

К48 **Клетки** / под ред. Б. Льюина и др. ; пер. с англ. —
М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. — 951 с. : цв. ил. —
(Лучший зарубежный учебник).

ISBN 978-5-94774-794-2

Книга охватывает последние достижения в области клеточной биологии. В ней описаны структура, организация, рост клеток, регуляция внутриклеточных процессов, клеточная подвижность, взаимодействие между клетками. Детально рассмотрены эукариотические клетки. Каждая глава написана ведущими учеными-специалистами в этих областях. Бенджамином Льюином и другими редакторами-экспертами тщательно сформирована структура книги, выверена терминология. Важное значение в книге придается обсуждению молекулярных основ заболеваний человека.

Книга является удобным источником информации для студентов, начинающих изучать клеточную биологию, аспирантов, углубленно изучающих цитологию, и исследователей, нуждающихся в современной качественной информации, расширяющей знания в области биологии клетки.

УДК 576.3/.7
ББК 28.05-28.04

По вопросам приобретения обращаться:
«БИНОМ. Лаборатория знаний»
Телефон: (499) 157-5272
e-mail: binom@Lbz.ru, <http://www.Lbz.ru>

Предисловие к русскому изданию

Предлагаемое руководство по строению и функционированию клеток носит общее название «Клетки». Оно рассчитано не только на студентов биологов или медиков и на аспирантов, но также на научных работников, желающих глубже познакомиться с клеточными проблемами. Это издание отличается от ряда других, имеющих похожие названия, таких как «Молекулярная биология клетки» или «Молекулярная клеточная биология», где на первое место (что закономерно и оправданно) ставятся и разбираются основы современной молекулярной биологии, а уже затем эти основы связываются со структурными и функциональными особенностями различных клеток. По объему информации данное издание в целом мало отличается от предшествующих, однако композиция его несколько иная. Весь материал в нем разделен на функциональные группы: в первую вошли мембраны и транспортные механизмы, включающие в себя транспорт ионов и мономеров, а также транспорт белков в процессе их синтеза и секреции и перенос их в различные мембранные компартменты; вторая группа включает информацию о клеточном ядре — его общей структуре и транспорте через ядерную оболочку, а также сведения о молекулярной организации хроматина и хромосом (хотя раздел о принципах строения митотических хромосом сильно сокращен). Далее следует раздел, посвященный цитоскелету, затем идут главы, описывающие митоз, апоптоз и опухолевый рост. Здесь следует особо отметить главу о митозе, написанную К. Ридером, — она представляет собой прекрасный обзор по физиологии митоза. Очень подробно рассматривается регуляция клеточного цикла и принципы клеточной сигнализации. В отличие от

других изданий детально представлены данные о внеклеточном матриксе и клеточной адгезии, отдельно описывается молекулярная клеточная биология прокариотических и растительных клеток.

Книга прекрасно иллюстрирована оригинальными снимками и схемами, дающими большую информацию об излагаемом материале.

Необходимо подчеркнуть, что каждая из представленных глав, а их всего 17, написана ведущим специалистом в своей области, и среди них центральное место занимает Б. Льюин, который возглавляет данное издание.

Еще раз хочется подчеркнуть, что предлагаемое руководство по изучению клеток тесно связано со структурными особенностями клеток, что сближает его с классической цитологией, одновременно значительно наполняя ее современным молекулярно-биологическим содержанием.

При редактировании перевода этой книги основное внимание обращалось на соответствие терминов, используемых в англоязычной научной литературе, отечественным терминам и понятиям. Эта работа была проведена сотрудниками и преподавателями кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова: канд. биол. наук В. В. Бураковым (главы 5, 6, 11–14), канд. биол. наук О. П. Кисуриной (главы 7–10, 16–17), канд. биол. наук Т. В. Липиной (главы 1–4, 15). За помощь в такой важной работе хочется выразить им глубочайшую и искреннюю благодарность.

Д-р биол. наук, профессор Ю. С. Ченцов

Предисловие

Настоящая книга представляет собой новый учебник по биологии клетки, главным образом, предназначенный для студентов старших курсов и аспирантов, приступающих к изучению этой области. Она также является источником информации для тех научных сотрудников, которые хотели бы расширить знания за пределы своей узкой специализации. При написании этой книги мы стремились представить накопленные за десятилетия факты в таком виде, который обеспечил бы студентам приобретение прочных основ знаний в области биологии клетки, не перегружая содержание слишком большим количеством деталей. Ограничившись исключительно областью биологии клетки, коллектив авторов, ведущих редакторов и консультантов включил в учебник все современные исследования в этой области. Это позволило исчерпывающим образом изложить все имеющиеся представления и показать полную картину процессов, происходящих в клетке на молекулярном уровне, при этом не перегружая читателя излишними деталями.


В книге рассматриваются представления о строении, структурной организации, росте, регуляции жизнедеятельности, подвижности и взаимодействии клеток. При этом основное внимание уделяется клеткам эукариотов. Все эти вопросы освещены в 17 главах, объединенных в семь частей. Вначале излагается общее представление о клетке, затем рассматриваются основные ее компоненты и регуляция жизнедеятельности, и, наконец, различные клетки. Отдельные главы посвящены клеткам растений и прокариот. В этих главах подчеркиваются их отличия от клеток животных и в то же время излагаются некоторые общие черты.

Каждая глава написана одним или несколькими авторами — специалистами в соответствующей области. Все материалы прошли рецензирование, при котором в текст были внесены существенные дополнения. Коллектив редакторов книги стремился сохранить стиль и общую идеологию изложения того или иного вопроса, и редактированию подвергся лишь текст и иллюстрации. При редактировании также обращалось внимание на единообразие терминологии и уровень наглядности изложения.

По замыслу издателей, книга предлагается в качестве учебника. Главы состоят из разделов, снаб-

женных подзаголовками, выражающими существо излагаемого вопроса. Основные положения в начале каждого раздела позволяют читателю понять сущность и значение описываемых в дальнейшем представлений. Для пробуждения у студентов интереса к дальнейшим исследованиям в главах есть разделы под названием «Что дальше?». В этих разделах изложены некоторые интересные проблемы, над разрешением которых работают ученые. Для тех, кто интересуется подробностями экспериментов, приведших к концептуальным выводам, в конце главы приводится список основных обзорных статей и экспериментальных работ.

В сотрудничестве с авторами и редакторами работали художники. Они подготовили максимально наглядные иллюстрации с содержательными заголовками и снабженные многочисленными текстовыми пояснениями непосредственно на рисунках. Эти пояснения помогают читателю глубже уяснить сущность изображенных процессов. Большое количество микрофотографий и изображений молекулярных структур помогает учащимся ознакомиться с основными компонентами клетки и лучше понять взаимосвязь между их структурой и функцией. В схематических иллюстрациях по возможности учитывались относительные размеры молекул. По всей книге в иллюстрациях единообразно отображаются цвета и форма молекул, исходя из их атомарного строения.

Книгой можно пользоваться совместно с веб-страницей в Интернете — <http://bioscience.jpupub.com/cells>, которая обеспечивает доступ к дополнительной информации, обозначенной в тексте специальным символом, например **MBIO:1-0001**. На этом веб-сайте учащийся может получить информацию, касающуюся подробностей экспериментов, или доступ к другим литературным источникам, например к книге «Гены» Б. Льюина. Там же можно найти интерактивные материалы, анимации, видео и другие мультимедийные средства, которые способствуют лучшему пониманию динамической природы живой клетки. В книге эти материалы обозначены значком , находящимся слева от подрисовочной подписи. Интерактивные иллюстрации представляют собой мик-

рофотографии с опцией включения и выключения, а также изображения атомарных структур, способных поворачиваться в различных направлениях, что облегчает читателю усвоение основных положений строения клеток и молекул. Наряду с этим, на веб-сайте находится соответствующий биохимический материал, который предназначен для читателей с недостаточной подготовкой в области биохимии или для тех, кто хотел бы обновить свои знания. Там же можно найти слайды всех иллюстраций книги в программе Power Point, все анимации и видеоматериалы, а также большую подборку контрольных тестов и тезисов лекций на соответствующие темы.

Мы выражаем признательность всем исследователям за предоставление микрофотографий и других иллюстраций, а также различным издательствам за разрешение ими воспользоваться. Эта книга состоялась благодаря их помощи. Свою благодарность мы выражаем в подписях к соответствующим рисункам. При отображении атомарных структур, полученных на основании данных, хранящихся в RSCB Protein Data Bank, мы приводим список оригинальных публикаций на отдельной странице.

С благодарностью примем все поправки и замечания, которые можно направлять по адресу info@jbpub.com.

Благодарность

Мы благодарим многих исследователей за конструктивные замечания, которые были высказаны ими в процессе написания данной книги: Кента Матлака, который своим вдумчивым квалифицированным редактированием, с учетом специфики общей структуры книги, завоевал себе репутацию незаменимого члена коллектива; Лесли Ролдан

и Линду Ко Феррино, которые оказали большую помощь при редактировании текста; Рут Роуз, талантливого иллюстратора, благодаря усилиям которой был разработан художественный дизайн книги; и следующих научных консультантов, которые ознакомились с отдельными главами книги и сделали много ценных замечаний:

Стивен Адам	Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, IL
Тобайес Баскин	University of Massachusetts, Amherst
Харрис Бернстайн	National Institutes of Health, Bethesda, MD
Фред Чанг	Columbia University, New York, NY
Луис ДеФелис	Vanderbilt University, Nashville, TN
Паола Депре	Institute of Microbiology–ETH, Zurich, Switzerland
Аршад Десаи	University of California, San Diego
Пол Де Веер	University of Pennsylvania, Philadelphia
Бифф Форбаш	Yale University, New Haven, CT
Джозеф Голл	Carnegie Institution, Baltimore, MD
Эмили Джиллет	Harvard Medical School, Boston, MA
Ребекка Хилд	University of California, Berkeley
Алистер Хедерингтон	Bristol University, United Kingdom
Харалд Херман	German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany
Филип Хиндс	Tufts–New England Medical Center, Boston, MA
Цзе-Юань Су	University of California, San Diego
Мартин Хэмфри	University of Manchester, United Kingdom
Джеймс Кадонага	University of California, San Diego
Рэндолл Кинг	Harvard Medical School, Boston, MA
Роберто Кольдер	Harvard Medical School, Boston, MA
Сьюзен ЛаФлейм	Albany Medical Center, NY
Рудольф Лебе	Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany
Вивек Малхотра	University of California, San Diego

Фрэнк МакКормик	University of California, San Francisco
Акира Нагафуци	Kumamoto University, Japan
Розль Нусс	Stanford University, Palo Alto, CA
Эндрю Осборн	Harvard Medical School, Boston, MA
Эрин О’Шеа	Harvard University, Cambridge, MA
Маркус Питер	University of Chicago, Chicago, IL
Сьюзанне Пфедфер	Stanford University, Stanford, CA
Том Рапопорт	Harvard Medical School, Boston, MA
Ульрих Родек	Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA
Майкл Рот	University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas
Люси Шапиро	Stanford University, Stanford, CA
Томас Шеа	University of Massachusetts, Lowell
Дэвид Сидеровский	University of North Carolina, Chapel Hill
Марк Соломон	Yale University, New Haven, CT
Крис Стайджер	Purdue University, West Lafayette, IN
Маргарет А. Титус	University of Minnesota, Minneapolis
Ливингстон	Albany Medical Center, NY
Ван Де Вотер	
Мигуэль	University of Virginia, Charlottesville
Висент-Манзанарес	
Патрик Вайолле	Case Western Reserve University, Cleveland, OH
Клара Вальчак	Indiana University, Bloomington
Цзанин Юань	Harvard Medical School, Boston, MA
Салли Зигмонд	University of Pennsylvania, Philadelphia

Авторский коллектив

Главные редакторы/Авторы

Бенджамин Льюин основал журнал *Cell* в 1974 г. и до 1999 г. был его главным редактором. Он также является основателем журналов *Neuron*, *Immunity* и *Molecular Cell*. В 2000 г. он основал Виртуальный Текст, который в 2005 г. был приобретен Издательством Джонса и Барлетта. Он является автором монографий *Гены* и *Незаменимые гены*.

Линн Кассимери профессор факультета биологических наук в Университете Лихай в Вифлееме, Пенсильвания. Она исследует вопросы динамики сборки микротрубочек и митоза.

Вишванат Р. Лингаппа старший научный сотрудник Лаборатории биоинформатики СРМС Исследовательского института; главный научный сотрудник Корпорации Просетта и почетный профессор физиологии Калифорнийского университета в Сан-Франциско. Область научных интересов — биогенез белка. Практикующий врач в Госпитале Сан-Франциско, является соавтором учебников по физиологии и патофизиологии.

Джордж Плоппер младший профессор Ренселлеровского политехнического института. Исследует вопросы передачи сигналов и поведение клеток при их связывании с внеклеточным матриксом.

Авторы

Майкл Кэперон младший профессор Отдела молекулярной микробиологии медицинского факультета Вашингтонского университета. Исследования в возглавляемой им лаборатории направлены на изучение комплексных взаимодействий между патогенными грам-положительными бактериями и человеческим организмом при инфекции.

Мэтт Чэпмен помощник профессора в Мичиганском университете. Его лаборатория изучает функции и биогенез амилоидных волокон бактерий.

Мелани Г. Кобб профессор по курсу программ регуляции клеточных функций и биохимии и факультета фармакологии медицинского отделения Юго-западного медицинского центра в Далласе, Техас. Ее группа исследует вопросы регуляции и функций протеинкиназ, в частности MAPK и WNK.

Чарлз Коул профессор биохимии и генетики Медицинской школы в Дартмуте. Область научных интересов: ядерный транспорт, регуляция трансформации и иммортализация клеток, обмена РНК, микроРНК и рак молочной железы.

Энрике М. Де Ла Круз младший профессор молекулярной биофизики и биохимии Иельского университета. В его лаборатории используются биофизические и биохимические методы, позволяющие исследовать меха-

низмы актомиозиновой подвижности. Также проводят исследования двигательных свойства РНК-геликаз.

Джефф Эррингтон директор Института молекулярной и клеточной биологии при Университете Ньюкастла в Соединенном королевстве. Проводит исследования по клеточному циклу и морфогенезу бактерий.

Сьюзен Форсбург профессор молекулярной и математической биологии в университете Южной Калифорнии. В ее лаборатории проводятся исследования по репликации ДНК и динамическому состоянию генома на делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces pombe*.

Кэтлин Гоулд профессор клеточной биологии и биологии развития медицинского факультета Университета Вандербильда и сотрудник медицинского института им. Г. Хьюза. В ее лаборатории исследуются механизмы регуляции цитокинеза.

Дуглас Р. Грин Заведующий отделом иммунологии Детского госпиталя St. Jude в Мемфисе. В лаборатории исследуются процессы апоптоза и другие формы гибели клеток.

Скотт Халтгрэн профессор молекулярной микробиологии медицинского факультета Вашингтонского университета. Основная область научных интересов — исследование основных механизмов патогенеза бактериальных инфекций. Также в лаборатории исследуются амилоидоподобные фибриллы, т. н. «локоны», которые продуцируются *Escherichia coli*.

Биржитт Лейн директор Центра молекулярной медицины в Сингапуре и профессор анатомии и клеточной биологии в Университете Данди Шотландия. Она исследует промежуточные филаменты, в особенности кератины, и роль, которую они играют в патогенезе заболеваний человека.

Стивен Е. Ленарт исследователь и помощник профессора в Центре молекулярной кардиологии факультета физиологии и клеточной биофизики Колумбийского университета. Область основных научных интересов: механизмы мембранного транспорта, контролирующего уровень внутриклеточного кальция в сердечной и скелетных мышцах, и их вклад в патогенез заболеваний.

Клайв Ллойд руководитель исследовательского проекта в Центре Дж. Иннеса в Норвиче, Соединенное Королевство. Исследует роль цитоскелета в росте и развитии растений.

Эндрю Р. Маркс профессор медицины и заведующий кафедрой физиологии и клеточной биофизики Колумбийского университета. Он изучает, каким образом макромолекулярные сигнальные комплексы регулируют функции ионных каналов в мышечной и других тканях. Состоит членом Института медицины Национальной академии наук Американской академии искусств и наук и Национальной академии наук.

Ира Меллман профессор и заведующий кафедрой клеточной биологии медицинского факультета Иельского университета и главный редактор *The Journal of Cell Biology*. В его лаборатории в течение многих лет исследуются фундаментальные аспекты мембранного транспорта путем эндоцитоза, и в особенности его роль в образовании антигенов дендритными клетками.

Е. Майкл Остап младший профессор медицинского факультета Пенсильванского университета и сотрудник Института исследования мышечной деятельности штата Пенсильвания. В его лаборатории исследуется подвижность клеток с помощью биологических, биохимических и биофизических методов. В настоящее время в лаборатории исследуются необычные миозины.

Конли Ридер старший научный сотрудник и руководитель лаборатории клеточной регуляции в Центре Уодсворда. Этот центр функционирует в рамках отдела здравоохранения штата Нью-Йорк. Конли также является профессором факультета биологической медицины Университета штата Нью-Йорк в Олбани. Он более 30 лет изучает вопросы клеточного деления.

Эллиот М. Росс профессор факультета фармакологии Юго-Западного медицинского центра в Далласе, Техас. Участвует в программе исследований по молекулярной биофизике и клеточной регуляции. Его группа исследует процессы обработки информации в сети передачи сигналов с участием G белков.

Том Рутковский стажер медицинского института Г. Хьюза в Медицинском центре Мичиганского университета. Он исследует адаптивный ответ клеток при нарушениях формирования нативных белковых структур, которое происходит в процессе развития организма и при различных патологиях.

Памела Силвер профессор системной биологии медицинского факультета в Гарварде. Область ее научных интересов: ядерный транспорт, структура генома, динамика РНК и синтетическая биология.

Шринивас Венкатрам ассистент профессора биологии в Тихоокеанском университете и бывший стипендиат медицинского института Г. Хьюза в лаборатории Кэтти Гоулд. Область текущих научных интересов: исследование сборки и разборки центров организации микротрубочек и самих микротрубочек в зависимости от стадии клеточного цикла.

Грэм Уоррен профессор клеточной биологии медицинского факультета Иельского университета. В его лаборатории исследуется структура, функции и биогенез аппарата Гольджи.

Роберт А. Вайнберг профессор в Отделе раковых исследований Массачусетского технологического института и член фонда Института биомедицинских исследований Уайтхеда. Его научный интерес лежит в области исследования молекулярных механизмов, контролирующих пролиферацию клеток и рост опухолей.

Принятые сокращения

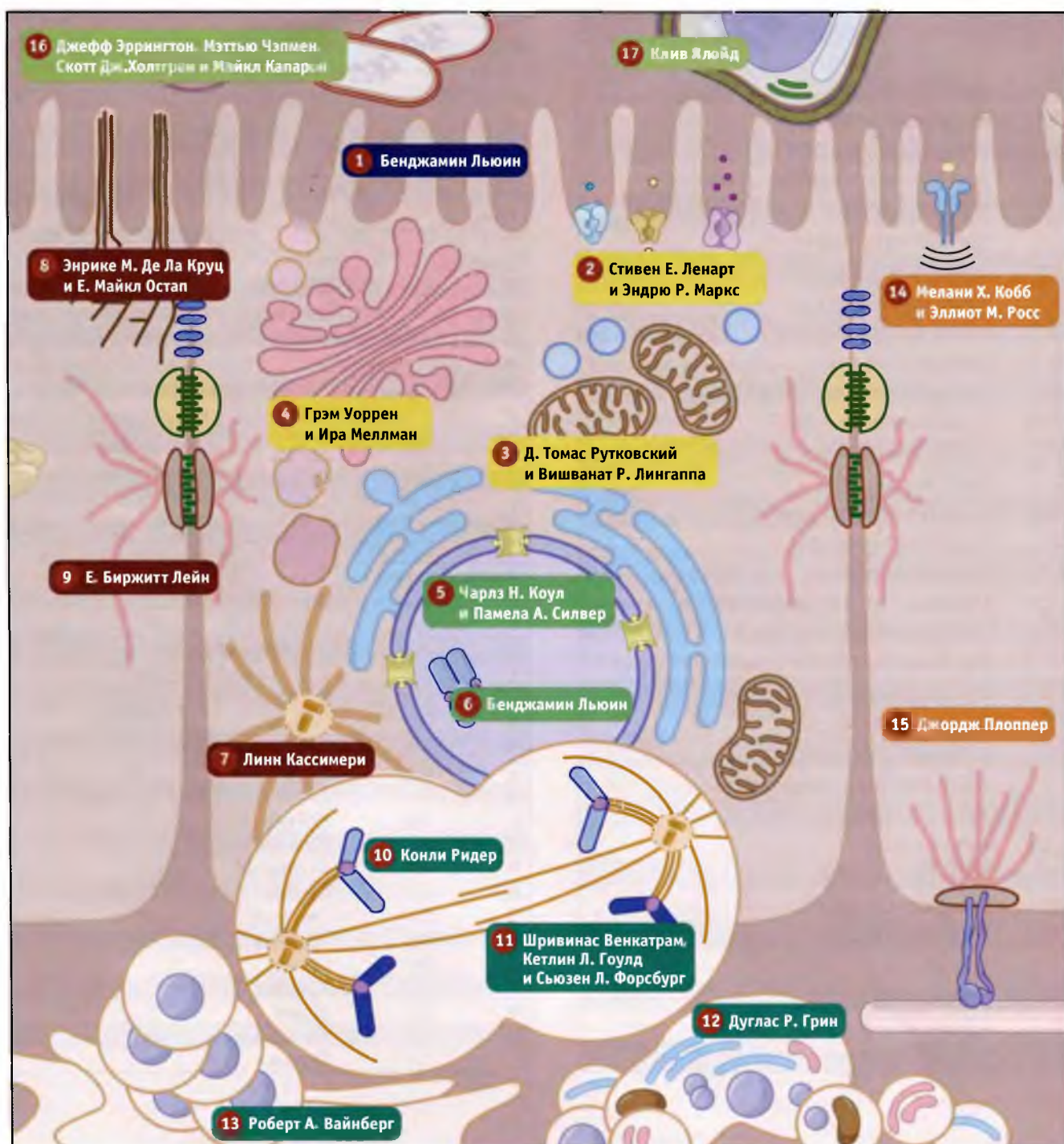
A	Аденин или аденозин
АДФ	Аденозин дифосфат
АМФ	Аденозин мионофосфат
ЦАМФ	Циклический АМФ
АТФ	Аденозин трифосфат
АТФаза	Аденозин трифосфатаза
по.	Пары оснований
Ц	Цитидин или цитозин
кДНК	Комплементарная ДНК
ЦДФ	Цитидин дифосфат
ЦМФ	Цитидин монофосфат
ЦТФ	Цитидин трифосфат
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКаза	Дезоксирибонуклеаза
Г	Гуанин или гуанозин
ГДФ	Гуанозин дифосфат
GlcNAc	N-ацетил-D-глюкозамин
ГМФ	Гуанозин монофосфат
ГТФ	Гуанозин трифосфат
ΔG	Изменение свободной энергии
кб	Килобазы или килобаз пары
Мб	Мегабазы или мегабаз пары
иРНК	Информационная РНК
MW	Молекулярная масса
Pi	Неорганический фосфат
Ppi	Неорганический пирофосфат
РНК	Рибонуклеиновая кислота
РНКаза	Рибонуклеаза
рРНК	Рибосомальная РНК
тРНК	Транспортная РНК
Т	Тимин или тимидин
У	Урацил
УДФ	Уридин дифосфат
УМФ	Уридин монофосфат
УТФ	Уридин трифосфат

Обозначение	Кратность
Мега (М)	10 ⁶
Кило (к)	10 ³
Деци (д)	10 ⁻¹
Сантис (с)	10 ⁻²
Милли (м)	10 ⁻³
Микро (мк)	10 ⁻⁶
Нано (н)	10 ⁻⁹
Пико (п)	10 ⁻¹²

