола, зависящая от условий обитания . . . 254
Литература . . . 256

Глава 22. Сага о зародышевом пути. *Перевод Д. Г. Полтевой* . . . 259
Введение . . . 259
Образование половых клеток . . . 259
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 263
Адреса-маркеры клеточной поверхности и миграции лимфоцитов . . . 263
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 266
Большой выбор: митоз–мейоз или спермий–яйцо . . . 266
Сперматогенез . . . 269
Оогенез . . . 273
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 288
Поддержание блока мейоза в ооцитах млекопитающих и выход из блока . . . 288
Литература . . . 290

Глава 23. Эмбриологические механизмы эволюционных изменений. *Перевод Н. О. Фоминой* . . . 294
«Единство типа и условий существования» 294
Эволюция раннего развития: E Pluribus unum 296
Морфогенетические механизмы эволюционных изменений . . . 302
Развитие и эволюция в пределах сложившихся планов строения . . . 304
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 309
Эрнст Геккель и биогенетический закон . . . 309
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 319
Передача компетенции путем переноса рецепторов . . . 319
Новый эволюционный синтез . . . 320
Литература . . . 322
Эпилог. Очерк некоторых нерешенных проблем . . . 325
Дополнительные сведения и гипотезы . . . 327
Молекулярная биология и эмбриология . . . 327
Литература к эпиграфам . . . 330
Указатель латинских названий . . . 331
Предметный указатель . . . 333

Учебное издание

Скотт Ф. Гилберт

БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ

В 3-х томах
Том 3

Консультант редакции акад. Т. М. Турпаев
Заведующая редакцией канд. биол. наук М. Д. Гроздова
Ведущий редактор М. Б. Николаева
Редактор Р. Ф. Куликова
Художник А. Е. Волков
Художественные редакторы Н. М. Иванов, Л. М. Аленичева
Технический редактор М. А. Страшнова
Корректор Р. Ф. Куликова

ИБ № 7427

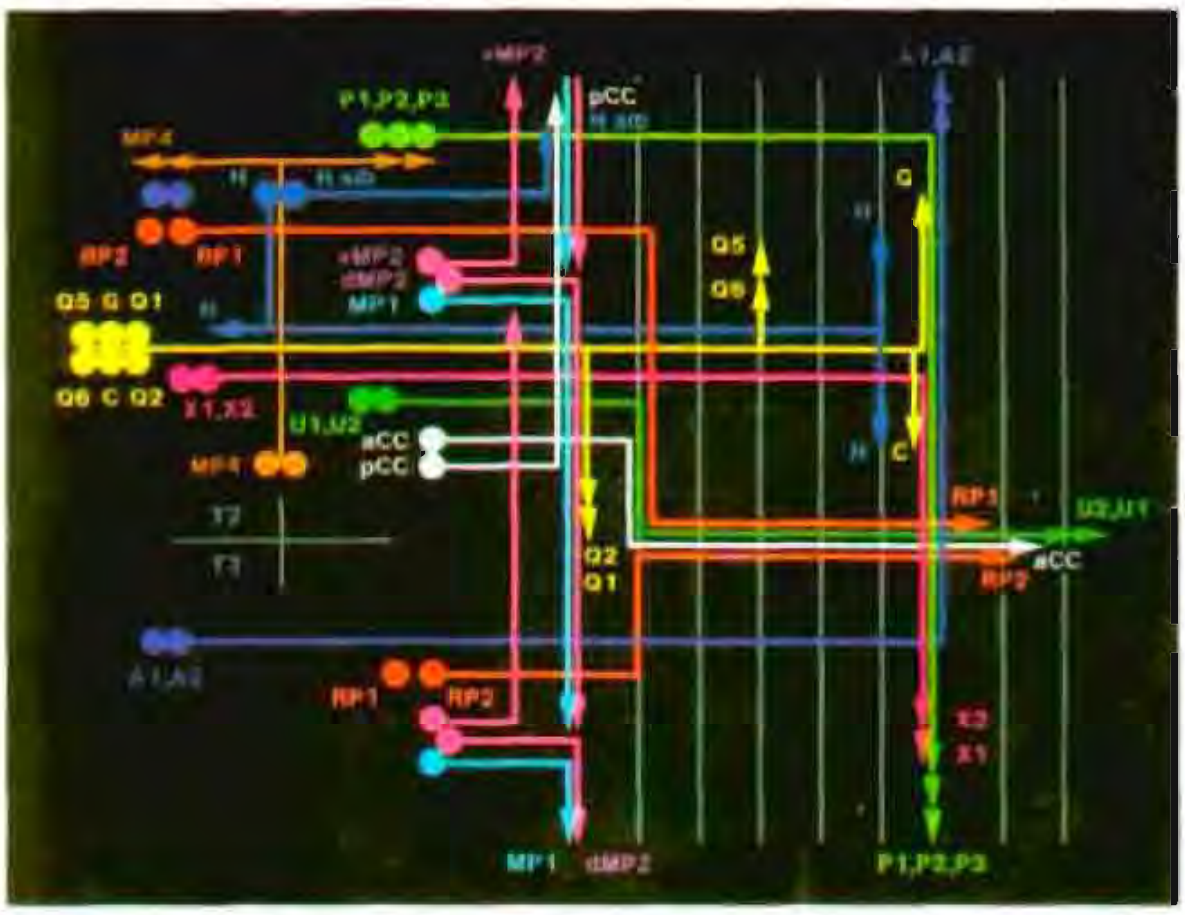
Сдано в набор 7.08.92. Подписано к печати 14.11.95. Формат 84 × 108 1/16. Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 11 бум. л. Усл. печ. л. 36,96. Усл. кр.-отт. 39,48. Уч.-изд. л. 43,08. Изд. № 4/7638. Тираж 5000 экз. Зак. 1926. С 101.