Единицы	
Å	Ангстрем
Д или Да	Дальтон
г	Грам
ч	Час
М	Молярная концентрация
м	Метр
мин	Минута
N	Ньютон
S	Единицы Сведберга
с	Секунда
V	Вольт

Аминокислоты		
A	Ala	Аланин
C	Cys	Цистеин
D	Asp	Аспарагиновая кислота
E	Glu	Глутаминовая кислота
F	Phe	Фенилаланин
G	Gly	Глицин
H	His	Гистидин
I	Ile	Изолейцин
K	Lys	Лизин
L	Leu	Лейцин
M	Met	Метионин
N	Asn	Аспарагин
P	Pro	Пролин
Q	Gln	Глутамин
R	Arg	Аргинин
S	Ser	Серин
T	Thr	Треонин
V	Val	Валин
W	Trp	Триптофан
Y	Tyr	Тирозин

Графическое оглавление



Краткое оглавление

Часть 1. Введение 14

- 1 Что такое клетка? 15
Бенджамин Льюин

Мембраны и механизмы транспорта 44

- 2 Транспорт ионов и небольших молекул через мембраны 45
Стивен Е. Леннарт и Эндрю Р. Маркс
- 3 Мембранное адресование белков 117
Д. Томас Рутковский и Вишванат Р. Лингаппа
- 4 Перемещение белков между мембранами 179
Грэм Уоррен и Ира Меллман

Часть 3. Ядро 236

- 5 Структура ядра и процессы транспорта 237
Чарлз Н. Коул и Памела А. Силвер
- 6 Хроматин и хромосомы 289
Бенджамин Льюин

Часть 4. Цитоскелет 354

- 7 Микротрубочки 355
Линн Кассимери
- 8 Актин 419
Энрике М. Де Ла Круз и Е. Майкл Остап
- 9 Промежуточные филаменты 467
Е. Биржитт Лейн

Часть 5. Деление клеток, апоптоз и рак 498

- 10 Митоз 499
Конли Ридер
- 11 Регуляция клеточного цикла 555
Шринивас Венкатрам, Катлин Л. Гоулд и Сюэзен Л. Форсбург
- 12 Апоптоз 605
Дуглас Р. Грин
- 13 Рак — основные положения и общий обзор 639
Роберт А. Вайнберг

Часть 6. Межклеточные взаимодействия 666

- 14 Принципы функционирования внутриклеточных систем передачи сигнала 667
Мелани Х. Кобб и Эллиот М. Росс
- 15 Внеклеточный матрикс и адгезия клеток 731
Дж. Плоппер

Часть 7. Клетки прокариот и растений 800

- 16 Биология прокариотической клетки 801
Джефф Эррингтон, Мэттью Чэпмен, Скотт Дж. Халтгрэн и Майкл Кэперон
- 17 Биология растительной клетки 867
Клайв Ллойд

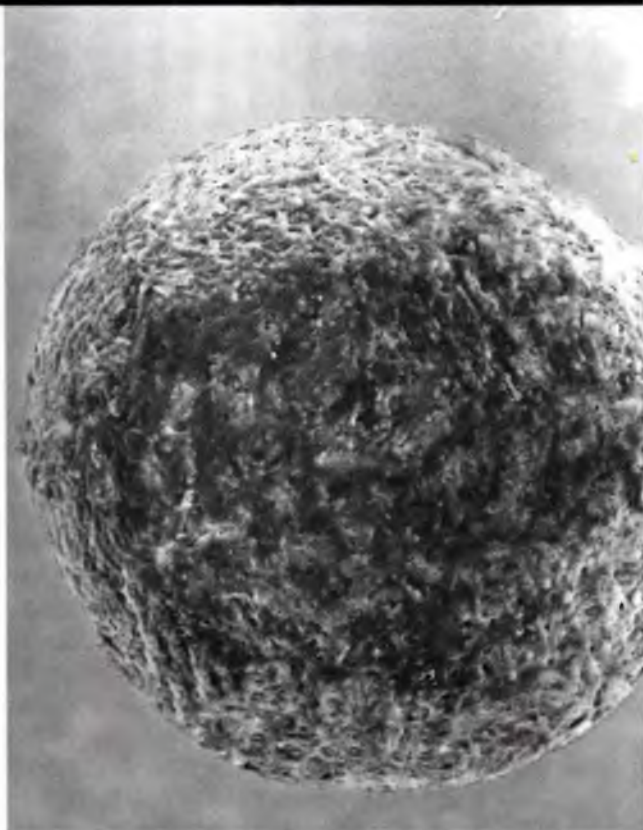
Что такое клетка?

Бенджамин Льюин

Издатель/Редактор Cell Press и Virtual Text

Автор монографии «Гены»

Фотография ооцита (яйцеклетки) человека, полученная с помощью электронного сканирующего микроскопа. Все типы клеток произошли в результате слияния яйцеклетки и сперматозоида. Фотография © Деннис Кункель/ Phototake



КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛАВЫ

- 1.1** Введение
 - 1.2** Жизнь началась с самовоспроизводящейся биологической структуры
 - 1.3** Клетка прокариот представляет собой единый компартмент
 - 1.4** Прокариоты приспособлены к росту в самых различных условиях
 - 1.5** Клетка эукариот содержит множество компартментов, ограниченных мембранами
 - 1.6** Мембраны позволяют поддерживать определенный состав среды в цитоплазматических компартментах
 - 1.7** Ядро содержит генетический материал и окружено оболочкой
 - 1.8** Плазматическая мембрана позволяет клетке поддерживать гомеостаз
 - 1.9** Клетки внутри клеток: органеллы, обладающие оболочкой, могли возникнуть в результате эндосимбиоза
 - 1.10** ДНК является наследственным материалом клетки, однако существуют другие формы передачи наследственной информации
 - 1.11** Клеткам необходимы механизмы репарации повреждений ДНК
 - 1.12** Митохондрии – энергетические фабрики клетки
 - 1.13** Хлоропласты служат источниками энергии в клетках растений
 - 1.14** Органеллам необходим механизм, ответственный за специфическое местоположение белков
 - 1.15** Белки транспортируются к мембранам и проходят через них
 - 1.16** Белки транспортируются через ЭПР и аппарат Гольджи
 - 1.17** Способность к свертыванию и разворачиванию белковых структур является характерной особенностью всех клеток
 - 1.18** Форма эукариотической клетки определяется ее цитоскелетом
 - 1.19** Важным фактором является локализация клеточных структур
 - 1.20** За развитие определенного ответа клетки на внешние сигналы ответственны системы их передачи
 - 1.21** Все организмы состоят из клеток, способных к росту и делению
 - 1.22** В процессе дифференцировки образуются различные специализированные клетки, включая терминально дифференцированные
- Список литературы

1.1 Введение

Основные положения

- Клетка образуется только из предсуществующей клетки
- Каждая клетка несет генетическую информацию, реализация которой позволяет ей производить все необходимые компоненты
- Плазматическая мембрана состоит из липидного бислоя, отделяющего клетку от окружающей среды

В основе всего многообразия живых организмов лежит одна основная структурная единица: клетка. Основное положение биологии, утвердившееся с момента разработки клеточной теории в XIX веке, состоит в том, что каждая клетка образуется в результате деления предсуществующей.

Простейшие представляют собой одноклеточные организмы: их клетка сама по себе является самостоятельной биологической единицей, способной к воспроизведению многих себе подобных копий. Для того чтобы выжить, одноклеточные организмы могут приспосабливаться к самым различным типам окружающей среды, от крайне низких до крайне высоких температур, могут существовать в аэробных или анаэробных условиях, или даже в атмосфере метана. Некоторые из них живут в других организмах.

Клетки также могут образовывать многоклеточные организмы. В этом случае различные клетки специализируются для выполнения различных функций. В многоклеточном организме клетки взаимодействуют друг с другом, тем самым обеспечивая его функционирование как целого. Многоклеточные организмы обладают способностью к размножению, однако их индивидуальные клетки могут проявлять или не проявлять такую способность. Клетки организма, для которых размножение обычно нехарактерно, могут приобрести способность к неограниченному делению, что может послужить причиной развития рака.

Размеры и форма клеток сильно варьируют, что иллюстрирует рис. 1.1. Самые мелкие клетки представлены одноклеточными организмами, которые имеют сферическую форму с диаметром, не превышающим 0,2 мкм. К числу одной из наиболее крупных клеток относится нейрон (нервная клетка) гигантского кальмара, диаметр которого в 5000 раз больше и составляет 1 мм. От тела нейрона отходят отростки (аксоны) диаметром 20 мкм (в 100 раз больше, чем размеры мельчайшей клетки), которые в длину могут достигать 10 см! Клетки человека и других млекопитающих по величине занимают среднее положение, и обычно их диаметр составляет 3–20 мкм.

Клетки могут не очень сильно различаться по форме. Так, клетки сферической формы обычно существуют в жидкой среде. Иногда они могут обладать более определенной формой, как, например, нейрон, с характерными длинными отростками, или клетки эпителия, которые имеют выраженную апикальную и базолатеральную поверхности, выполняющие различные функции. Клетка может свободно существовать в жидкой среде либо быть прикрепленной к поверхности или к другим






Клетки бывают разных размеров и форм.		
Типы клеток		Размер
	Микоплазма	0,2 мкм
	Дрожжи (<i>S.cerevisiae</i>)	6 мкм
	Фибробласт	20 мкм
	Нейрон	20 мкм – 10 см
	Растительная клетка	50 мкм

Рис. 1.1. Клетки сильно различаются по своим размерам и форме. Некоторые клетки обладают сферической формой, другие имеют вытянутые отростки. Остальные по форме занимают промежуточное положение. На фотографиях представлена микоплазма (Тим Питцкер, Ульмский университет), дрожжи (Фред Уинстон, Гарвардская медицинская школа), фибробласт (Цзюнзо Десаки, Медицинская школа Университета Эхиме), нейрон (Джералд Дж. Обермайр Бернгардт Е. Флухер, Медицинский университет Инсбрука), растительная клетка (Мин Х. Чен, Университет в Альберте)

клеткам. Клетки могут взаимодействовать друг с другом или атаковать другие клетки.

Однако, несмотря на столь различные формы клеток, в основе их строения лежат несколько общих принципов.

- Внутреннее содержимое клетки отделено от внешней среды мембраной, которая называется **плазматической мембраной**.
- Плазматическая мембрана содержит системы, контролирующие вход и выход из нее различных метаболитов.
- Необходимые для клетки метаболиты образуются из компонентов пищи при участии внутренних энергетических систем.
- Генетический материал содержит всю информацию, необходимую для образования всех компонентов клетки.
- Генетическая информация реализуется при экспрессии генов.
- Индивидуальные белки кодируются соответствующими генами и после синтеза могут собираться в более крупные структуры.

Клетка ограничена мембраной, состоящей из двойного слоя липидов. На рис. 1.2 представлены свойства липидного бислоя. Он являет собой макромолекулярную структуру, состоящую из липидов. Основное свойство липидов заключается в том, что их молекулы являются амфипатичными, т. е. на одном конце молекулы находится гидрофильная «головка», а на другом гидрофобный «хвост». Каждый из слоев липидного бислоя, с одной стороны, содержит множество гидрофильных головок, а с другой стороны, гидрофобные хвосты. В водном окружении гидрофобные хвосты агрегируют, и, таким образом, гидрофобные поверхности каждого слоя могут соединяться, образуя неионный центр, подобно масляной капле на поверхности воды. С каждой стороны липидного бислоя гидрофильные головки обращены в сторону среды, содержащей ионы. Липидный бислой обладает важным свойством текучести. Это позволяет ему сплавляться с другими мембранами, образовывать новые при разделении, и служить в качестве растворителя для белков, которые присутствуют в бислое и мигрируют в его пределах.

Липидный бислой в определенной степени пропускает молекулы воды, но непроницаем для ионов, мелких заряженных молекул, а также для всех крупных молекул. В результате различного ионного окружения по обеим сторонам мембраны создается осмотическое давление, под действием которого молекулы воды проходят через мембрану и понижают концентрацию ионов с одной или с другой стороны мембраны, в зависимости от их концентрации.

Плазматическая мембрана разграничивает содержимое клетки и внешнюю среду. Для одноклеточных организмов понятие «внешняя среда» означает окружающая среда; для многоклеточных это одновременно окружающая среда и внутреннее окружение, создаваемое другими клетками организма (например, клетками, образующими стенки кровеносных сосудов). Плазматическая мембрана не обладает опорной функцией; фактически она довольно хрупкая и легко повреждается. Поэтому для поддержания целостности клетки обычно плазматическая мембрана должна быть укреплена структурами, которые играют опорную роль и обладают большей эластичностью.

Большинство процессов в клетке катализируются ферментами, константы связывания которых с субстратами и другие свойства определяют допустимый, совместимый с жизнедеятельностью уровень изменений содержания различных метаболитов во внутри- и внеклеточной среде. Однако организмы приспособились к различным условиям существования, и у тех из них, которые существуют в экстремальном окружении, присутствуют ферменты, способные функционировать в таких условиях, которые для более «нормальных» организмов оказались бы летальными.

Для обеспечения правильной работы всех систем, клетке необходимо регулировать свойства своей внутренней среды. Особый контроль необходим за ионным составом и величиной pH. Непроницаемость мембраны



Рис. 1.2 Липидный бислой мембраны состоит, главным образом, из амфипатических фосфолипидов

создает необходимость функционирования в ней специальных систем, обеспечивающих прохождение ионов.

Клетка должна усваивать метаболиты из окружающей среды. В первую очередь это источники энергии (являющиеся субстратами метаболических процессов) и небольшие молекулы, которые служат предшественниками компонентов, в дальнейшем образующих более крупные молекулы и структуры. Жирные кислоты используются для синтеза липидов, аминокислоты для синтеза белков, а из нуклеотидов образуются РНК и ДНК.

Поскольку все клетки должны усваивать метаболиты из окружающей среды, они также должны обладать способностью выводить их. Клетки выводят в окружающую среду различные ионы, небольшие молекулы, и даже белки. Процессы экспорта, и в значительной степени импорта, являются строго специфичными: они должны с высокой селективностью удалять из клетки (или пропускать в нее) необходимые метаболиты.

Для выживания и воспроизводства клетка должна получать источники энергии из окружающей среды и использовать эту энергию для синтеза необходимых компонентов. В качестве источника энергии могут служить вещества, захваченные клеткой из внешней среды. Обычно это смесь простых и сложных соединений углерода. В качестве источника энергии клетка может использовать свет. Способы расходования энергии для разных типов клеток различны.

Поскольку образование новых клеток предполагает деление существующих, клетка должна располагать информацией о воспроизведении всех ее компонентов. Эта информация содержится в универсальном типе генетического материала — ДНК, которая кодирует все белки, содержащиеся в клетке. В свою очередь, белки могут собираться в большие структуры или участвовать в метаболических процессах в качестве катализаторов. Аппарат считывания генетического кода во всех клетках включает одни и те же компоненты. Поскольку клетка постоянно испытывает различные воздействия со стороны окружающей среды, для обеспечения ее су-

Минимально необходимые компоненты клетки	
	Плазматическая мембрана Обособляет клетку от окружающей среды
	Геном Кодирует строение всех структур клетки
	Перенос информации Экспрессия информации, заложенной в генетическом коде
	Использование энергии Утилизация энергии для построения сложных клеточных компонентов

Клетка содержит геном, кодирующий строение всех структур, аппарат для экспрессии генетической информации, систему использования энергии и плазматическую мембрану, контролирующую взаимодействие клетки с окружающей средой

существования необходимы системы репарации повреждений, возникающих в генетическом материале.

Клетки поддерживают свое существование за счет процесса деления. Специальный механизм предназначен для обеспечения способности к делению, при котором образуются две дочерних клетки, каждая из которых идентична родительской по содержанию генетического материала и также содержит примерно половину других структур (за некоторыми исключениями, рассмотренными в 1.22 *В процессе дифференцировки образуются различные специализированные клетки, включая терминально дифференцированные*).

На представлены минимальные условия, необходимые для образования клетки. Резюмируя, мембрана отделяет внутреннее содержимое клетки от окружающей среды, и многие основные пути взаимодействия клеток с окружением определяются ее свойствами. Для формирования клетки необходим источник энергии, которая используется при создании более сложных компонентов из небольших метаболитов. Генетический материал содержит информацию, необходимую для воспроизведения всех характерных особенностей той или иной клетки, и все клетки обладают системами, позволяющими эту информацию использовать.

1.2 Жизнь началась с самовоспроизводящейся биологической структуры

Основное положение

- Первая живая клетка представляла собой самовоспроизводящуюся биологическую структуру, окруженную мембраной

Мы полагаем, что жизнь возникла, когда некая самовоспроизводящаяся структура начала обособливаться от окружающей среды. Это было необходимо как для защиты от возможных непредсказуемых повреждений, так и для предотвращения ее поглощения первичным «питательным бульоном» неопределенного состава. Исследования последних лет позволяют предположить, что первая самовоспроизводящаяся структура могла быть построена из рибонуклеотидов. Таким образом, можно думать, что первый живой биологический объект представлял собой некую примитивную РНК, окруженную защитной мембраной. Назовем этот объект протоплазматический коацерватной каплей.

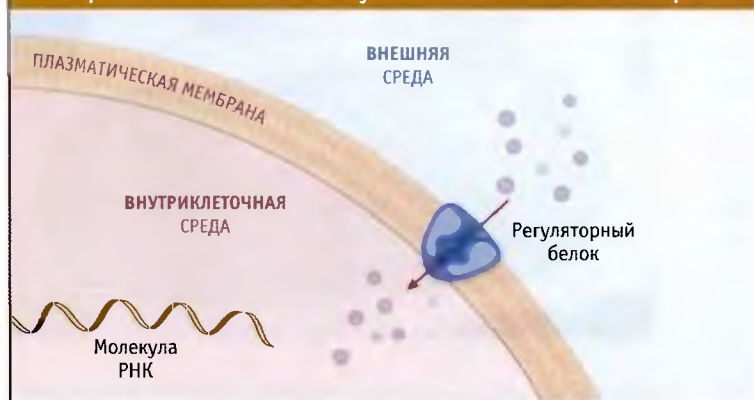
РНК должна была обладать способностью к саморепликации, образуя свою копию из предшественников нуклеотидов. Мы не знаем, могла ли она обладать какой-либо еще каталитической активностью, но наиболее вероятно, что она была способна осуществлять реакции синтеза предшественников, необходимых для репликации.

Некоторые взаимодействия между самовоспроизводящейся структурой и окружающей мембраной происходили уже на ранних этапах существования коацерватной капли. Так, способность РНК стимулировать рост мембраны облегчила образование клетки. В последних исследованиях выяснен возможный механизм этой стимуляции. Когда РНК окружена липидным слоем, то в результате существования в ее молекуле заряженных участков создается осмотическое давление. Это приводит к возникновению напряжений в мембране, которые снимаются при увеличении ее поверхности, за счет образования новых участков из липидов. Такое физическое взаимодействие между нуклеиновой кислотой и мембраной, возможно, осуществлялось на начальном этапе объединения коацерватных капель.

Непроницаемость мембран для водных растворов является их фундаментальным биологическим свойством.



Самая первая самовоспроизводящаяся структура обладала саморегулирующейся РНК, окруженной мембраной



твом. В то же время в коацерватной капле должен был происходить обмен между содержимым и окружающей средой, так как в противном случае она быстро бы исчерпала внутренние ресурсы. Вероятно, какая-то часть веществ из внешней среды попадала в каплю через случайные отверстия, образующиеся в мембране, которые, однако, снижали ее прочность. Такая первичная «мембрана» обеспечивала сегрегацию самовоспроизводящейся структуры от окружающей среды (РНК-мембрана). Вероятно, это был единственный способ отделить внутреннее содержимое коацерватной капли от первичного «питательного бульона».

Переход от такого неконтролируемого обмена между внутренней и окружающей средами к способности поддерживать определенный состав содержимого стал важнейшим этапом на пути превращения протоплазматической коацерватной капли в некую первичную клетку (РНК-мембрана). Этот этап завершился развитием в мембране первой из важных систем, которая обеспечила проникновение в клетку компонентов внешней среды и выведение из нее продуктов жизнедеятельности.

Что еще необходимо для того, чтобы назвать подобную биологическую структуру клеткой? Самовоспроизводящаяся структура должна обладать не только функцией воспроизводства, но и способностью прямым или косвенным образом определять свойства внешней среды, включая окружающую мембрану. Должны также существовать метаболические системы, необходимые для превращения питательных веществ, поступающих из внешней среды, в молекулы, необходимые клетке для построения внутренних структур. Также необходима система реализации энергии и создания ее запасов в форме, позволяющей клетке воспользоваться ими для осуществления энергопотребляющих процессов.

В современной клетке наследственный материал не только является самовоспроизводящимся, но и заключает в себе функцию кодирования. Существует специальная система репликации и экспрессии ДНК. Белки превосходят РНК по большей каталитической активности и по разнообразию форм. Сейчас мы достаточно

легко можем понять, как произошла эволюция генетического материала от самовоспроизводящейся РНК к ДНК, которая способна как реплицироваться, так и транскрибироваться в РНК. Однако совсем не просто представить себе, каким образом генетический код стал отражать последовательность аминокислот в белках. В то же время, поскольку генетический код универсален, мы знаем, что такая система передачи генетической информации должна была возникнуть на самых ранних этапах эволюции. Таким образом, генетическим материалом клетки является ДНК, а РНК участвует в экспрессии генов, выполняя три разные роли: функционируя как переносчик информации и средство транспорта, а также служа основным компонентом структуры рибосом, в которых происходит синтез белков.

1.3 Клетка прокариот представляет собой единый компартмент

Основные положения

- В прокариотической клетке плазматическая мембрана окружает один компартмент
- Во всем компартменте присутствует одинаковая водная среда
- В клетке генетический материал занимает компактную область
- Бактерии и археи относятся к прокариотам, однако различаются по своим структурным особенностям

В соответствии с внутренней компартиментализацией, все клетки подразделяются на два основных типа. В данном случае термин «компаратмент» используется для обозначения внутриклеточного объема, ограниченно-го мембраной:

- Клетки **прокариот**, обладающие одним компартментом, который содержит генетический материал, аппарат генной экспрессии, и продукты этой экспрессии. Компартмент ограничен мембраной, и в его пределах нет других компартментов.

• Клетки **эукариот**, содержащие, по крайней мере, два компартмента; клетка ограничена окружающей ее плазматической мембраной; однако внутри клетки находится второй компартмент, который содержит генетический материал.

Прокариоты подразделяются на два царства. Раньше считали, что все прокариоты представлены **бактериями**, но сейчас часть их мы причисляем к **археям**. Как бактерии, так и археи существуют в форме только одноклеточных организмов (хотя некоторые бактерии в популяции проявляют способность к агрегации). Область, ограниченная плазматической мембраной, называется **цитоплазмой**. У прокариот мембрана окружена **клеточной стенкой**, жесткая структура которой обеспечивает защиту клетки от физических воздействий внешней среды.

На **Рис. 1.6** показано, что в компартменте бактериальной клетки генетический материал расположен компактно, однако не отделен мембраной от содержимого цитоплазмы. К простейшим формам бактерий относится микоплазма, которая, однако, не способна к самостоятельному существованию, поскольку не может производить многие из жизненно необходимых продуктов. Поэтому микоплазма существует внутри других организмов, в которых эти продукты образуются. В геноме микоплазмы содержится всего лишь около 500 генов, которые кодируют лишь минимальное количество продуктов, необходимых для построения клетки. Геном свободноживущих бактерий содержит более 1500 генов и кодирует синтез ферментов метаболизма, необходимых для превращения небольших молекул, а также обеспечивает функционирование более сложного аппарата регуляции экспрессии генов (см. **MBIO:1-0001**).

Бактерии подразделяются на две группы, дивергенция между которыми произошла, вероятно, около двух миллиардов лет назад. Эти группы называются грамположительные и грамотрицательные, в зависимости от того, приобретают ли клетки окраску при прокрашивании по Граму. К числу наиболее полно охарактеризованных грамотрицательных бактерий относится *Escherichia coli*, а из грамположительных бактерий наиболее изучена *Bacillus subtilis*. Окраска развивается при взаимодействии красителя с клеточной стенкой. У грамположительных бактерий клеточная стенка окружает плазматическую мембрану, и краситель непосредственно взаимодействует с компонентами стенки. У грамотрицательных бактерий существует вторая мембрана, окружающая клеточную стенку. Наличие этой мембраны и различия в составе клеточной стенки препятствуют развитию окраски. Область, находящаяся между наружной и внутренней мембранами, называется периплазматическим пространством. В этом пространстве находятся специфические белки и другие компоненты. Если за критерий компартмента принимать область, ограниченную мембранами, то можно считать, что грамотрицательные бактерии имеют два компартмента. Однако периплазматическое пространство следует рассматривать как компартмент лишь в аспекте взаимодействия между клеткой



Рис. 1.6. У бактерий существует один компартмент, хотя внутренние области могут отличаться друг от друга. С разрешения Джона-тана Кинга, Массачусетский технологический институт

и окружающей средой. Это никак не сказывается на основополагающем факте, что синтетическая активность бактериальной клетки сосредоточена в том же компартменте, где находится генетический материал.

Цитоплазма бактериальной клетки представляет собой единую водную среду. Это означает, что все ферменты находятся в условиях одинакового ионного состава. Однако бактерии совсем не являются «мешками с ферментами», и в настоящее время очевидно, что многие белки позиционированы в клетке на определенных местах или на определенных структурах. Некоторые бактерии могут развиваться, давая начало определенному типу специализированных клеток, что напоминает процесс развития у высших организмов.

Известно много различных видов бактерий, которые возникли на ранних этапах эволюции. Установить их филогенетические взаимоотношения достаточно сложно, поскольку, в отличие от эукариот, ископаемых остатков не сохранилось. Однако современные молекулярные методы, основанные на секвенировании рибосомальных РНК, и недавно разработанные приемы полного секвенирования генома привели к революционным выводам относительно происхождения прокариот. Как отдельное царство прокариот были идентифицированы археи (**Рис. 1.7**).

По виду и строению археи напоминают бактерии: они характеризуются небольшими размерами и представляют собой одноклеточные организмы. Обычно они существуют в экстремальных условиях (например, при высоких температурах), и раньше их ошибочно принимали за бактерии, которые приспособились к таким условиям существования. Как и клетки бактерий, археи представляют собой клетки с одним компартментом и не имеют внутренних мембран. У них могут проявляться такие же морфологические признаки, как у бактерий, например наличие жесткой стенки или капсулы, окружающей плазматическую мембрану, а также жгутиков, направленных в окружающую среду. Основные отличия наблюдаются на молекулярном уровне, и компоненты клетки археев отличаются от таковых у бактерий. Аппарат, осуществляющий



Данные филогенетического анализа с использованием современных молекулярных методов позволяют считать, что организмы можно подразделить на три царства

экспрессию генов у археев, больше напоминает аналогичный аппарат клеток эукариот, чем клеток бактерий. Клеточная стенка у них построена из субъединиц, отличающихся от субъединиц клеточной стенки бактерий или растений. Существуют отличия в составе мембранных липидов. По генетической сложности археи больше напоминают свободно-живущих бактерий.

(Более подробно о вопросах организации прокариотической клетки см. 16 Биология прокариотической клетки.)

1.4 Прокариоты приспособлены к росту в самых различных условиях

Основное положение

- Прокариоты приспособились к различным экстремальным условиям существования, и у них закрепились те изменения, которые приводят к образованию жизнеспособной клетки

Прокариоты обитают в самом разнообразном окружении, и многие виды заняли свои экологические ниши, в том числе с такими условиями окружающей среды, которые существенно расширили пределы обитания живых организмов. По способности к росту при различных температурах прокариоты можно подразделить на три группы:

- Большинство из известных клеток прокариот относятся к мезофилам, и лучше всего растут при температурах между 25 и 40 °C. Эта группа наиболее всесторонне изучена, поскольку к ней относятся патогенные бактерии человека.
- Психрофильные бактерии лучше растут при температурах между 15 и 20 °C, однако известны виды, существующие при 0 °C. Они обитают в холодных водах и в почве.

- Термофильные организмы растут при температурах между 50 и 60 °C, однако некоторые виды переносят температуру до 110 °C.

Прокариоты также подразделяются по своей способности расти в условиях различной кислотности или щелочности среды. Многие микроорганизмы могут выдерживать большие колебания значений pH. Ацидофильные бактерии лучше растут при pH ниже 5,4. Некоторые из бактерий, обитающих в почве, относятся к числу организмов, наиболее толерантных к щелочной среде. Иногда они растут при pH 12. Эти прокариоты поддерживают в клетке pH порядка 7 и защищены от внешних воздействий клеточной стенкой.

Вы можете считать, что для жизнедеятельности всех клеток необходим кислород. Кислород играет роль акцептора электронов в дыхании. Однако не все организмы нуждаются в кислороде для осуществления дыхания, и некоторые получают энергию за счет процесса ферментации, а не дыхания. Это позволяет им существовать в анаэробных условиях (в отсутствие кислорода). Некоторые одноклеточные эукариоты, например дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, могут существовать и в аэробных, и в анаэробных условиях.

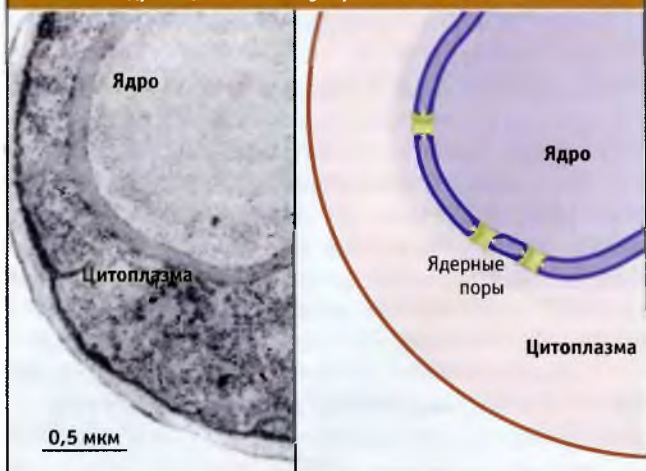
Способность к существованию в экстремальных условиях является свойством, присущим отдельным типам клеток, что значительно расширяет пределы определения понятия клетки, применительно к ее взаимоотношению с окружающей средой. Однако, с молекулярной точки зрения, все клетки имеют одинаковый состав, и их индивидуальные компоненты, например белки и липиды, приспособлены к обеспечению выживаемости в особых условиях. Например, ферменты, продуцируемые психрофилами, лучше адаптированы к функционированию при низких температурах, а ферменты термофилов устойчивы к высоким температурам (что делает их ценным инструментом в некоторых областях биотехнологии).

1.5 Клетка эукариот содержит множество компартментов, ограниченных мембранами

Основные положения

- В эукариотической клетке плазматическая мембрана окружает цитоплазму
- В цитоплазме расположены индивидуальные компартменты, каждый окружен мембраной
- Наиболее крупным компартментом обычно является ядро, содержащее генетический материал

С появлением эукариот строение клетки сильно усложнилось. У эукариотической клетки внутренняя среда не существует в гомогенном состоянии, а разделена на компартменты, каждый из которых окружен мембраной. Рис. 1.8 иллюстрирует, что внутреннее пространство клетки эукариот разделено на два основных компартмента: цитоплазму и **ядро**. Внутриклеточные



характерна высокая концентрация макромолекул. В современной клетке значительно усилены все характерные черты, свойственные примитивной клетке, и она не только сегрегирует макромолекулы от окружающей среды, но и концентрирует их. Концентрация ДНК в ядре соответствует вязкому гелю. В других компартментах находятся белки в высокой концентрации. Такой характер организации клетки свидетельствует о чрезвычайно важной роли локализации компонентов в ее жизнедеятельности.

1.6 Мембраны позволяют поддерживать определенный состав среды в цитоплазматических компартментах

Основное положение

- Органеллы, окруженные мембраной, поддерживают необходимый состав внутренней среды, который отличается от состава окружающего цитозоля

Рис. Эукариотическая клетка содержит ядро и цитоплазму. Для транспорта молекул между двумя компартментами служат поры в ядерной оболочке. Из *The Journal of Cell Biology* 1988, vol. 107, pp. 101–114, с разрешения The Rockefeller University Press

компартменты, ограниченные мембраной, обычно называются **органеллы**. Чаще всего наиболее заметной органеллой является ядро. Остальную часть содержимого клетки обычно называют цитоплазмой, подразумеваемая под этим термином внутриклеточный объем, заключенный между ядром и плазматической мембраной (т. е. все, за исключением ядра).

Макромолекулы поступают в ядро и выходят из него через поры, которые представляют собой белковые каналы, расположенные в его оболочке. Поры настолько велики, что через них свободно проходят мелкие молекулы. Поэтому водная среда в ядре и цитоплазме одинакова.

В ядре содержится генетический материал. Степень сложности генетического аппарата эукариот сильно варьирует. Геном наиболее простых одноклеточных организмов содержит примерно 5000 генов. Наряду с функциями, свойственными геному прокариот, эукариотической клетке необходима информация о всех дополнительных структурных элементах и системах, ответственных за локализацию белков в индивидуальных компартментах, а также о более сложных системах регуляции экспрессии генов, которые учитывают сегрегацию ДНК в клеточном ядре (см. **МВТО:1–0002**).

Разнообразие эукариот охватывает организмы от одноклеточных, существование которых напоминает свободно растущие бактерии, до сложных многоклеточных, состоящих из многих различных типов клеток. В процессе эволюции эукариоты возникли в виде одноклеточных организмов, и большинство их характерных свойств сформировались до момента развития в многоклеточные организмы. Это объясняет наличие общих консервативных признаков у клеток грибов, растений и животных.

Важный момент, который следует запомнить, заключается в том, что для всех компартментов клетки

Наряду с ядром, в цитоплазме эукариотической клетки содержатся другие мембранно-связанные органеллы. Иногда для описания водного окружения компартментов в цитоплазме используют термин **цитозоль**. Цитозоль можно рассматривать как единый компартмент, ограниченный плазматической мембраной и находящийся в контакте с наружной поверхностью мембран всех внутриклеточных органелл. Это специфический компартмент, одной из основных функций которого является синтез белков как для собственных нужд, так и предназначенных для импорта в органеллы.

Находящиеся в клетке мембраны построены так же, как и окружающая клетку плазматическая мембрана, т. е. имеют структуру липидного бислоя. Для каждой мембраны индивидуальные липиды могут различаться, однако их общие свойства остаются одинаковыми. Так же как непроницаемая плазматическая мембрана отделяет внутреннюю часть клетки от внешней среды, непроницаемая мембрана органелл отделяет их внутреннее содержимое от окружающего цитозоля. Свободного обмена ионами через мембраны не происходит. Это важнейшее свойство мембран, благодаря которому внутри органелл создается специфическая среда. (Ядро составляет исключение, поскольку в его оболочке имеются поры.)

Транспорт небольших молекул и макромолекул через мембраны компартментов контролируется белками, интегрированными в мембрану (подобно тому, как белковые комплексы плазматической мембраны контролируют импорт в клетку веществ и экспорт из нее). Внутренняя полость независимого компартмента называется



В цитоплазме эукариотической клетки содержится несколько компартментов, ограниченных мембранами

люмен. Состав водной среды люмена может отличаться от состава окружающей цитоплазмы.

В люмене каждой органеллы происходят специфические процессы. Для их протекания необходимы специальные белки, находящиеся в органелле. За исключением митохондрий и протопластов (которые синтезируют часть собственных белков), органеллы не образуют белки, и поэтому они импортируют их из цитозоля, где происходит синтез белка.



На представлена локализация наиболее типичных органелл в цитоплазме эукариотической клетки. Состав среды в люмене каждой органеллы соответствует функции, которую она выполняет.

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) представляет собой разветвленную сеть внутренних мембран, которая связана с наружной мембраной ядерной оболочки. В люмене ЭПР поддерживается окислительная

среда (такая же, как существует вне клетки). Это важно для осуществления одной из его функций: укладки белков и сборки мультибелковых комплексов.

В типичной эукариотической клетке компартменты, ограниченные мембранами, связаны между собой и взаимодействуют друг с другом за счет разделения и слияния своих мембран. Эндоплазматический ретикулум, **аппарат Гольджи** (представляющий собой набор «стопок» плоских дисков, окруженных мембраной) и **транс-Гольджи** сеть представляют собой основные компоненты **секреторного аппарата**: их мембраны участвуют в отпочковывании и слиянии секреторных везикул, при этом содержимое везикул и мембранные белки транспортируются из компартмента в компартмент. Секреторные везикулы отпочковываются от **транс-Гольджи** сети и сливаются с плазматической мембраной. В ЭПР и аппарате Гольджи происходит ковалентная модифика-

В клеточных компартментах различная концентрация ионов Ca^{2+}

ОРГАНЕЛЛА	$[\text{Ca}^{2+}]$
 <p>МИТОХОНДРИИ: Межмембранное пространство</p>	Высокая ($\sim 10^{-3}$ М)
ЦИТОЗОЛЬ	Низкая ($\sim 10^{-8} - 10^{-7}$ М)
 <p>ЯДРО: Люмен ядерной оболочки ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ</p>	Высокая ($\sim 10^{-3}$ М)

В компартментах эукариотической клетки среда имеет различный ионный состав

Значения pH клеточных компартментов варьируют		
ОРГАНЕЛЛА		pH
 Ранние эндосомы		6,5–6,8
 Поздние эндосомы		5,0–6,0
 Лизосомы		4,5
 транс-Гольджи сеть		6,5–6,7
 Митохондрии	Матрикс	8
	Межмембранное пространство	7
Цитозоль		7,4
Ядро/ЭПР		7,4

Рис. 1.12. Значения внутриклеточного pH. Видно, что различные органеллы характеризуются различными значениями pH

ция белков, включая добавление к ним остатков небольших сахаров. К числу других органелл, составляющих часть транспортной сети, относятся также эндосомы и лизосомы, в которых происходит деградация белков.

Митохондрии (обнаруженные во всех клетках эукариот) и хлоропласты (присутствующие в клетках растений) участвуют в энергетических процессах. В митохондриях происходят основные реакции, посредством которых в клетке запасается промежуточный макроэргический метаболит, АТФ. В хлоропластах происходят процессы фотосинтеза из углекислого газа и воды, позволяющие зеленым растениям синтезировать небольшие углеводсодержащие молекулы, которые они используют в качестве питательных соединений. Наличие хлоропластов служит одним из основных признаков отличия клеток царства растений от клеток представителей царства животных, а также других царств.

Обычно концентрация ионов или небольших молекул в каждом цитоплазматическом компартменте различна (рис. 1.12). Наиболее сильные отличия касаются эндоплазматического ретикула, для которого характерна очень высокая концентрация ионов кальция. Величина pH внутри лизосом и эндосом существенно ниже, чем в цитозоле. Эндосомы подразделяются на две большие группы: для группы ранних эндосом величина pH находится в пределах 6,5–6,8, а в поздних достигает 4,5. Напротив, величина pH матрикса митохондрий выше, чем в цитозоле (рис. 1.12).

(Более подробно об органеллах и секреции белков см. 3 Мембранное адресование белков и 4 Перемещение белков между мембранами.)

1.7 Ядро содержит генетический материал и окружено оболочкой

Основные положения

- Ядро является самой крупной клеточной органеллой и ограничено оболочкой, состоящей из двух мембран
- Часть ядра занимает генетический материал
- Ядерные поры служат средством транспорта больших молекул через ядерную оболочку, обеспечивая вход их в ядро и выход из него

Как показано на рис. 1.13, ядро обычно представляет собой самый крупный видимый компартмент эукариотической клетки, содержит почти весь ее генетический материал (фактически весь, за исключением небольшого числа генов, присутствующих в митохондриях и хлоропластах). Размеры ядра зависят от количества содержащейся в нем ДНК. Поэтому занимаемый им объем широко варьирует; обычно для клеток дрожжей он составляет 1–2% от всего объема клетки, а для большинства соматических клеток животных около 10% (см. 5.2 В зависимости от типа организма и клеток ядро выглядит по-разному). Генетический материал образует массу, называемую **хроматин**, который занимает часть ядра.

Ядро окружено **оболочкой**, которая состоит из двух концентрически расположенных мембран, наружной и внутренней (рис. 1.13) (см. 5.6 Ядро окружено ядерной оболочкой). Между двумя мембранами находится люмен. Внешняя мембрана оболочки ядра переходит в мембрану ЭПР, а люмен оболочки сливается с люменом ЭПР. Внутренняя ядерная мембрана обычно поддерживается сетью филаментов, которая называется ядерная ламина.



Рис. 1.13. Хотя часть клетки, которую занимает ядро, для разных клеток различна, в эукариотической клетке обычно оно представляет собой наиболее заметный внутриклеточный компартмент. Из The Journal of Cell Biology 1988, vol. 107, pp. 101–114, с разрешения The Rockefeller University Press



Ядро окружено оболочкой, состоящей из наружной и внутренней мембран. Мембраны разделены люменом, переходящим в люмен эндоплазматического ретикулума. С разрешения Терри Аллена, Патерсоновский Институт исследования рака

Эта сеть находится внутри ядра и закорена во внутреннюю мембрану.

Поскольку небольшие молекулы свободно перемещаются между цитозолем и ядром, то водная среда в компартментах имеет одинаковый состав. Однако вещества с молекулярной массой, превышающей примерно 40 000 Д (что соответствует небольшим белкам), могут поступать в ядро и выходить из него только при участии системы транспорта через комплексы ядерных пор, которые закреплены в оболочке ядра. Поры ядерной оболочки наиболее заметны при исследовании ядра в электронном микроскопе (см. 5.9 Ядерные поровые комплексы представляют собой симметричные каналы). Каждый комплекс имеет центральный канал, через который осуществляется импорт и экспорт молекул, по размерам превышающим предел, при котором возможна их свободная диффузия. Эти каналы обеспечивают различное содержание белков и других больших молекул в ядре и цитоплазме клетки.

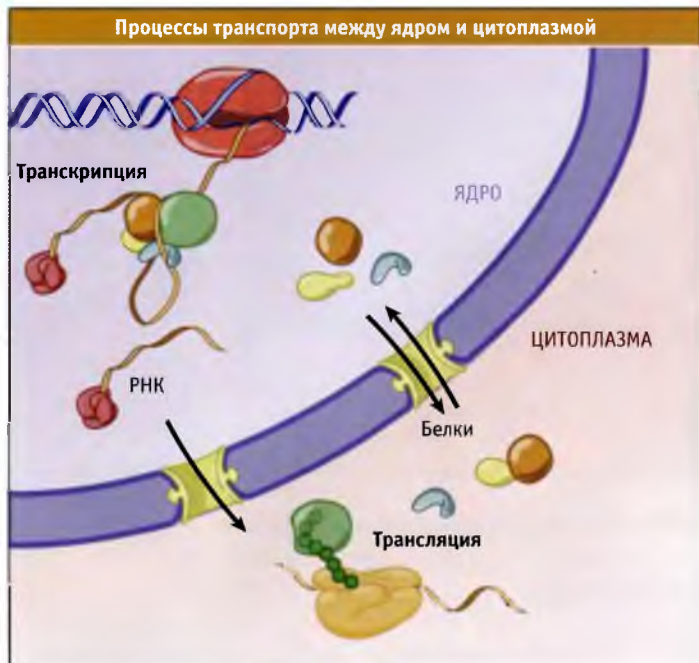
В ядре находятся более мелкие компартменты, которые обладают специальными функциями, хотя они и не ограничены мембранами (см. 5.4 Ядро содержит субкомпартменты, которые не окружены мембраной). Основным субкомпартментом в ядре является ядрышко, видимое в световом микроскопе. В ядрышке происходит синтез рибосомальных РНК и сборка субъединиц рибосом.

Зачем клеткам эукариот нужно ядро? Ядро защищает ДНК и обеспечивает клетке возможность сконцентрировать регуляторные белки и ферменты репарации в одном месте. Геном человека в 750 раз превышает геном *E. coli*, и, таким образом, каждая определенная последовательность ДНК занимает, соответственно, меньшую часть генома. Различные регуляторные белки должны присутствовать в больших концентрациях для того, чтобы они могли

найти свои мишени. Это облегчается тем, что структура-мишень (например, геном) и регуляторные белки сосредоточены в небольшой части клетки (например, в ядре). Ядро также обеспечивает большую степень защиты генома от случайных повреждающих воздействий.

Наличие в клетке ядра имеет важные последствия. На рис. 1.14 показано, что транспорт макромолекул между ядром и цитоплазмой носит двухсторонний характер. Все необходимые ядру белки (включая белки репликации и транскрипции) должны поступать из цитоплазмы. В то же время иРНК транскрибируются в ядре, но должны выходить в цитоплазму, где происходит синтез белка. Эта картина полностью отлична от характерной для клеток прокариот, у которых процессы транскрипции и трансляции сопряжены друг с другом, т. е. происходят в одно время и в одном месте. Регуляция транспорта молекул в ядро и их выхода из него представляет собой один из важнейших регуляторных механизмов.

Обычно клетка эукариот содержит одно ядро. Однако в некоторых исключительных случаях образуются клетки, содержащие много ядер. Это особенно характерно на ранних этапах развития насекомых, например дрозофилы. В этом случае происходит большое количество делений ядра, не сопровождающихся клеточным делением, и образуется **синцитий**, содержащий сотни ядер, находящихся в общей цитоплазме. Другой пример образования синцития – слияние мышечных клеток млекопитающих. В качестве иллюстрации другого крайнего случая назовем некоторые дифференцированные клетки, например зрелые эритроциты млекопитающих, у которых отсутствует ядро. (В подтверждение того, что они все-таки являются клетками, заметим, что эритроциты представляют собой продукты терминальной дифференцировки, которые произошли из клеток.)



1.8 Плазматическая мембрана позволяет клетке поддерживать гомеостаз

Основные положения

- Гидрофильные молекулы не могут проникать через липидный бислой
- Плазматическая мембрана в большей степени проницаема для воды, чем для ионов
- По обеим сторонам мембраны в результате различного ионного состава среды создается осмотическое давление
- Плазматическая мембрана обладает специальными системами транспорта ионов и других растворимых компонентов в клетку и их выхода из нее
- Системы транспорта дают клетке возможность поддерживать постоянство состава внутриклеточной среды отличным от внешнего окружения
- В мембрану встроены ионные каналы — белковые структуры, позволяющие ионам проходить через мембрану, при этом они остаются в водном окружении

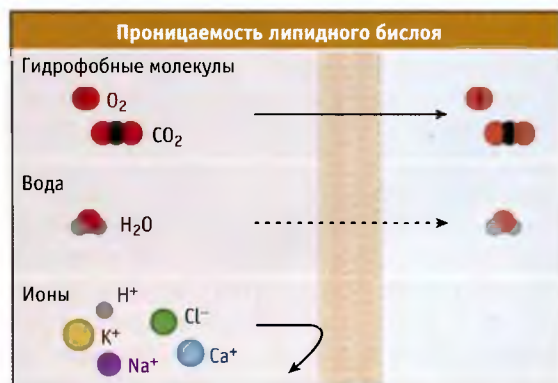
Для поддержания существования клетки как целого плазматическая мембрана выполняет несколько функций.

- Мембрана поддерживает содержимое клетки в ограниченном объеме.
- Она обуславливает различия в составе компонентов, находящихся в водной среде клетки и вне нее.
- В мембране содержатся белковые комплексы, контролирующие поступление в клетку различных молекул и выход их из клетки.
- В мембране находятся системы, обеспечивающие обмен сигналами между содержимым клетки и окружающей средой.