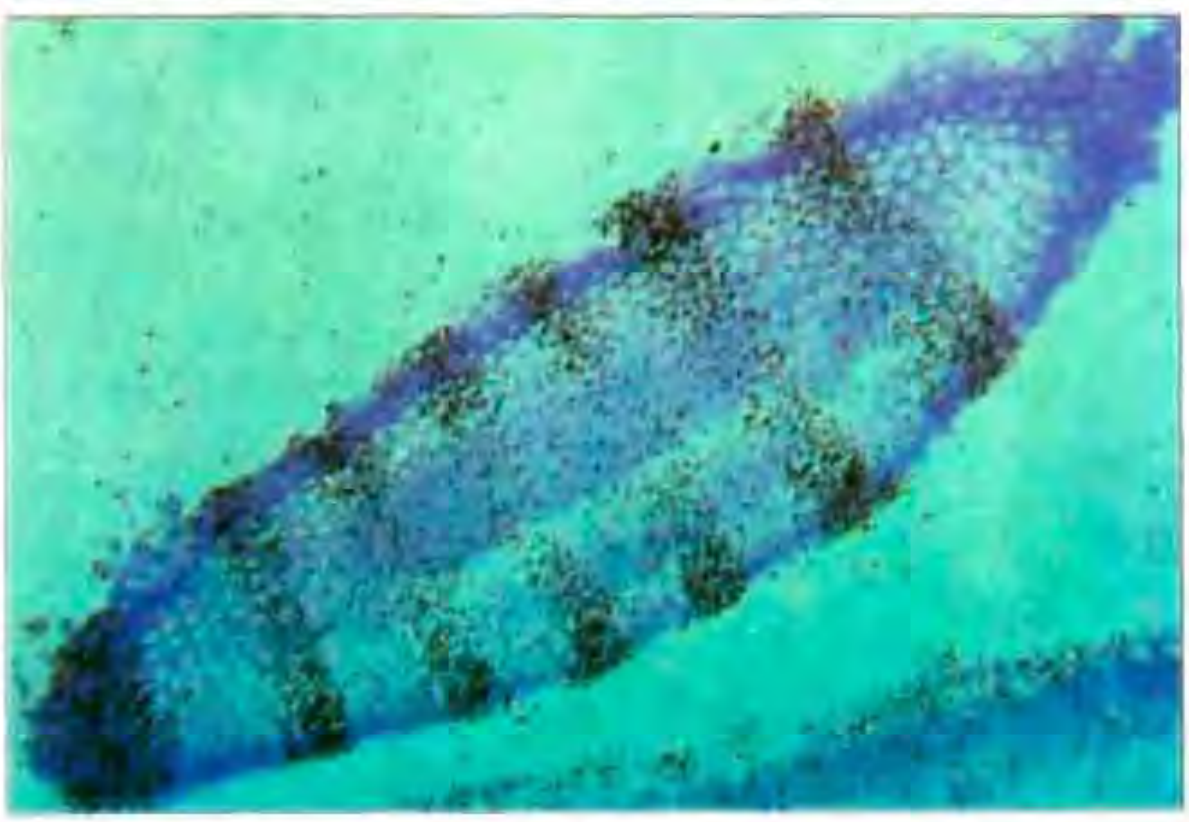
ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» Комитета Российской Федерации по печати
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

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

Пути миграции аксонов у личинки

Нейроны, ведущие свое происхождение от некоего общего предшественника (все они в этой нейронов обозначены каким-либо одним определенным цветом), образуют аксоны, которые проявляют избирательность при миграции с другими аксонами. Аксон Q1, например, движется до тех пор, пока не встретит аксон dMP2; затем их рост продолжается вместе в одном направлении. Аксон же нейрона G продолжает движение по прямой линии, пока не встретится с аксоном P1. Глава 17. (Фотография с любезного разрешения C. Goodman.)





Специфическая транскрипция РНК в различных областях зародыша

Характер транскрипции гена *fushi tarazu* у дрозофилы можно выявить с помощью гибридизации in situ радиоактивной РНК, которая связывается с матрицами, образованными этим геном. Транскрипция данного гена играет решающую роль в становлении правильной сегментации тела мухи. Если этот ген не транскрибируется, то у личинок дрозофилы будут отсутствовать видимые на рисунке семь сегментов. Глава 18. (Фотография с любезного разрешения W. Gehring.)



Ретиноевая кислота и регенерация конечности

Ретиноевая кислота заставляет регенерирующие клетки «забыть» о своем исходном местоположении. Из ткани регенерирующей кисти саламандры обычно формируется только кисть. Однако после обработки ретиноевой кислотой эта ткань (в данном случае она взята у более темноокрашенной саламандры), будучи пересажена на место ампутированной задней конечности, образует заднюю конечность. Глава 17. (Фотография с любезного разрешения K. Crawford.)

Славлю Тебя, потому что я дивно устроен.

Псалом 138

Как новое приходит в мир? Как оно рождается?
Из каких оно создано сплавов, толкований, сочетаний?
Как ему, столь экстремальному и опасному, удается выжить?
На какие компромиссы, какие сделки, какие измены своей
тайной природе оно должно идти,
Чтобы избежать крушения, уничтожения, гильотины?

Салман Рушди (1988)