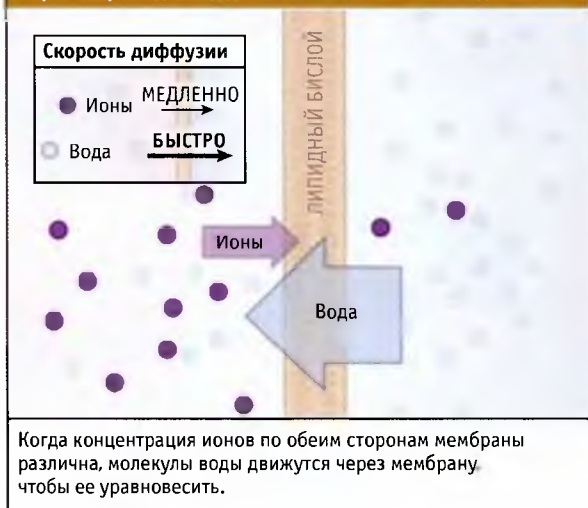
Присущие мембране свойства создают для клетки необходимость регулировать транспорт воды и ионов. иллюстрирует проницаемость мембраны для гидрофоб-

ных соединений. Различие в проницаемости мембраны для молекул воды и ионных растворов имеет очень важное последствие — возникновение осмотического давления. Оно обусловлено различной концентрацией растворенных соединений по обеим сторонам мембраны.

Скорость, с которой, например, ионы натрия или калия могут диффундировать через липидный бислой, составляет 10^{-10} от скорости диффузии воды. В результате, когда на одной стороне мембраны создается разница в концентрации ионов, молекулы воды проходят через мембрану и концентрация растворенных соединений по обе ее стороны становится одинаковой (). Если бы в клетке отсутствовал механизм контроля над концентрацией растворов, то в результате возникновения осмотического давления она бы сжималась или разбухала во всех случаях, когда концентрация растворенных веществ в окружающей среде оказывалась бы выше



В отличие от гидрофобных молекул и молекул воды, ионы не могут быстро проникать через липидный бислой



Движение воды через мембрану определяется величиной осмотического давления. Направление движения зависит от относительных концентраций растворенных веществ по обеим сторонам мембраны

или ниже, чем внутри нее. Таким образом, размеры клетки менялись бы в зависимости от окружающей среды. В экстремальных случаях это могло бы оказаться для нее роковым, либо за счет сжатия в массу, неспособную функционировать, либо за счет разрыва.

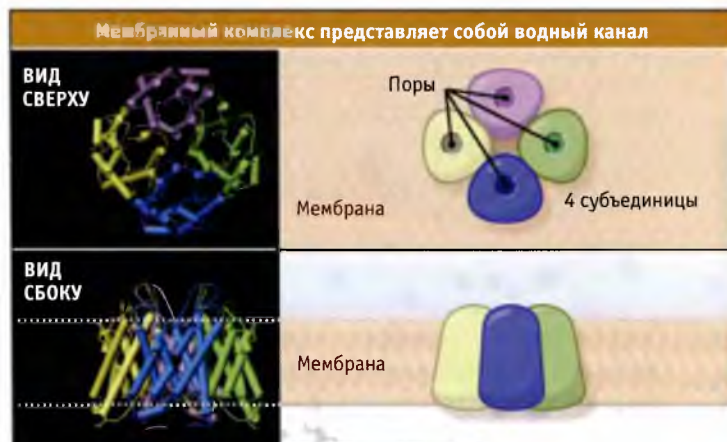
В таких случаях клетка реагирует на создавшуюся ситуацию, контролируя движение ионов и воды через плазматическую мембрану. Способность клетки к поддержанию постоянства состава внутренней среды называется **гомеостазом**. Это важнейшая функция всех клеток, независимо от того, составляют ли они одноклеточный или многоклеточный организм. В клетках животных основная роль гомеостазиса заключается в контроле величины осмотического давления, регулируя ионный состав таким образом, чтобы избежать накопления воды. Для поддержания гомеостазиса необходимо регулировать поступление в клетку или выход из нее ионов и молекул воды.

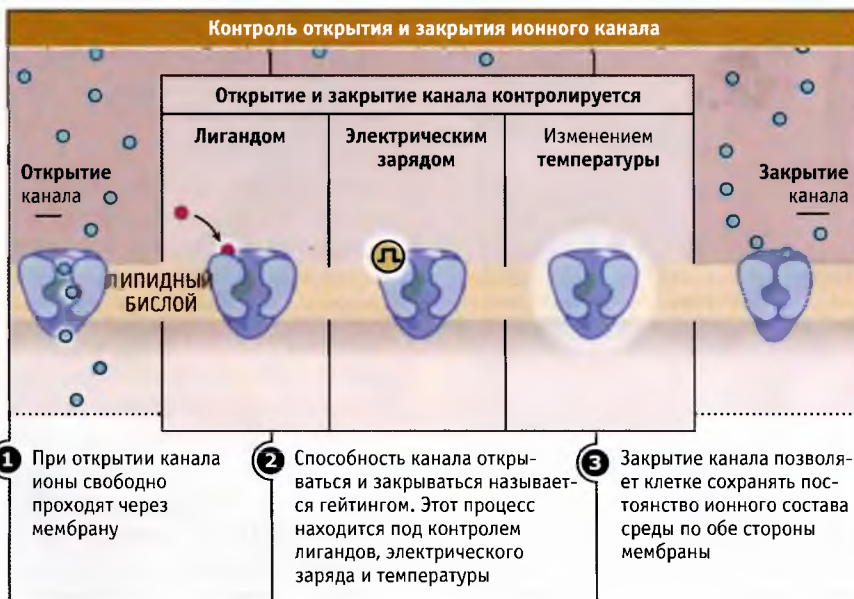
Гомеостаз для одноклеточных организмов необходим, поскольку состав внешней среды может существенно меняться. Для многоклеточных гомеостаз дает возможность индивидуальным клеткам поддерживать состав внутренней среды, отличный от состава внеклеточных жидкостей. Обычно во внутренней среде клетки содержится больше ионов калия, но меньше натрия и кальция, чем во внешней среде.

На рисунке показано, что транспорт через клеточную мембрану обеспечивается присутствием в липидном бислое белковых комплексов, образующих каналы. Наружная поверхность этих комплексов примыкает к липидному бислою, однако их внутренняя поверхность находится в водном окружении. Ионы растворенных веществ или гидрофильные белки проходят через водный канал, даже не контактируя с липидным бислоем. Каналы обладают специфичностью в отношении пропускания различных субстратов.

Механизм, регулирующий транспорт ионов через мембрану, зависит от того, движутся ли они из области высокой концентрации в область низкой или в противоположном направлении. Различие в концентрации ионов внутри и снаружи клетки создает трансмембранный градиент. Когда ионы движутся по градиенту, т. е. со стороны мембраны, где их концентрация высока, в сторону более низкой концентрации, их продвижение обеспечивается **ионным каналом**. Когда возникает необходимость движения ионов против градиента концентрации, то функционирует **белок-переносчик**, и для этого процесса необходима энергия (см. 2.2 Основными типами транспортных мембранных белков являются каналы и переносчики).

Если бы канал просто обеспечивал прохождение водной среды через мембрану, то концентрация ионов на входе и выходе быстро бы выровнялась. Для того чтобы поддерживать постоянную концентрацию ионов в среде, находящейся по обеим сторонам канала, на время отсутствия транспорта он закрывается. Способность канала открываться и закрываться называется **гейтинг**. Как показано на рисунке, закрытие и открытие канала происходят в результате конформационных изменений, которые позволяют ионам проходить через канал или блокируют этот процесс. Открытие и закрытие канала контролируется небольшими молекулами, выполняю-





Механизм открытия и закрытия ионного канала

щими роль лигандов, изменениями электрического потенциала или температуры.

Наряду с механизмами, которые обеспечивают контроль за транспортом метаболитов, во всех клетках присутствуют аквапорины, переносящие через плазматическую мембрану воду (см. 2.11 *Селективный транспорт воды происходит через аквапориновые каналы*). Аквапорины переносят воду сквозь особый канал в ответ на изменение осмотического давления.

Контроль за осмотическим давлением в клетках растений происходит по-другому. В этих клетках вода накапливается в специальных компартментах, которые называются вакуоли. Внутреннее давление сдерживается жесткой клеточной стенкой, и это фактически служит механизмом, регулирующим степень набухания клетки (см. 17.10 *Рост клетки регистрируется путем набухания вакуолей*).

Внутренняя часть оболочки ограничивает внутренний компартмент органеллы. Все органеллы, окруженные оболочкой, содержат генетический материал. (Прочие органеллы, имеющие мембрану, окружены одним билипидным слоем и не содержат генетического материала.)

Строение оболочки, окружающей компартмент, который содержит генетический материал, напоминает оболочку прокариотической клетки. Такое сходство позволяет предполагать, что эти компартменты произошли из прокариотических клеток, захваченных клеткой-хозяином. Эта ситуация напоминает явление **эндосимбиоза**, при котором некоторые виды бактерий проникают в цитоплазму эукариотической клетки-хозяина и существуют там. Поэтому такая модель, предложенная для объяснения эволюции органического мира, получила название **теория эндосимбиоза**.



Оболочка состоит из наружной и внутренней мембран, разделенных межмембранным пространством. Каждая мембрана представляет собой двойной слой липидов

1.9 Клетки внутри клеток: органеллы, обладающие оболочкой, могли возникнуть в результате эндосимбиоза

Основное положение

- Органеллы, обладающие оболочкой, по-видимому, возникли за счет эндосимбиоза прокариотических клеток

В клетках эукариот присутствуют три органеллы — ядро, митохондрии и хлоропласты, каждая из которых окружена оболочкой. На рисунке показано, что оболочка представляет собой двойную мембрану, внешняя часть которой обращена наружу от органеллы и отделена от внутренней части межмембранным пространством.



Органеллы, окруженные мембраной, могли образоваться, когда одна клетка поглотила другую

иллюстрирует модель, объясняющую, каким образом в ходе эволюции при поглощении одной клеткой другой могли возникнуть эти органеллы. Поглощенная клетка должна быть окружена двумя мембранами: собственной и клетки-хозяина. Отпочковывание захваченной клетки от плазматической мембраны клетки-хозяина должно привести к ее попаданию внутрь с образованием отдельного компартмента, окруженного оболочкой.

Если поглощенные клетки передали клетке-хозяину новые свойства, например способность к фотосинтезу, то по такому пути могли бы образоваться митохондрии и хлоропласты. Со временем поглощенная клетка могла утратить более ненужные для нее функции, поскольку она оказалась окруженной цитоплазмой и приспособилась к выполнению деятельности, необходимой для существования клетки-хозяина.

В митохондриях и хлоропластах содержится гораздо меньшее число генов, чем в независимо живущих бактериях. Они утратили многие генетические функции, необходимые для самостоятельного существования (например функции кодирования метаболических реакций). Фактически большинство генов, кодирующих функции органелл, находится в ядре. (Белки синтезируются в цитозоле и затем поступают в эти органеллы.) Эти гены должны были поступить в ядро из органелл через определенное время после завершения эндосимбиоза.

Мы можем проследить за обменом генетическим материалом между ядром и органеллой, сравнивая локализацию определенных генов у разных биологических видов. С начального этапа эндосимбиоза большая часть

процессов обмена генетической информацией между геномом каждой органеллы и ядерным геномом включала передачу функций последнему, хотя обмен может происходить и в другом направлении (см. **МВ10:1-0003**).

Митохондрии и хлоропласты сохранили способность к синтезу некоторых белков при экспрессии своей собственной ДНК. Фактически наиболее убедительным доказательством эндосимбиотического происхождения хлоропластов и митохондрий является устройство их генетического аппарата. В этих органеллах он очень похож на генетический аппарат современных прокариот и гораздо меньше напоминает генетический аппарат эукариотических клеток. Анализ гомологического сходства позволяет предположить, что для этих органелл существовали разные пути развития. Митохондрии проявляют большее родство с α -пурпурными бактериями, а хлоропласты, похоже, ближе к цианобактериям.

Родство с бактериями также проявляется и в способе размножения органелл. Митохондрии и хлоропласты делятся подобно бактериям, путем инвагинации окружающей мембраны с образованием поперечной перетяжки. Компоненты деления по составу напоминают бактериальные.

О происхождении ядра известно меньше. Можно допустить, что на самых ранних стадиях развития высших организмов одна прокариотическая клетка поглотила другую, и поглощенная клетка взяла на себя генетические функции всей системы. Опять-таки можно делать лишь предположения относительно устройства генетического аппарата, но эукариоты ближе к археям, чем к бактериям. Однако у эукариот также обнаружены гены, близкие к бактериальным, причем наибольшее сходство обнаруживается среди генов, кодирующих различные метаболические функции. Одно из возможных объяснений этого заключается в том, что эукариотическая клетка образовалась при слиянии клетки бактерии и археи, а гены обеих клеток перешли в ядро, которое возникло из поглощенной клетки.

1.10 ДНК является наследственным материалом клетки, однако существуют другие формы передачи наследственной информации

Основные положения

- ДНК переносит генетическую информацию, в которой закодирована последовательность всех клеточных белков
- Информация может переноситься и в клеточных структурах, которые также наследуются

В каждой живой клетке двойная спираль ДНК несет основную наследственную информацию. У бактерий и архей все информационные последовательности обычно расположены в одной хромосоме. У эукариот почти все гены находятся в ядерных хромосомах, и небольшое ко-



1 PrPs могут приобретать различную конформацию

2 Неправильно свернутая форма может вызывать изменение конформации нормальных молекул PrPs

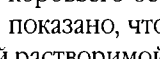
3 Заболевание вызвано образованием больших самоагрегирующих фрагментов белка

PrP существуют в растворимой форме или приобретают альтернативную конформацию, способную к агрегации. Под влиянием агрегатов вновь синтезированные молекулы PrP начинают приобретать конформацию, благоприятствующую агрегации

личество информационных последовательностей локализовано в митохондриях и хлоропластах (у растений).

ДНК также может являться генетическим материалом вирусов, однако у некоторых вирусов таковым служит РНК. У всех вирусов генетический материал окружен белковой оболочкой. Конечно, вирусы не являются живыми организмами, однако при инфицировании клетки их генетический аппарат функционирует таким же образом, как и у клетки-хозяина.

Клетки также способны хранить информацию, которая не закодирована в последовательностях ДНК. Такой способ наследования называется эпигенетической наследственностью (см. **МВ10:1-0004**). Формально этим термином описывается ситуация, когда две клетки имеют различный фенотип, хотя последовательности их ДНК в локусе, ответственном за проявление фенотипа, идентичны.

Примером эпигенетического эффекта является поведение белка, вызывающего заболевание коровьего бешенства (см. **МВ10:1-0005**). На  показано, что белок PrP может или находиться в простой растворимой форме, или принимать конформацию, при которой он образует крупные агрегаты. Образование этих агрегатов является причиной развития заболевания. Они способны к самовоспроизведению, поскольку под их воздействием вновь синтезированные молекулы PrP принимают конформацию, способствующую агрегации. Аналогичные эффекты обнаружены в дрожжах, и, таким образом, эпигенетическое наследование является достаточно широко распространенной формой передачи наследственной информации (см. **МВ10:1-0006**). Во всех этих случаях фенотип определяется скорее наличием пред-

существующих белковых агрегатов, а не последовательностью гена, кодирующего данный белок.

Мы не знаем, нужна ли клетке информация, заложенная в форме, отличной от последовательности нуклеотидов в ДНК. Если бы смогли считать последовательности ДНК, кодирующие все белки, оказались бы они способны к взаимодействию с образованием всех клеточных структур и функций? Если нет, то какова природа информации, которая позволяет клетке образоваться только из уже существующей клетки? Необходимы ли некие предсуществующие матрицы, на которых в дальнейшем собираются все структуры клетки (см. *1.19 Важным фактором является локализация клеточных структур*)?

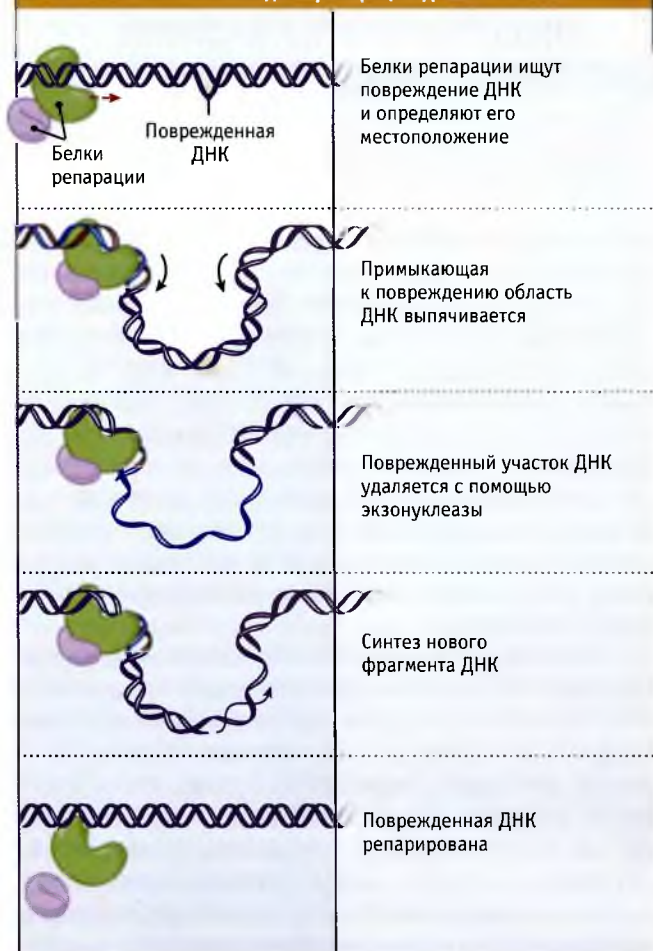
1.11 Клеткам необходимы механизмы репарации повреждений ДНК

Основные положения

- Под влиянием факторов внешней среды или в результате ошибок в работе различных систем клетки в генетическом материале постоянно возникают повреждения
- Для сохранения жизнеспособности во всех клетках должны быть системы репарации, снижающие количество повреждений в ДНК

Наряду с безошибочным воспроизведением генетической информации важную роль играет поддержание ее информационной целостности. Фактически в геноме человека присутствует больше генов, ответственных за

Модель репарации ДНК



Система репарации узнает повреждение в ДНК, удаляет поврежденный участок и заполняет образующуюся брешь

репарацию повреждений ДНК, чем кодирующих ферменты репликации.

Ошибки в последовательностях ДНК могут возникать по двум причинам. Во-первых, при репликации, во вновь образующуюся цепь ДНК может включиться неправильное основание. Для предотвращения таких ошибок в системе репликации существует корректорский механизм, который снижает число ошибочно включенных нуклеотидных остатков до минимума. Во-вторых, при воздействии таких факторов внешней среды, как ионизирующие излучения и химические агенты, нарушающие структуру нуклеотидов, в ДНК могут возникнуть повреждения. В клетке существует много **репаративных** систем, которые устраняют повреждения в последовательностях ДНК, восстанавливая их правильную структуру (см. **МВ10:1-0007**).

Несмотря на функционирование систем репарации, в генетическом материале возникают мутации, однако они не нарушают жизнедеятельность клетки. В действительности, определенная частота мутаций необходима

для обеспечения вариативности организмов в процессе эволюции. Мутации во всех организмах, от бактерий до высших эукариот, возникают с частотой порядка 10^{-6} в пересчете на один ген (или 10^{-9} – 10^{-10} в пересчете на нуклеотидную пару) за одно поколение. Примерно такое же количество мутаций возникает даже у организмов, живущих в экстремальных условиях. Это позволяет предполагать, что общая частота возникновения мутаций определяется балансом между неблагоприятным эффектом большинства вредных мутаций и некоторыми полезными мутациями.

Ни одна клетка не может существовать в отсутствие систем репарации. Если, например, у *E. coli* прекратить действие всех систем репарации, то однократное облучение бактерий УФ может оказаться летальным. В то же время бактерии с функционирующими системами репарации выносят огромное количество повреждений.

1.12 Митохондрии — энергетические фабрики клетки

Основное положение

- Все живые клетки обладают способностью превращать энергию окружающей среды в общий интермедиат — АТФ

Клетка получает энергию за счет пищи, которую она усваивает из окружающей среды. Затем эта энергия должна быть превращена в форму, которую можно распределять по клетке. Общее решение этого вопроса (не только для митохондрий, но и для прокариотических клеток, также превращающих энергию) состоит в запасании энергии в форме универсального вещества, которое можно использовать в любой момент и в любом месте клетки. Различные типы клеток отличаются деталями энергетической системы, однако общим свойством, характерным для всех клеток, является их способность превращать энергию окружающей среды в АТФ, который представляет собой общую молекулу, при необходимости обеспечивающую энергией отдельные химические реакции.

АТФ образуется двумя путями: в цитозоле и в митохондриях. Первый путь реализуется в цитозоле эукариотических клеток и у бактерий. При этом в результате гликолиза происходит распад глюкозы с образованием пирувата и образуются две молекулы АТФ. Эта реакция может происходить в анаэробных условиях (в отсутствие кислорода).

Второй путь является основным источником создания энергетических запасов и осуществляется в митохондриях эукариотических клеток. Процесс, при котором в митохондриях образуется АТФ, называется окислительным фосфорилированием и осуществляется с участием электрон-транспортной цепи. Пируват, высвобождающийся при гликолизе, поступает в матрикс (люмен) митохондрии, где он распадается и,

реагируя с коэнзимом А, образует ацетил-КоА. После этого, при участии цикла лимонной кислоты с освобождением атомов водорода, ацетильный остаток ацетил-КоА распадается, образуя двуокись углерода. Восстановление переносчика НАД⁺ в НАДН происходит при участии атомов водорода, и затем при окислении НАДН высвобождаются протон и электрон. Из матрикса ионы водорода (протоны) переносятся через мембрану в межмембранное пространство, а электроны перемещаются вдоль мембраны с участием нескольких транспортных белков (). В результате по обе стороны мембраны создается градиент концентрации протонов. Под действием этого градиента протоны переносятся через мембрану в обратном направлении. Это осуществляется при участии большого белкового комплекса АТФ-синтазы, которая и образует АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Этот процесс носит название **хемиосмос**.

Митохондрии часто называют энергетическими центрами (эукариотических) клеток; они снабжают клетку энергией, необходимой для осуществления метаболических процессов и структурных изменений. Точнее говоря, они превращают энергию, поступающую из внешней среды в формы, которые могут быть использованы клеткой. Постоянство структуры и функции митохондрий у всех клеток эукариот убеждает в том, что эндосимбиоз, в результате которого они возникли, должен был произойти на самом начальном этапе эволюции эукариот.

1.13 Хлоропласты служат источниками энергии в клетках растений

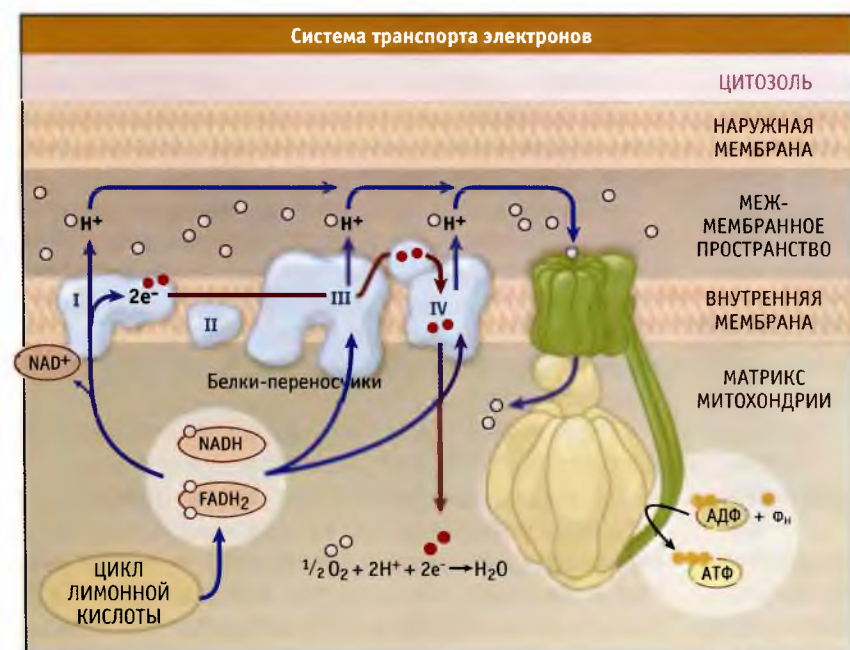
Основное положение

- Пластиды, окруженные мембраной, являются органеллами растительных клеток и могут развиваться в хлоропласты и другие специализированные формы

Пластиды представляют собой органеллы, окруженные мембраной. Они присутствуют только в клетках растений (см. 17.20 В растениях содержатся уникальные органеллы, называемые *пластидами*). В пластидах протекают многие основные метаболические реакции растительных клеток. Пластиды подразделяются на несколько высокоспециализированных типов, но во всех происходит несколько общих обменных процессов. Они представляют собой органеллы, в которых синтезируются жирные кислоты, многие аминокислоты, а также пурины и пиримидины. В противоположность этому, в клетках животных те же самые реакции происходят в цитозоле.

Пластиды окружены двумя мембранами, внутренней и наружной, которые тесно примыкают друг к другу. Как и у митохондрий, они разделены межмембранным пространством. Внутри пластид находится **строма**, окруженная внутренней мембраной. Так же как и матрикс митохондрий, строма содержит ДНК, РНК и много белков, в том числе ферменты и рибосомы. Строма отличается от матрикса митохондрий тем, что содержит окруженные мембранами диски, называемые тилакоидами. В мембране тилакоидов находятся энергетические системы органеллы.

Все типы пластид образовались из общей органеллы — предшественника — пропластиды. Размер пропластид меньше, чем у дифференцированных пластид, у них отсутствуют внутренние мембраны, и они не вы-



АТФ образуется при хемиосмосе с участием системы протонного транспорта

полняют специализированных функций. При дифференцировке растительной клетки в определенный тип, происходит дифференцировка пропластид, и они приобретают функции, свойственные этому типу клеток. Таким образом, тип, который приобретает пластида, зависит от типа клеток.

Хлоропласты представляют собой пластиды, обеспечивающие растениям возможность синтезировать АТФ с использованием системы, в которой вместо химического распада глюкозы донором электронов служат молекулы хлорофилла, активированные солнечным светом. При наличии света хлоропласты развиваются в тех частях растения, которые освещены в наибольшей степени, например в листьях, где и происходит фотосинтез. У растений, произрастающих в темноте, хлоропласты не образуются, однако вместо этого в листьях развиваются пластиды другого типа. В семенах и клубнях находится еще один тип пластид — амилопласты, образующие крахмал, который откладывается в стромах в виде гранул. Некоторые типы пластид содержат ферменты, катализирующие синтез небольших молекул. В хромопластах образуются и запасаются пигменты, называемые каротиноидами, красного, оранжевого или желтого цвета, которые обуславливают окраску некоторых цветков и плодов.

В процессе развития или под действием сигналов, поступающих из окружающей среды, один тип дифференцированных пластид может превращаться в другой, например когда в процессе созревания томатов они меняют окраску с зеленой на красную или когда в листопад зеленые листья становятся красными, оранжевыми или желтыми. При этих превращениях, которые регулируются экспрессией ядерных генов, пластиды теряют хлорофилл и тилакоидные мембраны и начинают синтезировать каротиноиды.

1.14 Органеллам необходим механизм, ответственный за специфическое местоположение белков

Основное положение

- Все органеллы импортируют белки из цитозоля

Специализация органелл для выполнения различных функций предполагает, что каждой из них необходим свой набор небольших молекул и макромолекул. Однако синтез этих компонентов не обязательно происходит в самой органелле. Многие метаболиты, включая белки, образующие структуру органеллы, поступают из цитозоля. (Митохондрии и хлоропласты сами синтезируют небольшое количество необходимых белков.)

Каким образом компоненты, необходимые органелле, попадают к месту, где они используются? Как показано на рис. 1.24, существует, по крайней мере, восемь основных типов органелл. Импорт и экспорт небольших молекул находятся под контролем белков, встроенных в мембраны органелл. Импорт белков в момент синтеза или после его завершения в цитозоле происходит при участии специальных механизмов.

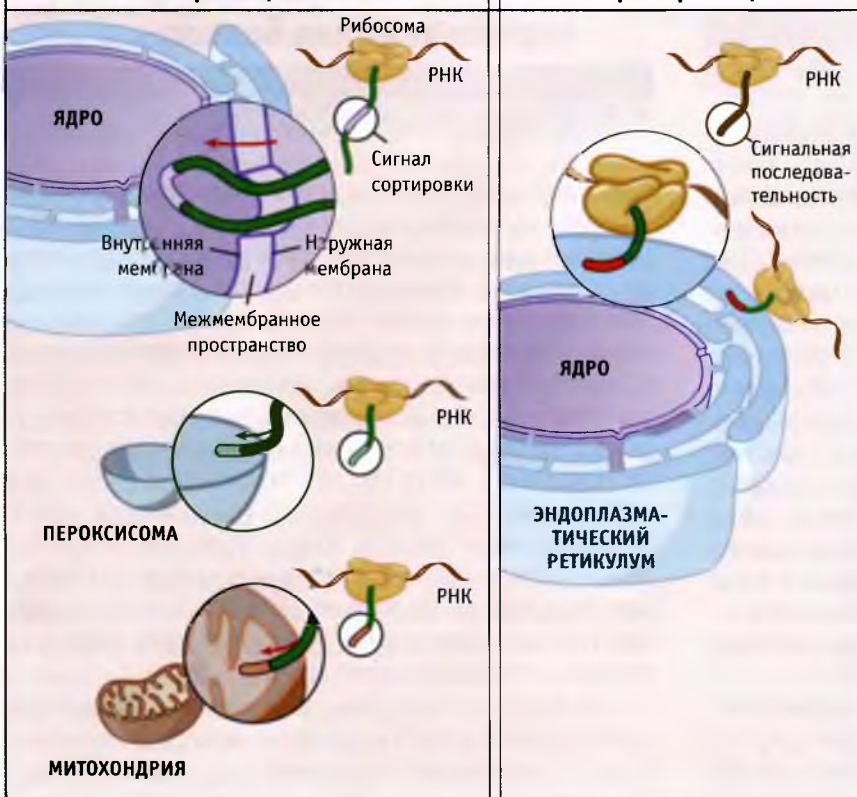
На рис. 1.25 показано, что местоположение импортируемого белка определяют мембраны органелл. Если компартмент, например эндоплазматический ретикулум или цистерны аппарата Гольджи, окружен одной мембраной, белок может транспортироваться внутрь или может включаться в мембрану. Если же компартмент окружен оболочкой, как, например, ядро, митохондрия или хлоропласт, то в этом случае возникает много способов. Белок может находиться в наружной мембране, межмембранном пространстве,

Каждая органелла обладает определенной функцией	
ОРГАНЕЛЛА	Функция
Ядро	Экспорт и импорт белков генной экспрессии; экспорт РНК
Эндоплазматический ретикулум	Модификация белков; импорт белков происходит котрансляционно
Аппарат Гольджи	Модификация белков; белки поступают за счет перемещения из ЭПР
Эндосомы Ранние эндосомы Поздние эндосомы	Отбор поглощенных белков для транспорта в другие компартменты; белки, функционирующие в эндосомах, поступают секреторным путем
Лизосомы	Деградация поглощенных извне белков, деградация белков цитозоля в клетках, попавших в экстремальные условия; белки, функционирующие в лизосомах, поступают из <i>транс</i> -Гольджи сети
Митохондрия	Энергетические функции; часть белков импортируется из цитозоля, другие образуются в органелле (в митохондрии)
Пероксисома	Окислительные процессы; импорт белков из цитозоля

рис. 1.24. Каждая органелла характеризуется определенным составом и строением, который зависит от ее функции

Посттрансляционно

Во время трансляции



Белки локализуются в мембране или в люмене органеллы; если органелла окружена оболочкой, то белки могут располагаться или в мембране, или в межмембранном пространстве

во внутренней мембране, а также транспортироваться внутрь органеллы.

Основной принцип, определяющий адресацию белка, состоит в том, что в любом белке, который попадает в определенную органеллу, имеется короткая последовательность аминокислот — сигнал сортировки (или сигнал позиционирования). Для каждого типа органелл существует один или несколько различных сигналов. Сигналы сортировки узнаются специфическими системами клетки на одном или нескольких этапах транспорта белка к месту его локализации.

1.15 Белки транспортируются к мембранам и проходят через них

Основные положения

- Транспорт белков в органеллу происходит с помощью рецепторных комплексов, которые встроены в ее мембрану
- Белки, поступающие в ядро, митохондрии и хлоропласты, после синтеза выходят в цитозоль, а затем связываются с органеллой
- Белки, поступающие в эндоплазматический ретикулум, переносятся на рецепторный комплекс мембран ЭПР во время синтеза

Для всех органелл, окруженных мембранами, существует одна общая проблема: каким образом получить

белок, который образуется в цитозоле? При этом белок должен быть локализован либо в мембране, либо пройти через нее. Прохождение гидрофильного белка через гидрофобную мембрану невозможно из-за существования значительных энергетических препятствий. Каждая органелла выработала собственное решение этой общей проблемы. В ее мембране присутствуют белковые гидрофильные поры, через которые и осуществляется транспорт, так что белку не нужно взаимодействовать с гидрофобной мембраной. Строение самой поры и природа взаимодействия с транспортируемым белком зависят от органеллы.

Ядерные поры представляют собой массивные структуры со сложным транспортным аппаратом, который определяет, какие белки должны транспортироваться в ядро, а какие выходить из него. Белки накапливаются на одной стороне оболочки, проходят через пору и выходят с другой стороны (см. 5.11 Белки избирательно транспортируются в ядро через ядерные поры). Пора проходит через обе мембраны ядерной оболочки, и созревший белок транспортируется через всю пору.

В наружной и внутренней мембранах таких органелл, как митохондрии и хлоропласты, содержатся белки, функция которых заключается в транспорте в органеллу импортируемых белков. Экспорта белков из этих органелл не происходит. Белки образуются на рибосомах в цитоплазме и выходят в цитозоль. В их

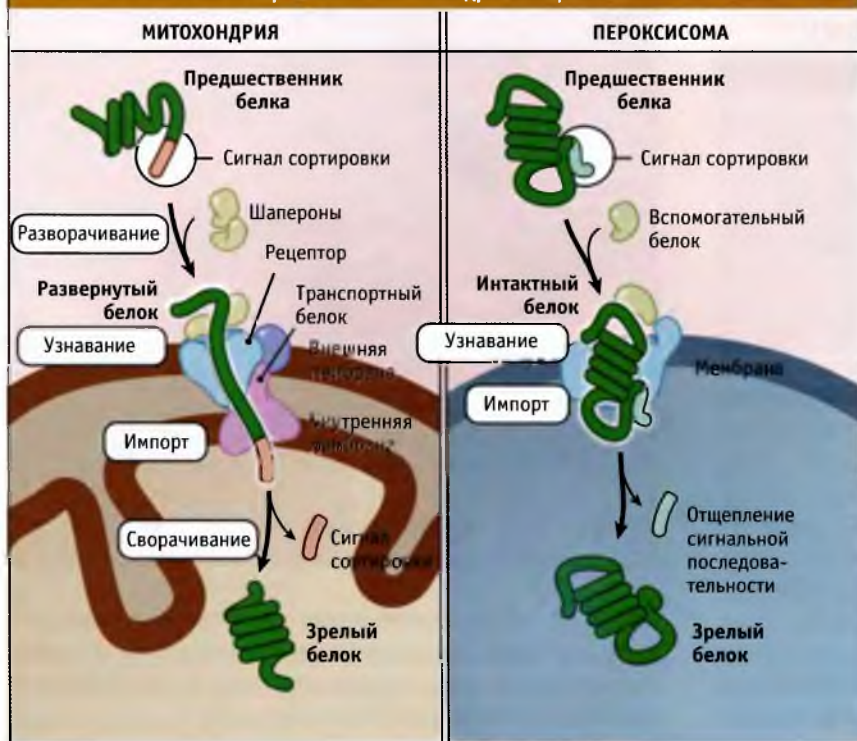


Рис. 1.26. Белки, которые поступают в митохондрии, должны быть в развернутом состоянии; напротив, в пероксисомы транспортируются интактные белки

структуре находятся специфические последовательности, которые взаимодействуют с рецепторами, находящимися в мембране органеллы (см. 3.27 *Импорт белков в митохондрии начинается с узнавания сигнальной последовательности на внешней мембране*). На Рис. 1.26 показано, что проходящий через мембрану канал очень узкий, и чтобы пройти через него, транспортируемый белок должен вначале развернуться, а на другом конце приобрести зрелую конфигурацию. Это требует активного участия дополнительных белков — шаперонов, контролирующих сворачивание белка (см. 1.17 *Способность к свертыванию и разворачиванию белковых структур является характерной особенностью всех клеток*). Интересное исключение составляют пероксисомы, у которых существует система импорта белков, находящихся в зрелой свернутой конфигурации (см. 3.30 *Белки сворачиваются перед импортом в пероксисомы*).

Эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, эндосомы и плазматическая мембрана представляют собой отдельные органеллы, которые, однако, используют одну и ту же систему транспорта и адресации белков. Процесс начинается с этапа, когда вновь образующийся белок, который находится еще в цитозоле на рибосомах, связывается посредством специфической «сигнальной последовательности» с рецепторами на поверхности эндоплазматического ретикулума (см. 3.2 *Белки вступают на путь секреции путем пере-*

носа через мембрану ЭПР). Это связывание приводит к входу белка в канал, а рибосома в течение продолжающегося синтеза остается связанной с мембраной эндоплазматического ретикулума. По мере синтеза белок поступает в канал.

С этого момента белок может или пройти через мембрану в люмен эндоплазматического ретикулума, или начать в нее интегрироваться. Если место конечной локализации белка находится вне эндоплазматического ретикулума, в одной из цистерн аппарата Гольджи, в эндосоме, или в плазматической мембране (или он должен секретироваться через плазматическую мембрану во внешнюю среду), то белок узнается по специфической последовательности аминокислот и далее транспортируется за счет процесса, известного как траффик (перемещение) белка (см. 1.16 *Белки транспортируются через ЭПР и аппарат Гольджи*).

Для белков, локализованных в пределах мембраны, процесс носит более сложный характер. Связывание белков с мембраной осуществляется через те же поры, но вместо прохождения по каналу белок транспортируется в латеральном направлении к своему местонахождению в мембране. Механизм этого процесса недостаточно понятен, однако предполагается, что происходит временное разрушение поры для того, чтобы гидрофобные области белка могли связаться с окружающими липидами.

1.16 Белки транспортируются через ЭПР и аппарат Гольджи

Везикула, образующаяся отпочковыванием от мембраны

Основные положения

- Все белки, локализованные в ЭПР, аппарате Гольджи или в плазматической мембране, при синтезе вначале связываются с ЭПР
- Белки переносятся из одного компартмента в другой при участии мембранных везикул, которые отпочковываются от поверхности одной мембраны и сливаются с поверхностью следующей
- Транспорт белков из окружающей среды в клетку происходит в обратном направлении при участии везикул

Интеграция белка в мембрану или его трансмембранный транспорт являются своеобразными событиями. Если белок должен пройти через несколько мембран, то его связывание с мембраной происходит на начальном этапе процесса транспорта. После этого он остается в мембранном окружении и транспортируется от одной мембраны к другой в **везикуле**. Это, например, характерно для белков, исходно ассоциированных с ЭПР, но в конце высвобождающихся из плазматической мембраны. Аналогичная система используется для транспортировки белков как из клетки, так и в клетку.

Экзоцитоз представляет собой процесс, посредством которого белки транспортируются к плазматической мембране или во внеклеточную среду (см. 4.2 *Обзор путей экзоцитоза*). Некоторые белки секретируются конститутивно, т. е. после синтеза они всегда выходят из клетки. Другие, продуцируемые некоторыми специализированными клетками, например пищеварительные ферменты, выходят только после получения клеткой соответствующего сигнала.

При попадании в ЭПР белок остается в мембране или в люмене до тех пор, пока он не переместится в другую часть системы с участием везикул, или не поступит обратно в цитозоль, где подвергнется деградации. Транспортные везикулы представляют собой мелкие пузырьки (обычно 100–200 нм в диаметре), которые образуются при «отпочковывании» от мембраны (рис. 1.27) (см. 4.4 *Представления о везикулярном транспорте белков*). Пузырек отпочковывается от поверхности одной мембраны и мигрирует к другой мембране, с которой он сливается. Транспортные пузырьки называются **окаймленными везикулами**, поскольку их мембрана окружена белковой оболочкой. Различные типы везикул различаются между собой по составу оболочки, которая участвует в позиционировании и отборе транспортируемых белков. Растворимые белки переносятся из донорного в акцепторный компартмент, находясь внутри везикулы; а мембранные белки переносятся в составе мембраны везикулы. Это означает, что белок может транспортироваться из ЭПР в аппарат Гольджи сквозь стопки Гольджи и к плазматической мембране.

Импорт белков в клетку также происходит с участием окаймленных везикул. Они образуются на плазматической мембране и поступают в клетку; этот процесс носит название **эндоцитоз** (см. 4.3 *Обзор путей*



РИС. 1.27. Перенос белков между компартментами, ограниченными мембраной, происходит при отпочковывании от одного компартмента везикулы, содержащей белки, и последующим ее слиянием с мембраной другого компартмента

эндоцитоза). Эндоцитоз происходит по тому же механизму, что и экзоцитоз, но протекает в обратном направлении. Везикулы, которые отпочковываются от плазматической мембраны, включают материал из внеклеточной среды и возвращают его в плазматическую мембрану. Везикулы, которые осуществляют эндоцитоз, отличаются от везикул экзоцитоза составом белковой оболочки. Некоторые патогенные микроорганизмы проникают в клетку хозяина посредством эндоцитоза; действительно, митохондрии и хлоропласты своим происхождением обязаны эндоцитозу (см. 1.9 *Клетки внутри клеток: органеллы, обладающие оболочкой, могли возникнуть в результате симбиоза*). На рис. 1.28 представлены аналогичные механизмы для транспорта вновь синтезированных белков по механизму экзоцитоза и для импорта белков в клетку по механизму эндоцитоза. В каждом случае белок может транспортироваться при прохождении серии событий отпочковывания и слияния по мере того, как он мигрирует с поверхности одной мембраны на другую.

Один из результатов этого процесса состоит в том, что по мере протекания процессов отпочковывания и слияния происходит постоянное перемещение компонентов от одной мембраны к другой. С количественной точки зрения, при экзоцитозе переносится больше материала, чем при эндоцитозе, и прямой (антероградный) транспорт приводит к сплошному потоку липидов от ЭПР к плазматической мембране. За счет ретроградного транспорта, пустые везикулы возвращают липиды обратно в мембраны. Это обеспечивает целостность мембран.

Везикулярный транспорт белков представляет собой высокоспецифичный процесс. Основной принцип



Транспортные везикулы перемещают белки через ЭПР, аппарат Гольджи и плазматическую мембрану

отбора состоит в том, что белок узнается по наличию специфического сигнала (чаще всего это короткая последовательность аминокислот) и включается в везикулу для дальнейшего транспорта. При отсутствии такого сигнала белок остается в компартменте, в котором он находится, или же продвигается медленнее. Отпочковывающиеся везикулы могут селективно включать белки, подлежащие транспорту, оставляя на местах резидентные белки органеллы.

1.17 Способность к свертыванию и разворачиванию белковых структур является характерной особенностью всех клеток

Основное положение

- Конформация молекул белков определяется их первичной структурой. Однако, в большинстве случаев, нативная конформация не возникает самопроизвольно, и необходимо участие шаперонов

Биологическая активность белков зависит от их третичной структуры. Обычно молекула фермента содержит активный центр, определяющий ее каталитическую активность. Структурный белок, входящий в состав олигомерной субъединицы, обладает сайтами, которые обеспечивают его взаимодействие с другими субъединицами и/или со структурой, выполняющей определенные функции. В любом случае, наиболее существенную роль играет способность белка сворачиваться с образованием нативной структуры. Этот процесс редко происходит самопроизвольно, и чаще необходимо взаимодействие синтезируемого белка с другими белками. Даже, если нативная структура образуется спонтанно,

то это происходит с очень низкой скоростью. Поэтому, в живой клетке, приобретение белком нативной конформации требует участия дополнительных помощников. Белки, способствующие сворачиванию других белков, называются **шапероны**.

Шапероны узнают участки белковой молекулы, которые скрыты в зрелой конформации, но легко доступны при ее синтезе. Обычно, к числу таких участков относятся типично гидрофобные области, которые агрегируют внутри молекулы зрелого белка. При синтезе белок сходит с рибосомы в виде линейной молекулы, состоящей из аминокислот, и шапероны узнают способные к агрегации участки. Обратимо связываясь с этими участками, шапероны предотвращают случайные взаимодействия в белковой цепи, и позволяют молекуле укладываться только таким образом, который обеспечивает формирование нативной структуры.

Шапероны также участвуют в процессах удаления из клетки поврежденных молекул. При нарушении структуры белка, например при воздействии высокой температуры, меняется его конформация. При этом открываются те же области (обычно гидрофобные), которые во время синтеза были доступны для шаперонов. Эти области становятся маркерами, позволяющими выявить поврежденный белок и отметить его для деградации.

Шапероны находятся во всех компартментах клетки. В цитозоле они обеспечивают сворачивание молекул белков по мере их синтеза на рибосомах. В люмене органелл они способствуют укладке нативной структуры белков по мере их прохождения через мембрану.

(Более подробно о шаперонах см. 3 Мембранное ад-ресование белков.)

1.18 Форма эукариотической клетки определяется ее цитоскелетом

Основные положения

- Цитоскелет эукариотической клетки представляет собой внутреннюю сеть фибриллярных компонентов, включающую микротрубочки, актиновые филаменты и промежуточные филаменты
- Цитоскелет обладает различными функциями, в т.ч. фиксирует органеллы в клетке.

Термином **цитоскелет** обозначают сеть фибриллярных компонентов, которая присутствует в большинстве клеток эукариот. Эта сеть создает довольно жесткую внутреннюю структуру, определяющую форму клетки. Например, эпителиальные клетки имеют кубическую форму, а нейроны характеризуются наличием очень протяженных и тонких аксонов. Наряду с поддержанием клеточной структуры, цитоскелет обладает и другими функциями. Например, белковые субстраты могут связываться с цитоскелетом с помощью молекулярных моторов, использующих филаменты как направляющие для транспортировки белковых субстратов к местам их локализации.

Цитоскелет представляет собой динамическую структуру. Он состоит из трех фибриллярных компонентов. Каждый компонент представляет собой полимерную структуру, образованную повторами белковых субъединиц. Филаменты представляют собой динамические структуры. Возможно добавление к ним или отщепление от них субъединиц. В результате тредмиллинга с одного конца происходит сборка филаментной структуры, а с другого ее диссоциация. Три компонента фибриллярной сети называются **микротрубочки, актиновые филаменты и промежуточные филаменты**.

Микротрубочки представляют собой полимер тубулина, димера, состоящего из двух близких по структуре белков, α - и β -тубулина. Они образуют полые трубочки около 25 нм в диаметре. Микротрубочки отличаются динамической нестабильностью, и взаимодействие с другими белками оказывает на них стабилизирующее воздействие. Микротрубочки участвуют в поддержании структуры клетки. При действии на большинство клеток веществ, вызывающих диссоциацию микротрубочек, клетки теряют форму и превращаются в сферические образования. При диссоциации микротрубочек эндоплазматический ретикулум собирается вокруг ядра, и происходит фрагментация аппарата Гольджи, что свидетельствует о важной роли, которую играют микротрубочки в поддержании структуры этих органелл.

Разнообразие клеточных структур, формируемых с участием микротрубочек, можно проиллюстрировать на примере отростков фибробластов и нейронов. Фибробласты представляют собой подвижные клетки, способные мигрировать в организме. У этих клеток, как показано на рис. 1.29, микротрубочки образуют звездчатое образование, выходящее из одной точки, расположенной поблизости от ядра. Напротив, длинные отростки (аксоны и дендриты), отходящие от тела нейрона, содержат параллельные пучки очень длинных микротрубочек (рис. 1.30). Оба типа расположения МТ представляют собой структурные элементы, которые при растяжении развивают усилие, и служат в качестве направляющих для перемещения белков с помощью молекулярных моторов.

Каждый раз при наступлении деления микротрубочки претерпевают сильные изменения, вплоть до полной реорганизации их структуры. На рис. 1.31 показаны изменения, происходящие в митозе, когда сеть микротрубочек полностью диссоциирует и заменяется веретеном.

Актиновые филаменты состоят из субъединиц белка актина. Актин является одним из наиболее распространенных белков эукариотической клетки и наиболее консервативных с эволюционной точки зрения. В филаменте все актиновые субъединицы имеют одинаковую полярность, при которой сайт связывания АТФ на одном ее конце контактирует со следующей субъединицей. Актиновый филамент представляет собой полимер, состоящий из двух нитей, расположенных подобно двум перекрученным ниткам бус, образующим связку около 8 нм в диаметре.

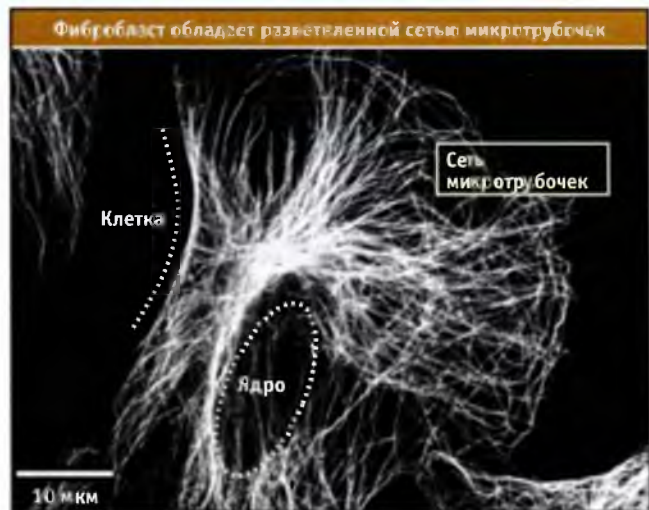


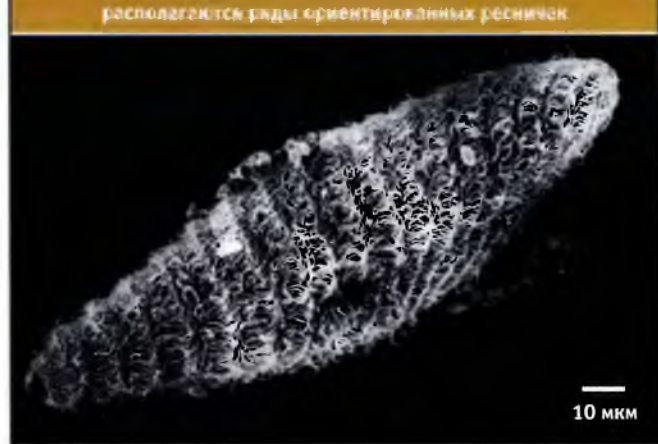
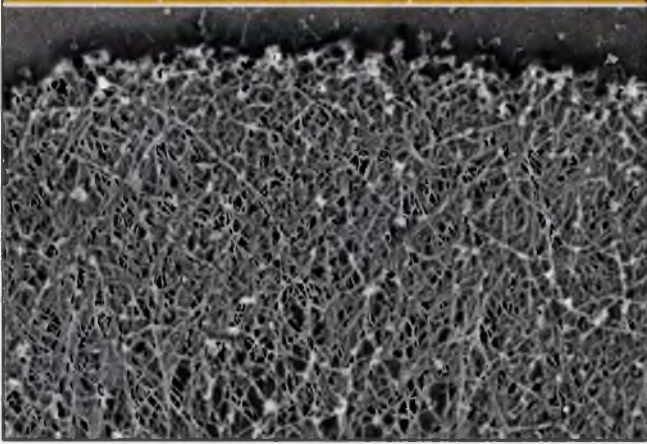
РИС. 1.29. Фотография фибробласта под флуоресцентным микроскопом. Микротрубочки окрашены специфическим красителем. Показано положение ядра и мембраны клетки. С разрешения Линн Кассимери, Университет Лихай



РИС. 1.30. Выросты нейрона содержат очень длинные микротрубочки. С разрешения Джинджер Витерс, Колледж Витмана



РИС. 1.31. В делящейся клетке присутствует веретено, образующееся из микротрубочек. На фотографии, сделанной во флуоресцентном микроскопе, микротрубочки, хромосомы и центриоли окрашены зеленым, синим и желтым соответственно. С разрешения Кристиана Роджи, Кембриджский университет



Фотография фибробласта в электронном микроскопе. По краю клетки видна сеть актиновых филаментов. С разрешения Татьяна М. Свиткина, Пенсильванский университет. По данным Motta, P.M. *Recent Advances in Microscopy of Cells, Tissues and Organs*. © 1997 by Antonio Delfino Editore—Roma

Рис. 1.33. Фотография парамеции, сделанная в сканирующем электронном микроскопе. Видны ряды ресничек. Из *The Journal of Cell Biology*, 1972, vol. 55, pp. 250–255, с разрешения The Rockefeller University Press

Актиновые филаменты не только пересекают клетку, но и переходят в специализированные структуры, являющиеся выростами клеточной поверхности, которые обеспечивают клетке движение. На рис. 1.33 показана актиновая сеть фибробласта. Движение осуществляется при выполнении механической работы, а энергия поставляется за счет гидролиза АТФ. Подвижность обеспечивается полимеризацией актиновой нити, что является важнейшим свойством клеток как одноклеточных, так и многоклеточных организмов.

Paramecium. На рис. 1.33 показано, что этот организм представляет собой клетку овальной формы, снабженную рядами ресничек, асимметрично расположенных на поверхности. В экспериментальных условиях можно получить клетку с противоположно ориентированными ресничками. Затем дочерние клетки, образующиеся при делении, наследуют инвертированную ориентацию ресничек. Расположение ресничек в основном отражает характер сборки микротрубочек на базальных тельцах и не связано с изменением структуры белковых субъединиц.

Чаще всего позиционные эффекты связаны с микротрубочками. Еще одна структура, которая присутствует в большинстве эукариотических клеток и построена из микротрубочек, — центриоль. Центриоли представляют собой небольшие белковые структуры, которые располагаются вблизи от ЦОМТ (центров организации микротрубочек), образующих полюса на концах клетки, где заканчиваются микротрубочки веретена. Как показано на рис. 1.34, новая центриоль всегда ориентируется в перпендикулярном направлении к уже существующей, что, по-видимому, объясняется существованием некоего матричного механизма. Это позволяет считать, что центриоль не образуется *de novo*, а возникает из существующей структуры. Вероятно, центриоль содержит информацию, необходимую для передачи наследственных свойств, однако эта информация прямо не переносится с ДНК. В данном случае прослеживается сходство с эпигенетическим эффектом PrP белков (см. 1.10 ДНК является наследственным материалом клетки, однако существуют другие формы передачи наследственной информации).

Развитие позиционных эффектов может начинаться уже со стадии яйца. Например, в яйце плодовой мушки существует градиент концентрации белков как в перед-

1.19 Важным фактором является локализация клеточных структур

Основные положения

- Локализация клеточных структур в определенных участках отражает часть наследственной информации клетки
- Позиционные эффекты играют важную роль на раннем этапе развития организма

Клетка обладает **позиционной информацией**. Выражается это в том, что некоторые ее структуры расположены на определенных местах. Особенно это проявляется на некоторых дифференцированных клетках. Например, у **поляризованных клеток** одна часть резко отличается от другой, и вещества могут избирательно транспортироваться через клетку в определенном направлении.

Организация новых структур может определяться ориентацией предсуществующих. Одни из первых экспериментов, которые проиллюстрировали это положение, были выполнены в 1960-х годах на простейших

Центриоли образуются, используя предсуществующие centrioles

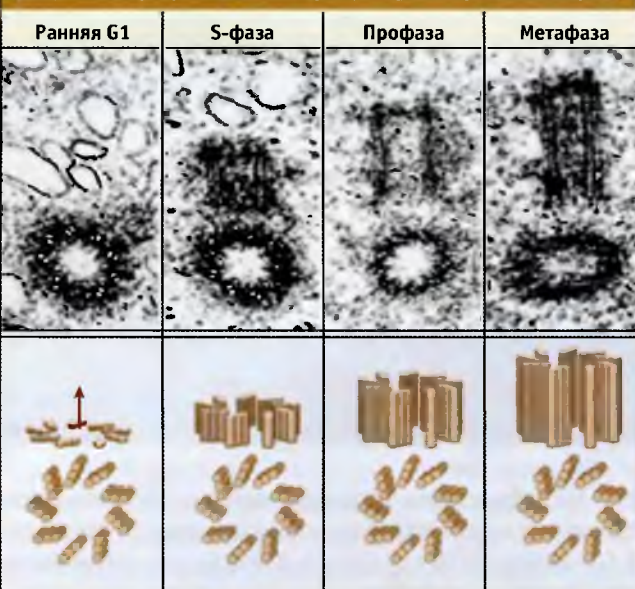


Рис. 1.34. Центриоли образуются, используя предсуществующие структуры в качестве матриц. Фотография любезно предоставлена J. B. Rattner and S. G. Phillips, University of Calgary. С разрешения *The Journal of Cell Biology*, vol. 57, pp. 359-372, by copyright permission of The Rockefeller University Press

не-заднем, так и в дорзо-вентральном (верхне-нижнем) направлении. Как показано на Рис. 1.35, эти градиенты образуются за счет питающих клеток, окружающих яйцо, и играют важную роль на ранних стадиях развития. При дальнейшем развитии яйца в женскую особь происходит регенерация системы, при которой каждый ооцит окружен питающими клетками, обуславливающими возникновение позиционной асимметрии. Таким образом, каждое поколение содержит позиционную информацию, которая передается в последующее поколение и представляет собой существенный компонент наследственной информации организма.

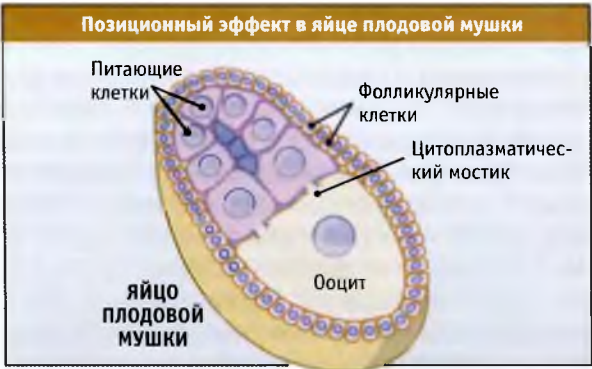


Рис. 1.35. Питающие клетки окружают ооцит и участвуют в переносе веществ, что создает асимметричность в распределении белков

1.20 За развитие определенного ответа клетки на внешние сигналы ответственны системы их передачи

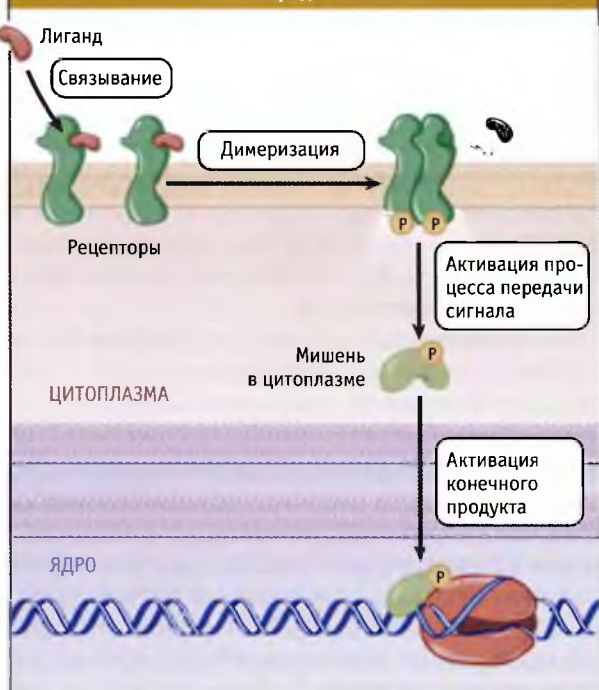
Основные положения

- События, происходящие за пределами клетки, могут запускать внутриклеточные процессы. Это происходит с участием рецепторных белков, встроенных в мембрану
- Рецептор проходит сквозь мембрану, и его домены расположены по обеим ее сторонам
- При связывании лиганда с внешним доменом рецептор активируется
- Связывание лиганда приводит к изменению структуры или функции внутреннего домена рецептора

Способность реагировать на внешнее окружение является важнейшим свойством каждой клетки. Для одноклеточных организмов внешнее окружение представляет собой внеклеточную среду. Реакция клетки может выражаться просто в усвоении питательных веществ или носит более сложный характер. Например, клетка может начать мигрировать по направлению к источнику питательных веществ. У многоклеточных организмов окружение создается с участием других клеток. Поэтому способность клеток взаимодействовать друг с другом становится особенно существенной в том случае, когда они приобретают специализированные функции, которые зависят от такого взаимодействия.

Простое перемещение молекул через клеточную мембрану представляет собой не единственный путь, посредством которого клетка реагирует на внешний сигнал. Запуск реакции внутри клетки на сигнал поступивший с внешней стороны мембраны осуществляется с помощью **системы передачи сигнала**. Как следует из Рис. 1.36, этот механизм усиливает сигнал и запускает в клетке цепь определенных метаболических процессов.

Характерная особенность всех систем передачи сигнала состоит в том, что определенный компонент окружающей среды узнается белком, находящимся в плазматической мембране. Компонент, который играет роль триггера, называется **лигандом**, а белок, встроенный в плазматическую мембрану, **рецептором**. Рецептор, встроенный в мембрану, и связывание лиганда с его внешним доменом запускает цепь событий, проводящих к активации внутриклеточного домена рецептора. Распространенный механизм, который реализуется при связывании лиганда, состоит в димеризации мономеров рецептора. При образовании димеров возникает ферментативная активность. Под действием фермента изменяются другие компоненты, образуются новые субстраты и запускается вся цепь метаболических процессов. После их завершения образуется активированный конечный продукт. На некоторых стадиях реакция может амплифицироваться и, таким образом, при одном акте



Связывание лиганда с рецептором на поверхности

клетки запускает процессы передачи сигнала, в результате чего в клетке развивается ответная реакция

взаимодействия лиганда с рецептором может образоваться много копий конечного продукта. Последний влияет на экспрессию генов или же вызывает в клетке структурные изменения.

Ответ клетки зависит от характера сигнала. Когда вблизи бактерии оказывается источник питательных веществ, то возникает каскадная цепь процессов. Все начинается с взаимодействия питательного компонента с рецептором и завершается движением жгутиков, с помощью которых бактерия продвигается к источнику питания. Когда дрожжевая клетка, способная к спариванию, узнает небольшой полипептидный феромон, секретируемый другой клеткой, то система передачи сигнала запускает каскад событий, в результате чего две клетки начинают расти навстречу друг другу и сливаются.

У многоклеточных системы передачи сигнала могут быть взаимосвязаны с тем, чтобы обеспечить согласованный физиологический ответ организма. Когда животное получает пищу, содержание сахара в крови увеличивается. Сахар запускает каскад процессов передачи сигнала в клетках островков поджелудочной железы, в результате чего они начинают секретировать полипептидный гормон, инсулин. Инсулин связывается с рецепторами, расположенными на большинстве клеток, и запускает процесс, позволяющий им усваивать сахар из крови. Последний запасается в виде гликогена, который служит источником энергии для организма.

1.21 Все организмы состоят из клеток, способных к росту и делению

Основные положения

- У некоторых органелл проявляются признаки простейшей формы деления. При этом участок мембраны органеллы втягивается внутрь
- Бактерии часто делятся, образуя жесткую поперечную перегородку, которая представляет собой продолжение клеточной стенки
- У клеток эукариот в митозе происходят процессы реорганизации с образованием специализированных структур веретена. С помощью веретена хромосомы распределяются по дочерним клеткам

После того как клетка вдвое увеличилась в размере, основным признаком, свидетельствующим о возможности ее размножения, является деление с образованием двух клеток. При участии специального механизма происходит сегрегация двух копий генетического материала клетки. Этот механизм обеспечивает попадание одной копии в каждую дочернюю клетку. Остальные компоненты, находящиеся в цитоплазме, стохастически распределяются между двумя клетками. Для клеток эукариот существенным оказывается процесс воспроизведения внутренних компартментов с тем, чтобы они могли распределиться между дочерними клетками. При этом компартменты могут диссоциировать на компоненты, которые впоследствии собираются образуя дочерние компартменты. Также может происходить физическое деление родительского компартмента, с образованием принципиально идентичных частей.

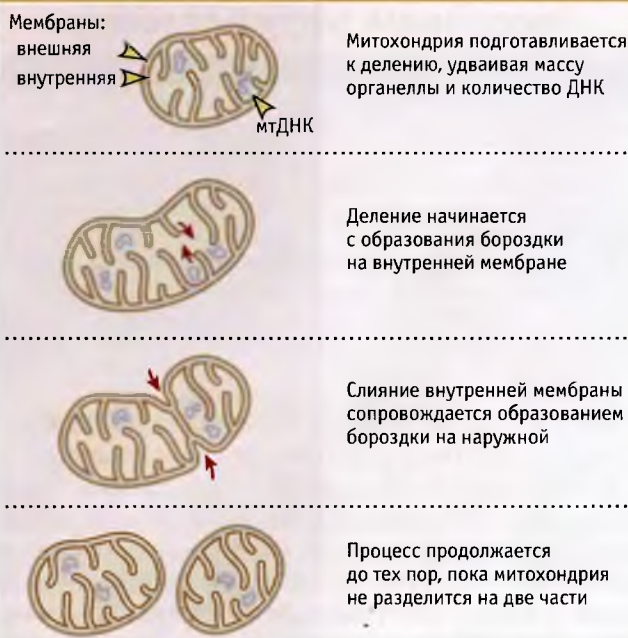
Если мы рассматриваем деление органелл вместе с делением бактерий и эукариотических клеток, то основные механизмы этого процесса можно подразделить на три общие группы.

Простейшую форму деления представляет деление митохондрий в некоторых клетках. При этом мембрана органеллы втягивается внутрь, и процесс очень напоминает образование мембранных везикул. На рис. 1.27 иллюстрирует работу этого механизма при делении родительской митохондрии (см. [МБИО:1-0008](#)). Этот механизм, возможно, является наиболее древним с эволюционной точки зрения, и отражает способ деления древних бактерий, из которых произошли митохондрии.

У бактерий и архей часто основную роль играет механизм, связанный с изменениями в клеточной стенке. Вначале копия каждой дочерней хромосомы перемещается к противоположным концам клетки, а затем при наращивании мембраны и образовании поперечной перегородки происходит деление клетки. В большинстве случаев в делении участвует белок FtsZ, однако иногда в нем принимают участие другие компоненты (см. [МБИО:1-0009](#)).

При делении эукариотической клетки происходит ее полная структурная реорганизация. Наблюдается разрушение ядерной оболочки, равные хромосомные наборы мигрируют к противоположным частям клетки, и она делится на две дочерних, в каждой из которых вновь формируется внутриклеточная структура. Наибо-

Модель, иллюстрирующая рост и деление митохондрий



Для того, чтобы из одного компартмента образовалось два дочерних, мембрана митохондрии образует перетяжку

более характерной особенностью **митоза** является разрушение оболочки ядра. В результате, вместо компартментов в клетке образуется одна структура, называемая веретеном. Индивидуальные хромосомы компактизуются и затем присоединяются к структурам, обеспечивающим локализацию каждой дочерней хромосомы из пары на одной из сторон экватора веретена. Критический этап в эволюции мог состоять в приобретении способности к связыванию хромосом со структурами аппарата деления. Этот аппарат участвует в реализации механизмов деления, однако существуют также способы контроля клеточного цикла, позволяющие клетке установить момент начала деления.

Когда выше мы давали определение клетки, то в качестве одного из ее свойств мы называли способность к делению с образованием копии себе подобной. Хотя это остается справедливым для клеток одноклеточных организмов, уровень специализации, которого достигли клетки у многоклеточных, требует расширения базовых понятий. Термин **дифференцировка** описывает процесс, посредством которого клетка приобретает новый фенотип, или же дает начало предшественникам клеток, которые по фенотипу отличаются от родительской.

Под **развитием** организма подразумевают процесс, в результате которого исходная клетка (оплодотворенный ооцит в случае млекопитающих) путем последовательных делений превращается в организм, состоящий из клеток различных типов. Оплодотворенная зигота обладает **тотипотентностью**, т. е. из нее способны образовываться все клетки организма. Процесс развития можно рассматривать как наложение неких дополнительных ограничений на свойства образующихся клеток. В результате этих ограничений клетки могут развиваться, образуя лишь определенный тип клеток.

Поскольку существуют многоклеточные организмы, состоящие из специализированных тканей, необходимо различать два типа клеток. К **соматическим** относятся все клетки организма, за исключением **герминативных**. Соматические клетки предназначены для выполнения в организме определенных функций и не участвуют в процессе воспроизводства организма. У млекопитающих они являются диплоидными клетками (т. е. содержат один материнский и один отцовский набор генетического материала). Следующее поколение организма формируется при участии специализированных герминативных клеток. Эти клетки существуют для каждого пола отдельно и являются гаплоидными: сперматозоиды и ооциты содержат по одному набору генетического материала.

В период развития и существования взрослого организма некоторые клетки сохраняют способность к воспроизводству любых клеток различных тканей, в то время как другие образуют лишь родственные клетки или не образуют никаких. Клетки, обладающие широкими возможностями к регенерации, называются **стволовыми**. Например, клетки иммунной системы произошли от иммунных стволовых клеток. Основной вопрос биологии состоит в том, существуют стволовые клетки только при развитии организма или же они сохраняются и в зрелом возрасте.

При развитии ткани происходит серия процессов дифференцировки клеток, при которых они продолжают изменять свой фенотип до тех пор, пока не образуются все необходимые типы. По завершении этого процесса некоторые клетки могут утратить способность к делению и превратиться в **терминально дифференцированные**. Клетки

1.22 В процессе дифференцировки образуются различные специализированные клетки, включая терминально дифференцированные

Основные положения

- Многоклеточный организм состоит из различных типов клеток, которые выполняют специализированные функции
- Многие дифференцированные клетки утратили способность к делению и/или к образованию клеток других типов
- Стволовые клетки способны к делению с образованием различных типов клеток, которые необходимы для построения тканей организма

также могут стареть и умирать. Многие соматические клетки являются терминально дифференцированными. К их числу относятся и половые клетки, хотя они обладают уникальной способностью образовывать зиготу, которая способна к делению.

Терминально дифференцированные клетки могут проявлять настолько необычные свойства, что возникает вопрос, применимо ли к ним определение самого понятия клетка. У млекопитающих дифференцировка эритроцитов приводит к потере ядра. Клетка представляет собой не более чем мембрану, которая внутри содержит раствор гемоглобина и форма которой поддерживается сетью волокон актина и спектрина. Поскольку эритроцит произошел из полностью функциональной клетки, мы рассматриваем его как клетку, хотя и утратившую почти все характерные признаки.

Широко обсуждается вопрос, происходят ли при дифференцировке клеток постоянные изменения их генетической программы или же ограничения на развитие фенотипа носят исключительно эпигенетическую природу? Возможность клонирования организмов при помещении ядра соматической клетки в ооцит дает однозначный ответ на этот вопрос: почти каждая клетка организма сохраняет генетическую информацию, необходимую для поддержания процесса развития. (Исключение составляют клетки с измененным генетическим материалом, например клетки, продуцирующие антитела, или утратившие генетическую информацию (эритроциты).)

Список литературы

1.2 Жизнь началась с самовоспроизводящейся биологической структуры

Исследования

Chen, I. A., Roberts, R. W., and Szostak, J. W., 2004. The emergence of competition between model protocells. *Science* v. 305 p. 1474–1476.

1.9 Клетки внутри клеток: органеллы, обладающие оболочкой, могут возникнуть в результате эндосимбиоза

Обзор

Brown, J. R. and Doolittle, W. F., 1997. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 61 p. 456–502.
Lang, B. F., Gray, M. W., and Burger, G., 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* v. 33 p. 351–397.

1.10 ДНК является наследственным материалом клетки, однако существуют другие формы передачи наследственной информации

Обзор

Wickner, R. B., Edskes, H. K., Roberts, B. T., Baxa, U., Pierce, M. M., Ross, E. D., and Brachmann, A., 2004. Prions: proteins as genes and infectious entities. *Genes Dev.* v. 18 p. 470–485.

1.19 Важным фактором является локализация клеточных структур

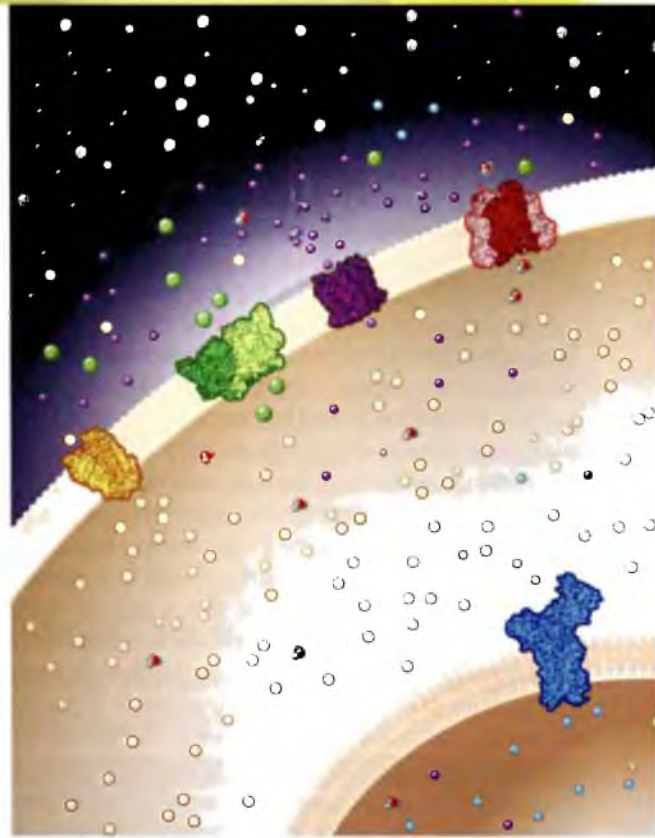
Исследования

Sonneborn, T. M., 1970. Gene action in development. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 176 p. 347–366

Транспорт ионов и небольших молекул через мембраны

Стивен Е. Леннарт и Эндрю Р. Маркс
Колумбийский университет, Нью-Йорк, НЙ

Схематическое изображение кристаллической структуры транспортных белков прокариотической и эукариотической клетки, встроенных в мембраны



КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛАВЫ

- 2.1** Введение
 - 2.2** Основными типами транспортных мембранных белков являются каналы и переносчики
 - 2.3** На величину потока ионов через трансмембранные поры влияет степень гидратации
 - 2.4** Электрохимический градиент по обеим сторонам мембраны создает мембранный потенциал
 - 2.5** K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов
 - 2.6** Различные K^+ -каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам
 - 2.7** Потенциал-зависимые Na^+ -каналы активируются при деполяризации мембраны и транслируют электрические сигналы
 - 2.8** Эпителиальные Na^+ -каналы регулируют гомеостаз Na^+
 - 2.9** Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны активируют внутриклеточные функции
 - 2.10** Cl^- -каналы выполняют различные биологические функции
 - 2.11** Селективный транспорт воды происходит через аквапориновые каналы
 - 2.12** Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов
 - 2.13** Сердечная и скелетные мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения
 - 2.14** Некоторые белки осуществляют перенос глюкозы за счет унипортного транспорта
 - 2.15** Сопряженный транспорт осуществляется за счет процессов симпорта и антипорта
 - 2.16** Для функционирования многих переносчиков необходимо существование трансмембранного градиента ионов Na^+
 - 2.17** Некоторые переносчики Na^+ регулируют pH в цитозоле и во внеклеточной среде
 - 2.18** Ca^{2+} -АТФаза закачивает Ca^{2+} во внутриклеточные депо
 - 2.19** Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану
 - 2.20** F_1F_0 -АТФ-синтаза вызывает сопряжение движения H^+ с синтезом или гидролизом АТФ
 - 2.21** H^+ -АТФазы переносят протоны из цитозоля
 - 2.22** Что дальше?
 - 2.23** Резюме
 - 2.24** Приложение: Вывод и применение уравнения Нернста
 - 2.25** Приложение: Большинство K^+ -каналов способны обеспечивать входящее выпрямление
 - 2.26** Приложение: Мутации в генах белков анионного канала вызывают кистозный фиброз
- Список литературы

2.1 Введение

Основные положения

- Клеточные мембраны разделяют различные по составу компартменты
- Липидный бислой биологических мембран обладает очень низкой проницаемостью для большинства биологических молекул и ионов
- Большинство веществ проходит через мембрану при участии транспортных белков
- Транспорт ионов и других метаболитов через мембрану контролирует электрические и метаболические функции клетки

Биологические мембраны представляют собой избирательно проницаемые барьеры, которые окружают клеточные компартменты. Плазматическая мембрана отделяет содержимое клетки от внешней среды, а в клетках эукариот специализированные компартменты отделены от цитозоля дополнительными мембранами (см. рис. 1.9). Клеточные компартменты существенно различаются по составу мембран и внутренней среды. В ходе эволюции клетки выработали механизм для поддержания и регулирования состава среды в каждом компартменте. Поддержание определенной концентрации растворенных веществ по обеим сторонам мембраны является необходимым условием существования гомеостаза, который представляет собой способность клетки к поддержанию относительного постоянства состава внутренней среды, обеспечивающей протекание жизненно необходимых метаболических процессов. В результате гомеостати-

ческой регуляции концентрации ионов в цитозоле по обеим сторонам мембраны создается относительное осмотическое давление, которое регулирует клеточный объем. Более того, быстро наступающие изменения в транспорте ионов через мембраны носят временный характер и используются клеткой как механизм адаптации к изменившимся обменным процессам и для обработки информации (например, сигналов стресса), а также для транспорта в клетку питательных веществ или удаления из нее продуктов обмена.

Поскольку внутренняя часть липидного бислойа обладает гидрофобными свойствами, она непроницаема для полярных, гидрофильных и крупных биологических молекул (). Каким образом неорганические ионы, а также заряженные молекулы и водорастворимые соединения селективно проходят через клеточные мембраны? Сейчас мы знаем, что транспорт ионов и метаболитов через мембраны клеточных компартментов происходит с участием мембранных белков. Транспортные белки локализованы в плазматической мембране, а также в мембранах внутриклеточных органелл, например эндоплазматического ретикула, аппарата Гольджи, эндосом, лизосом и митохондрий. Для каждого типа мембран, так же как и для каждого типа клеток, характерен определенный набор транспортных белков. В данной главе мы рассмотрим мембранные белки, которые принимают участие в транспорте ионов и небольших молекул, таких как глюкоза. Вначале мы остановимся на основных классах мембранных транспортных белков (см. 2.2 Основными типами транспортных мембранных белков являются

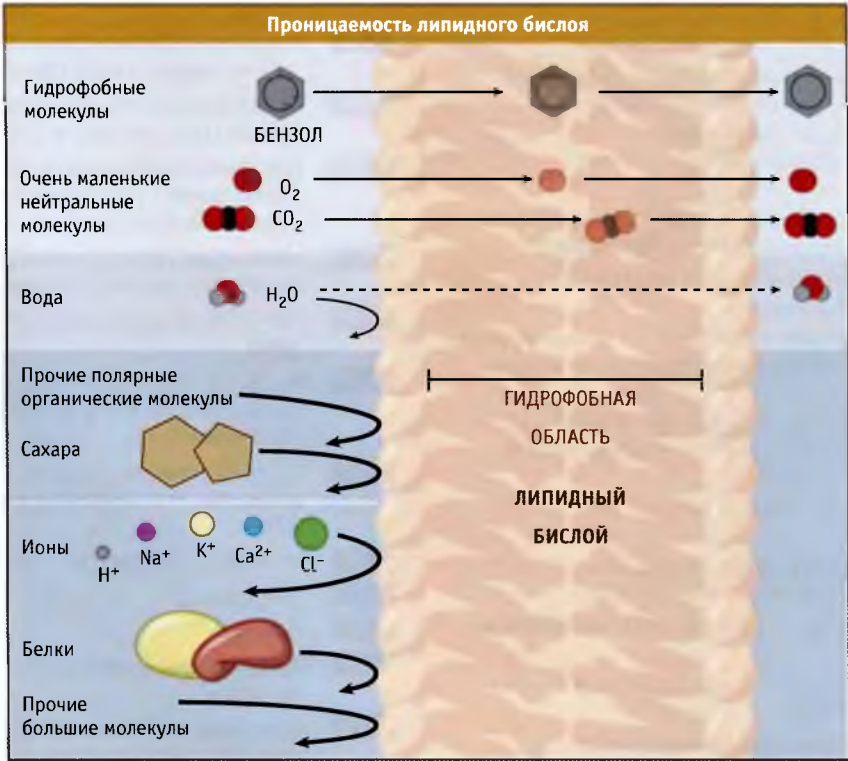


Рис. 2.1. Проницаемость липидного бислойа для биологически важных молекул

каналы и переносчики), а затем более подробно расскажем о строении и функции отдельных белков. Мы также обсудим вопросы совместного функционирования различных типов транспортных белков в клетке. Вопросы транспорта в клетку и выхода из нее белков (и других больших молекул) обсуждаются в других главах (см. 3 Мембранное адресование белков, 4 Перемещение белков между мембранами и 5 Структура ядра и процессы транспорта).

Большая часть настоящей главы посвящена транспорту ионов через мембрану. Клетка использует мембранные белки для поддержания определенной концентрации ионов во внутренней среде. Эта концентрация отличается от той, в которой они находятся во внеклеточной среде (). Различие в концентрации является причиной того, что в покое живых клеток внутренняя среда заряжена отрицательно по отношению к внешней среде. Эти различия в концентрации и заряде создают **электрохимический градиент**, который клетка использует для запаса энергии (о физических свойствах ионов и о мембранном потенциале см. 2.3 На величину потока ионов через трансмембранные поры влияет степень гидратации и 2.4 Наличие электрохимического градиента на мембране создает мембранный потенциал). Регуляция электрохимического градиента на мембране позволяет клетке осуществлять ряд основных функций, таких как выработка энергии, а также обрабатывать электрические сигналы поступающие в клетку и выходящие из нее (см. 2.19 Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану, 2.20 F_1F_0 -АТФ-синтетаза осуществляет сопряжение транспорта H^+ с синтезом и гидролизом АТФ и 2.12 Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов, соответственно).

В главе также рассмотрены некоторые методы, позволяющие изучать мембраны. Поток заряженных частиц (ионный ток) через мембрану регистрируется электрофизиологическими методами. Этими методами можно исследовать как клетку целиком, так и фрагменты ее мембраны. Они также позволяют оценивать влияние различ-

ных воздействий, например изменение ионного состава, эффекты ингибиторов или активаторов транспорта. Впервые ионные каналы были идентифицированы и выделены благодаря использованию природных токсинов (ядов), которые являются ингибиторами их функций. Эти токсины были также использованы в качестве инструмента для изучения функционирования каналов. Взаимосвязь между структурой и функцией каналов изучалась с использованием рекомбинантных транспортных белков, сайт-специфического мутагенеза, техники интеграции очищенных белков в искусственные мембраны и экспрессии транспортных белков в гетерологичных клетках. Выяснение атомарной структуры части транспортных белков во многом способствовало пониманию их функционирования. Наряду с выяснением деталей мембранного связывания и транспорта метаболитов эти «фотографии» структуры помогают построить общие модели процессов трансмембранного транспорта.

2.2 Основными типами транспортных мембранных белков являются каналы и переносчики

Основные положения

- Существует два основных типа мембранных транспортных белков: каналы и переносчики
- Ионные каналы катализируют быстрый и избирательный транспорт ионов по электрохимическому градиенту
- Транспортёры и насосы представляют собой белки-переносчики, которым необходима энергия для транспорта веществ против электрохимического градиента
- В каждой клетке несколько различных мембранных транспортных белков действуют как единое целое

Некоторые из транспортных белков находятся в плазматической мембране, в то время как другие входят в состав мембраны клеточных органелл. Для поддержания определенного состава внутриклеточной среды и клеточных компартментов необходимо, чтобы транспортные белки обладали **избирательностью** по

Концентрация ионов в животной клетке и во внеклеточной среде				
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻
Концентрация во внеклеточной среде (мМ)	145	4	1,5	123
Концентрация внутри клетки (мМ)	12	155	10 ⁻⁴	4,2

Рис. 2.2. Градиент концентрации различных ионов, существующий по обе стороны мембраны клетки скелетных мышц млекопитающих. Показаны относительные атомные радиусы ионов в негидратированном состоянии

отношению к определенным метаболитам. В зависимости от характера процесса транспорта мембранные транспортные белки подразделяются на две группы: **каналы и переносчики** (рис. 2.3). Канальные белки содержат поры, через которые при открытом канале с высокой скоростью проходят метаболиты. Белок-переносчик связывает метаболит, находящийся по одну сторону мембраны, после чего конформация его меняется, и метаболит высвобождается с другой стороны мембраны.

Существует несколько типов белков, образующих каналы в мембранах. Порины, присутствующие в клетках некоторых прокариот, в митохондриях и в некисах, где соединяется цитоплазма соседних клеток, обеспечивают прохождение метаболитов в соответствии с размером их молекул (см. 15.21 *Щелевые контакты обеспечивают прямой перенос молекул между смежными клетками*). К более селективным каналам относятся комплексы ядерных пор и каналы, обеспечивающие перемещение белков через мембрану эндоплазматического ретикула (см. 5 *Строение ядра и ядерный транспорт* и 3 *Мембранное позиционирование белков*). В данной главе будут рассмотрены ионные каналы и аквапорины, через которые осуществляется селективный трансмембранный перенос ионов и молекул воды соответственно. К настоящему времени описано более 100 различных типов канальных белков. Все они обладают следующими характеристиками:

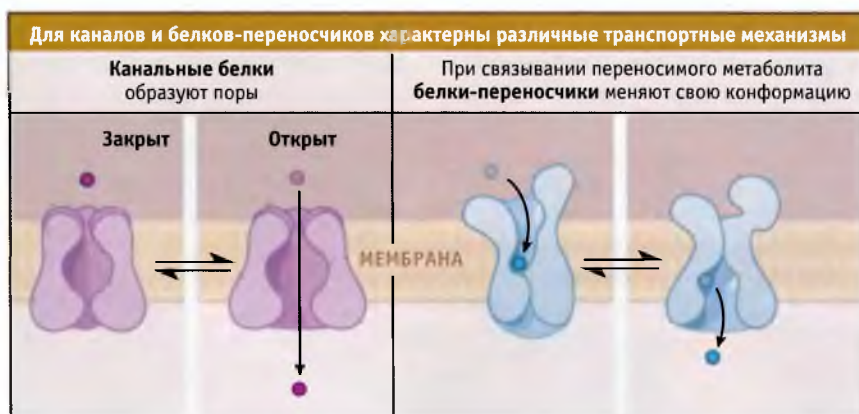
- селективностью по отношению к переносимому метаболиту,
- высокой скоростью переноса метаболита и
- воротным механизмом, регулирующим транспорт метаболитов.

Участок канального белка, через который осуществляется трансмембранный транспорт, называется **порой канала**. Канал может находиться в нескольких различ-

ных конформациях. Некоторые каналы состоят из одного белка, трансмембранные сегменты которого образуют пору. Другие существуют в виде олигомеров, состоящих из идентичных или разных субъединиц, которые вместе образуют пору. Наконец существуют каналы, состоящие из двух и более субъединиц, каждая из которых сама образует пору. Часто комплексы олигомеров каналов регулируются или позиционируются на определенных мембранах с участием дополнительных субъединиц.

Большинство канальных белков обладают высокой селективностью в отношении определенных метаболитов, например ионов натрия (Na^+), калия (K^+), кальция (Ca^{2+}), хлорида (Cl^-) или воды. Другие канальные белки являются неселективными катионными или анионными каналами. Как будет показано далее, при рассмотрении свойств специфических канальных белков, их поры характеризуются определенными структурными особенностями, т. е. являются селективным фильтром, который позволяет им проявлять избирательность по отношению к различным метаболитам.

Направление потока ионов растворенных веществ через канал определяется электрохимическим градиентом. Иными словами, метаболиты движутся через канал в энергетически-выгодном направлении, т. е. по электрохимическому градиенту. Например, для покоящейся клетки, схематически изображенной на рис. 2.2, существует направленный в клетку ионный поток через Na^+ -, Ca^{2+} -, Cl^- -каналы, и противоположный, проходящий через K^+ -каналы. Так как других источников энергии, кроме электрохимического градиента, в данном случае не используется, то такой тип транспорта называется пассивным. Канальные белки обеспечивают высокую скорость транспорта. Так, для ионных каналов скорость составляет 10^8 в 1 с, что близко к максимальной скорости диффузии ионов в водной среде.



2.3. Каналы и переносчики представляют собой два основных типа белков мембранного транспорта. Растворенные метаболиты с максимальной скоростью диффундируют через пору каналов, а переносчики связывают метаболит с одной стороны мембраны, затем претерпевают конформационные изменения и высвобождают его с другой стороны. Этот процесс протекает значительно медленнее.

Транспортные мембранные белки контролируют различные клеточные функции при участии **воротного механизма**. В основе этого механизма лежит индукция конформационных изменений в белке в ответ на воздействие определенного стимула. Эти изменения приводят к открытию или закрытию канала. Например, открытие и закрытие ионных каналов могут регулироваться лигандами, величиной электрического потенциала, механическими или температурными воздействиями. Активация каналов может происходить очень быстро, что делает их идеальным инструментом обработки поступающих в клетку сигналов. Например, передача нервного импульса зависит от электрического заряда, который создается ионным каналом в мембране. Каналы также играют важную роль в регуляции объема клетки и внутриклеточного pH, в транспорте солей и воды через эпителиальные клетки, в закислении внутриклеточных органелл и во внеклеточной передаче сигналов.

При транспорте субстратов против градиента концентрации, белки-переносчики используют свободную энергию электрохимического градиента, АТФ или других источников. Поскольку при этом происходит потребление энергии, процесс носит название активный транспорт. Белки-переносчики подразделяются на две группы, **транспортёры и насосы** (рис. 2.5). Для транспортировки субстратов через мембрану транспортёры используют энергию электрохимического градиента. Они подразделяются на **унипортеры, симпортеры** (или котранспортеры) и **антипортеры** (обменники). Для энергозависимого транспорта метаболитов мембранные насосы используют энергию, например высвобождающуюся при гидролизе АТФ. По сравнению с канальными белками, переносчики характеризуются более медленной скоростью транспорта, порядка 1000 молекул в 1 с.

Различают два типа активного транспорта, **первичный** и **вторичный**. Белки-переносчики, осуществляю-

щие первичный активный транспорт, в качестве источника энергии используют АТФ и транспортируют метаболиты против электрохимического градиента. Таким образом, они помогают поддерживать градиент концентрации метаболитов по обеим сторонам мембран клетки. Ca^{2+} -АТФаза и Na^+/K^+ -АТФаза являются характерными примерами транспортных насосов, которые управляют процессом первичного активного транспорта (см. 2.18 *Ca^{2+} -АТФаза закачивает Ca^{2+} во внутриклеточное депо* и 2.19 *Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану*). Белки-переносчики, которые участвуют во вторичном активном транспорте, непосредственно не используют энергию АТФ. Вместо этого они используют свободную энергию электрохимического градиента, который возникает за счет первичного активного транспорта. Вторичный активный транспорт происходит с участием симпортеров и антипортеров (см. 2.15 *Сопряженный транспорт осуществляется за счет процессов симпорта и антипорта*). Механизмы транспорта метаболитов представлены на рис. 2.5.

В клетке все типы мембранных транспортных белков-каналы, транспортёры и насосы-функционируют совместно. Таким образом, работа какого-либо одного типа транспортного белка зависит от работы других. В данной главе мы рассмотрим несколько примеров такого взаимодействия транспортных белков. Например, ионный градиент по обеим сторонам мембраны поддерживается за счет сложных взаимодействий между различными типами транспортных белков. Для правильного функционирования эпителиальных клеток, например почек, слизистой кишечника и легкого, необходимо протекание транспортных процессов с участием различных ионов и метаболитов. Мы также рассмотрим роль нарушений процессов транспорта в развитии различных заболеваний.



Транспортеры и насосы представляют собой два основных типа белков-переносчиков. Транспортеры делятся на три типа, каждый из которых осуществляет один из типов переноса: унипорт, симпорт, или антипорт. Показано направление электрохимического градиента через мембрану. В зависимости от типа белка-переносчика транспорт может происходить или в направлении градиента (от высокой концентрации к низкой), или против него

ПАССИВНЫЙ	АКТИВНЫЙ
В направлении электрохимического градиента (энергии не требуется)	Против электрохимического градиента (необходима энергия)
Диффузия	Мембранные насосы или АТФазы
Облегченная диффузия (каналы, унипорт, сопряженный транспорт)	Эндоцитоз
Перенос среды, в которой растворен метаболит, носит вторичный характер по отношению к трансэпителиальному транспорту	

2.3 На величину потока ионов через трансмембранные поры влияет степень гидратации

Основные положения

- Соли, растворенные в воде, диссоциируют на гидратированные ионы
- Гидрофобные свойства липидного бислоя создают барьер при движении гидратированных ионов через мембрану
- Ионные каналы катализируют процесс частичной дегидратации ионов. Это обеспечивает их быстрый и селективный транспорт через мембраны
- Процесс дегидратации ионов является энергезависимым. Напротив, при их гидратации происходит высвобождение энергии

Поскольку липидный бислой мембраны обладает гидрофобными свойствами, заряженные ионы самостоятельно через нее не проходят (см. рис. 2.1). Для транспорта через мембрану ионы должны пройти через специальные трансмембранные белки: ионные каналы и переносчики. В этом разделе мы рассмотрим некоторые физические свойства ионов в растворе и их влияние на процесс транспорта.

Ионы в растворе находятся в гидратированном состоянии, т. е. окружены молекулами воды. Ионы, заряженные положительно или отрицательно, притягивают молекулы-диполи воды, частичный отрицательный заряд которых создается атомом кислорода, а частичный положительный — атомами водорода (см. В10:2-0001). Гидратация ионов, например, обуславливает быстрое растворение кристаллов NaCl в воде. Этот процесс выгоден с энергетической точки зрения, поскольку молекулы воды присоединяются к свободным ионам Na^+ и Cl^- .

Молекулы воды образуют вокруг ионов слой, называемый **гидратной оболочкой**. За счет этого заряд иона, находящегося в растворе, частично нейтрализуется. Таким образом, бислой мембраны служит эффективным барьером, не пропускающим гидратированные ионы. Поскольку гидратация ио-

нов является энергетически выгодным процессом, для удаления гидратной оболочки и проникновения иона в гидрофобное окружение липидного бислоя необходимо довольно большое количество энергии. В процессе трансмембранного транспорта ионные каналы помогают преодолеть этот энергетический барьер.

Форма гидратной оболочки зависит от размера и заряда ионов. Диполи воды ориентируются по отношению к катионам и анионам в соответствии с их зарядом и размерами. По сравнению с крупными ионами, более мелкие, имеющие такой же заряд, характеризуются большей степенью его локализованности, что приводит к более высокой **плотности заряда** на мелких ионах. Более высокая плотность заряда создает более сильное электрическое поле, которое притягивает больше молекул воды, и, таким образом, толщина гидратной оболочки увеличивается. Поэтому у меньшего по размеру иона гидратная оболочка больше, чем у более крупного иона, обладающего тем же зарядом. Следовательно, при проникновении через поры канала мелкие ионы характеризуются большим эффективным радиусом.

Какую роль играет степень гидратации в процессах ионного транспорта? Ионные каналы создают окружение, которое напоминает заполненные водой поры и, таким образом, по мере транспорта ионов по каналу облегчается их частичная дегидратация. Продвигаясь по каналу, ион образует слабые электростатические связи с заряженными остатками аминокислот, которые имитируют гидратную оболочку. Тем самым процесс транспорта становится энергетически выгодным и в то же время приобретает селективность. Селективность ионного канала зависит от его способности катализировать энергетически выгодный процесс частичной дегидратации определенных ионов. Это достигается за счет специфических размеров канала и наличия специфических сайтов связывания ионов (более детальное обсуждение этих вопросов см. 2.5 *K⁺-каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов*).

2.4 Электрохимический градиент по обеим сторонам мембраны создает мембранный потенциал

Основные положения

- Мембранный потенциал возникает за счет электрохимического градиента, который существует по обеим сторонам мембраны, селективно проницаемой для ионов
- Величина мембранного потенциала как функции концентрации ионов рассчитывается по уравнению Нернста
- В клетке поддерживается отрицательное значение мембранного потенциала покоя. При этом внутренняя среда клетки, по сравнению с внешней, характеризуется несколько большим отрицательным зарядом
- Существование мембранного потенциала является необходимым условием генерации электрических сигналов, а также направленного транспорта ионов через мембрану

Важным свойством клеток является способность поддерживать такие внутриклеточные концентрации метаболитов, которые существенно отличаются от их содержания во внеклеточной среде. В случае ионов, различия в их концентрации по обеим сторонам мембраны приводят к различиям в электрическом заряде: внутриклеточная среда заряжена несколько более отрицательно, чем среда снаружи клетки. Совместное действие разности зарядов и концентраций приводит к возникновению электрохимического градиента. Электрохимический градиент поддерживается за счет действия селективных каналов и белков переносчиков в плазматической мембране.

Для того чтобы понять, каким образом возникает электрохимический градиент, вначале рассмотрим простой случай, когда мембрана оказывается проницаемой только для одного вида ионов. На рис. 2.6 представлены два компартмента, А и В, разделенные тонкой мембраной. Эти компартменты содержат раствор KCl разной концентрации. В растворе хлорид калия диссоциирован на гидратированные ионы K^+ и Cl^- . Поскольку оба компартмента содержат эквимолярные концентрации ионов, то каждый обладает нейтральным зарядом. Если бы мембрана была непроницаема для ионов, то величина ее электрического потенциала, измеренная с помощью вольтметра, равнялась бы нулю.

Теперь рассмотрим случай, когда мембрана проницаема только для ионов калия (например, когда в мембране находятся K^+ -каналы) (см. рис. 2.6). Диффузия растворенных веществ по градиенту концентрации является энергетически выгодным процессом (выражается в виде отрицательной величины разности энергии ΔG). Поэтому ионы K^+ будут диффундировать в сторону более низкой их концентрации, т. е. из компартмента В в компартмент А. При этом распределение заряда на мембране будет меняться. По мере накопления в компартменте А положительно заряженных ионов, возрастают силы отталкивания между ними. Эти силы затрудняют переход ионов K^+ в компартмент А. Когда в системе достигается электрохимическое равновесие, градиенты концентрации и электрических зарядов взаимно уравновешиваются, и движение ионов K^+ через мембрану прекращается. При этом транспорт ионов K^+ из одного компартмента сдерживается их транспортом из другого компартмента.

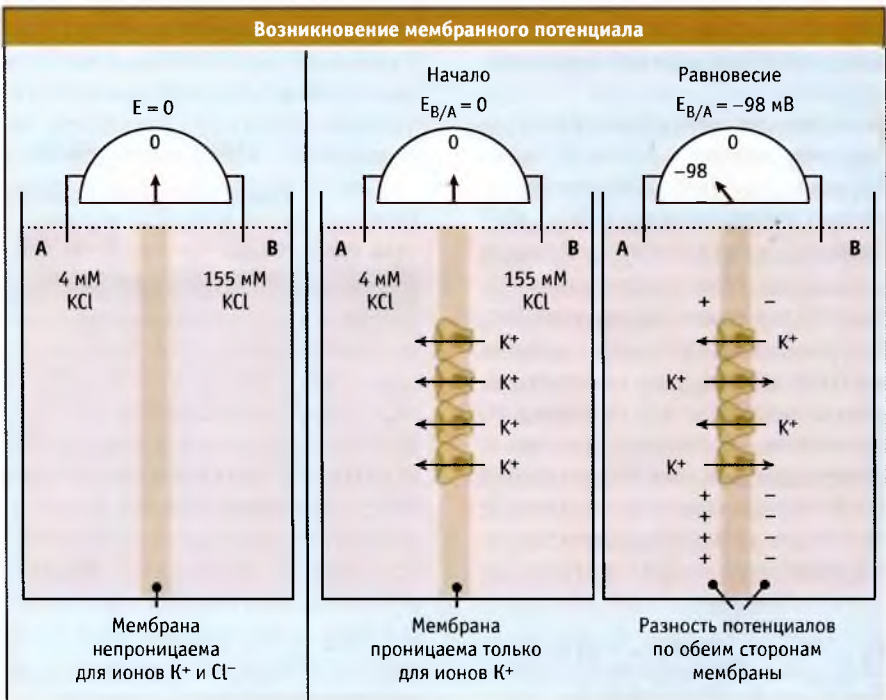


Рис. 2.6 Селективное передвижение ионов через мембрану вызывает изменение мембранного потенциала

Однако в компартменте А содержится больше положительно заряженных ионов, чем в компартменте В. Этот избыток ионов K^+ (в компартменте А) взаимодействует с избытком ионов Cl^- (в компартменте В) через тонкую мембрану, в результате чего по обеим ее сторонам выстраиваются электрические заряды. Разница зарядов по обеим сторонам мембраны выражается в виде разности потенциалов и называется **мембранный потенциал**. Равновесный (мембранный) потенциал компартмента В по отношению к компартменту А имеет отрицательное значение. Этот пример иллюстрирует необходимость наличия двух условий, необходимых для возникновения мембранного потенциала клетки, не равного нулю:

- различные концентрации ионов по обеим сторонам мембраны, которые приводят к разделению зарядов и
- мембрана, обладающая селективной проницаемостью по крайней мере к одному виду ионов.

Поэтому величина мембранного потенциала является функцией концентрации ионов. В состоянии равновесия эту функцию для ионов X можно выразить количественно с помощью уравнения Нернста:

$$E_X = 2,3 \frac{RT}{zF} \log_{10} \frac{[X]_B}{[X]_A}$$

- E — равновесный потенциал (в вольтах)
- R — универсальная газовая постоянная (2 кал моль $^{-1}$ K $^{-1}$)
- T — абсолютная температура (K; 37 °C = 307,5 K)
- z — валентность ионов (электрический заряд)
- F — число Фарадея ($2,3 \times 10^4$ кал вольт $^{-1}$ моль $^{-1}$)
- $[X]_A$ — концентрация свободных ионов X в компартменте А
- $[X]_B$ — концентрация свободных ионов X в компартменте В

В формировании мембранного потенциала в клетках животных, главным образом, участвуют ионы K^+ , Na^+ и Cl^- (см. рис. 2.2, на котором представлена концентрация различных ионов в клетках скелетных мышц). Ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} в меньшей степени участвуют в формировании мембранного потенциала покоя. Плазматическая мембрана обладает селективной проницаемостью к перечисленным ионам (т. е. мембрана содержит ионные каналы, селективные к каждому типу ионов). Это обстоятельство, а также мембранная проницаемость (P) для каждого иона учитывается в уравнении Гольдмана–Ходжкина–Каца, которое представляет собой расширенную форму уравнения Нернста. Для основных ионов это уравнение выражает мембранный потенциал как функцию их проницаемости и концентрации внутри (i) и снаружи (o) клетки:

$$E = 2,3 \frac{RT}{zF} \log_{10} \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}$$

Величина отрицательного мембранного потенциала покоя зависит от типа клеток и колеблется от

–200 мВ до –20 мВ. В клетках млекопитающих мембранный потенциал покоя в основном создается при работе K^+ -каналов и ионного насоса, который называется Na^+/K^+ -АТФаза. Основной вклад в формирование отрицательного мембранного потенциала вносит небольшой поток ионов K^+ через плазматическую мембрану. Этот поток осуществляется через K^+ -каналы, лишенные воротного механизма (т. н. калиевые каналы покоя). В отличие от большинства других K^+ -каналов, которым необходим сигнал для открытия, эти каналы в клетке, обладающей определенным потенциалом покоя, открыты постоянно. В покоящейся клетке также открыты несколько каналов для других ионов. Движение ионов K^+ из клетки, по направлению электрохимического градиента, помогает клеточному содержимому поддерживать отрицательный заряд. Пока мы не знаем всех источников ионов калия, которые участвуют в этом процессе. В некоторых клетках, например у растений и бактерий, а также в митохондриях, мембранный потенциал покоя создается за счет градиента протонов, а не ионов K^+ .

Для того чтобы происходила диффузия ионов K^+ из клетки через K^+ -каналы, их концентрация в клетке должна быть выше, чем в окружающей среде. Градиент концентрации создается в результате работы Na^+/K^+ -АТФазы, которая закачивает в клетку два иона калия на каждые три иона натрия, которые этот ионный насос удаляет из клетки. Поэтому насос функционирует как генератор заряда: удаляется больше электрических зарядов, чем привносится к клетку. Таким образом, наряду с K^+ -каналами, лишенными воротного механизма, Na^+/K^+ -АТФазы участвуют в создании отрицательного внутриклеточного потенциала. Если происходит инактивация Na^+/K^+ -АТФаз, то концентрации ионов Na^+ и K^+ по обе стороны мембраны уравниваются. Это происходит потому, что липидный бислой очень плохо пропускает ионы. Иными словами, без прохождения первичных процессов активного транспорта с участием Na^+/K^+ -АТФаз значение мембранного потенциала равнялось бы нулю.

Мембранный потенциал покоящейся клетки представляет собой довольно постоянную величину. Однако при связывании лигандов, механическом стрессе или при изменении электрического заряда происходит открытие специфических ионных каналов, и мембранный потенциал изменяется. Если ионные каналы находятся под контролем электрического заряда, то изменения мембранного потенциала влияют на прохождение через них ионов. Открытие и закрытие канала контролируются **воротным механизмом (гейтингом)**. Мембранный потенциал зависит от тех ионов, для которых каналы в основном, открыты. Например, при открытии Na^+ - или Ca^{2+} -каналов происходит **деполяризация** мембраны. При этом соответствующие ионы начинают поступать в клетку в направлении их электрохимического градиента. Это приводит к тому, что мембранный потенциал становится более положительным. Напротив, при **реполяризации** мембраны (гиперполяризации) потенциал становится еще более отрицательным. Это происходит при открытии калиевых каналов и выходе из клетки

ионов K^+ в направлении градиента, что и влечет за собой увеличение отрицательного мембранного потенциала. Движение ионов по ионным каналам происходит быстро и исчисляется миллисекундами. Для изменения мембранного потенциала достаточны лишь незначительные различия в концентрации ионов по сторонам мембраны, и основная концентрация их в клетке не меняется. Поток лишь 10^{-12} моль K^+ через 1 см^2 мембраны приводит к ее быстрой гиперполяризации и к установлению мембранного потенциала, равного -100 мВ . Локальное передвижение относительно небольших зарядов через мембрану позволяет цитозоллю и внеклеточной среде оставаться электрически нейтральными и сводит к минимуму электрическое отталкивание зарядов.

С энергетической точки зрения, мембранный потенциал представляет собой некий энергетический резервуар, энергию которого можно использовать для выполнения определенной работы. По расположению отрицательно заряженных ионов в цитозоле и положительно заряженных на наружной стороне мембраны, клетка напоминает электрический конденсатор или батарею, т. е. приспособление, способное сохранять электрическую энергию и служить ее источником. Энергия высвобождается в виде ионов, мигрирующих по направлению их электрохимического градиента, и может использоваться в процессах транспорта других ионов или метаболитов против градиента концентрации. (Например, см. 2.16 Для функционирования многих переносчиков необходимо существование трансмембранного градиента ионов Na^+ .)

(Начальные сведения об электрохимическом градиенте см. В10:2-0002; более подробно об уравнении Нернста и Гольдмана–Ходжкина–Каца см. 2.24 Приложение: Вывод и применение уравнения Нернста.)

В различных типах клеток они выполняют разнообразные функции, от поддержания мембранного потенциала покоя до завершения потенциала действия и поддержания баланса электролитов. (У прокариот функции K^+ -каналов еще недостаточно выяснены.) Подобно другим ионным каналам, K^+ -каналы имеют разные воротные механизмы, т. е. в ответ на действие электрических или химических сигналов они могут открываться и закрываться. (Подробнее о воротном механизме K^+ -каналов см. 2.6 Различные K^+ -каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам.) Поскольку клетки поддерживают существенно более высокую концентрацию внутриклеточного калия (см. рис. 2.2), открытие калиевых каналов приводит к выходу его из клетки, так как ионы движутся в направлении электрохимического градиента. (Более подробные сведения о поддержании концентрации K^+ см. в 2.19 Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану.)

Так же как и другие ионные каналы, калиевые представляют собой узкие заполненные водой поры, через которые происходит транспорт ионов. K^+ -каналы проявляют высокую избирательность по отношению к ионам калия. Эта избирательность играет важную роль в поддержании постоянства концентрации внутриклеточных ионов. По данным электрофизиологических исследований, транспорт K^+ через каналы происходит со скоростью порядка 10^8 ионов в 1 с, что близко к максимальной скорости диффузии в воде молекул растворенного вещества. В настоящем разделе мы рассмотрим молекулярные основы селективного и при этом быстрого транспорта ионов K^+ через мембрану клетки.

Каждый K^+ -канал представляет собой гомотетрамер, состоящий из четырех субъединиц, образующих центральную пору, через которую осуществляется транспорт ионов (рис. 2.7). В зависимости от трансмембранной топологии субъединиц различают два основных типа K^+ -каналов. Тип 2ТМ/1Р характеризуется тем, что каждая субъединица имеет две трансмембранных (2ТМ) α -спирали, М1 и М2, которые разделены петлей поры (Р). Р-петля содержит короткий спиральный фрагмент, который называется спиралью поры. Эти детали строения являются общими для всех K^+ -каналов. Тип 2ТМ/1Р включает канал внутреннего выпрямления, КАТР, и G-белок, с которым сопряжен K^+ -канал. Каждая субъединица еще одного типа K^+ -канала, который обозначается как 6ТМ/1Р, содержит шесть трансмембранных доменов (6ТМ) и одну Р-петлю. В этом типе K^+ -канала домены S5–P–S6 образуют область поры таким же образом, как M1–P–M2 домены в каналах типа 2ТМ/Р. Четыре добавочных трансмембранных сегмента (S1–S4) участвуют в воротном механизме. Каналы типа 6ТМ/1Р включают K^+ -каналы, зависящие от потенциала на мембране (K_v -каналы) и от лиганда, например Ca^{2+} активируемые K^+ -каналы. (Более подробно об этих каналах см. 2.6 Различные K^+ -каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам.)

2.5 K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов

Основные положения

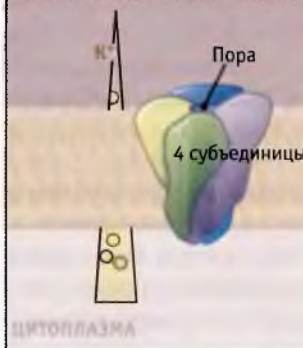
- K^+ -каналы функционируют как заполненные водой поры и катализируют селективный и быстрый транспорт ионов K^+
- K^+ -канал представляет собой комплекс, состоящий из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых участвует в образовании поры
- Селективный фильтр K^+ -канала представляет собой эволюционно-консервативную структуру
- Селективный фильтр K^+ -канала катализирует процесс дегидратации ионов, благодаря чему канал становится специфичным и транспорт ионов по нему значительно ускоряется

Калиевые (K^+) каналы представляют собой белки, интегрированные в плазматическую мембрану, которые обеспечивают выход ионов K^+ из клетки. Калиевые каналы — эволюционно-консервативные структуры в клетках всех живых существ, от бактерий до человека.

Общая форма канала

Положение субъединиц

ВНЕКЛЕТОЧНОЕ ПРОСТРАНСТВО



2TM/1P



6TM/1P

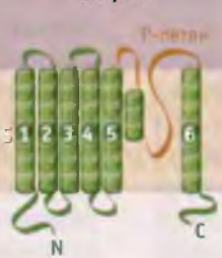


рис. 2.7. K⁺-каналы представляют собой тетрамеры, состоящие из идентичных субъединиц, каждая из которых участвует в образовании центральной поры. Существуют два основных типа субъединиц, состоящие из двух и из шести трансмембранных доменов. Оба типа имеют поровую петлю. Слева показано направление градиента K⁺ в покоящихся клетках млекопитающих

Нам удалось выяснить причины высокой селективности K⁺-каналов на основании электрофизиологических исследований, а также используя мутагенез и рентгеноструктурный анализ. Данные рентгеноструктурного анализа позволили не только подтвердить ранее высказанные предположения, но дали возможность создать модели каналов на атомарном уровне. Первый K⁺-канал, для которого была установлена кристаллическая структура, представлял собой KcsA канал бактерий, относящийся к 2TM/1P типу, в закрытой конфигурации. Пора, через которую проходят ионы, состоит из двух основных частей, **селективного фильтра** и центральной полости (рис. 2.8). Внутри поры расположены M2 (внутренние) спирали и P-петли. Селективный фильтр, который представляет собой самую узкую часть поры, расположен ближе к ее внешнему отверстию и связывает ионы K⁺. Длина его составляет 12 Å, а ширина 3 Å, и каждая субъединица добавляет одну P-петлю к его структуре. В канале присутствуют шесть ион-содержащих сайтов: четыре из них (P1–P4) расположены в пределах селективного фильтра, а из двух остальных (P0 и P5) один расположен на внешней стороне фильтра, и один — в центральной полости. В составе кристаллической структуры эти сайты формируют сложное изображение всех белков K⁺ канала.

Каждая из четырех P-петель селективного фильтра K⁺ канала содержит высококонсервативную последовательность, которая называется *сигнатурной последовательностью*: Thr-X-Gly-Tyr-Gly или Thr-X-Gly-Phe-Gly (TXGYG или TXGFG соответственно), где X представляет собой один из нескольких аминокислотных остатков. Сигнатурная последовательность для канала KcsA имеет следующий вид: Thr-Val-Gly-Tyr-Gly (TVGYG). От каждого из аминокислотных остатков в канал попадают атомы карбонильного кислорода (или из основной направлены молекулы, или из боковой цепи). Как показано на рис. 2.9, эти атомы, которые частично несут отрицательный заряд, располагаются по углам четырех коробчатых структур, которые координируют положение проходящих ионов K⁺. Ско-

ординированное положение ионов K⁺ в селективном фильтре напоминает линейную цепь.

Ионы K⁺, находящиеся в растворе, гидратированы, т. е. окружены молекулами воды. Для того чтобы ионы могли проникнуть в узкий селективный фильтр, они должны от этих молекул освободиться. Однако процесс дегидратации ионов требует значительного количества энергии, поскольку при этом необходимо разорвать силы притяжения между положительно заряженными ионами K⁺ и частичным отрицательным зарядом дипольных молекул воды. Эта проблема решается с помощью K⁺-канала. Отрицательный заряд атомов кислорода, находящихся в селективном фильтре, действует таким же образом, как молекулы воды, создавая гидрофильное окружение, которое снижает энергию дегидратации для ионов K⁺ и копирует слабые отрицательные заряды диполей воды, создающих гидратную оболочку.

Дегидратация является основным этапом на пути формирования ионной селективности каналов. Рассмотрим другой распространенный одновалентный катион, Na⁺, который по размеру меньше иона K⁺, однако в 10⁴ раз медленнее проникает через K⁺-каналы. Причина того, что K⁺-каналы практически непроницаемы для ионов Na⁺, заключается в том, что размер селективного фильтра калиевого канала компенсирует энергию дегидратации ионов K⁺, но не ионов натрия. Дегидратированные ионы K⁺ хорошо проходят через селективный фильтр, однако дегидратированные ионы Na⁺ оказываются слишком мелкими для того, чтобы взаимодействовать с карбонильным кислородом таким образом, чтобы дегидратация оказалась энергетически выгодной. Поэтому структура селективного фильтра способствует прохождению ионов калия, но не ионов натрия.

Для того чтобы скорость диффузии ионов через K⁺-канал составляла 10⁶ ионов в 1 с, процессы их дегидратации, прохождения через селективный фильтр и гидратации должны происходить за 10 нс. С помощью компьютерного моделирования разработана модель, позволяющая рассчитать максимально возможную скорость движения ионов. Модель была разработана с учетом ана-

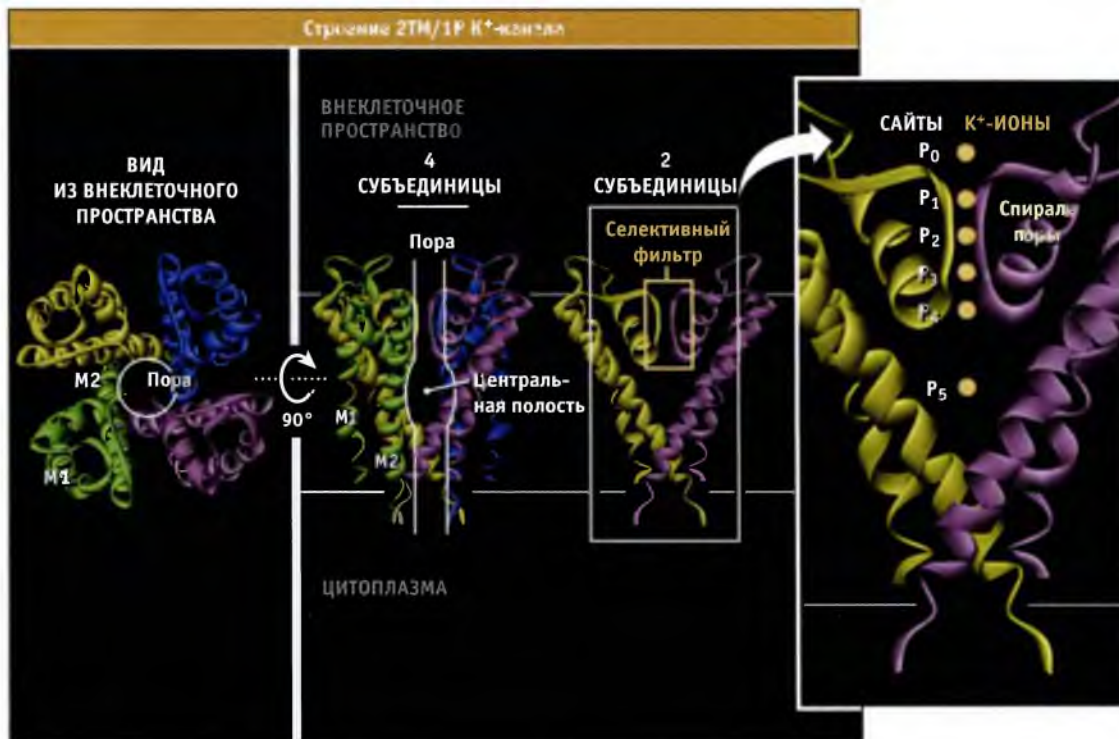


Рис. 2.5. Ленточная модель кристаллической структуры KcsA K⁺-канала, состоящей из белков. Отмечены предполагаемые границы мембраны. Для простоты на двух рисунках справа изображены только две субъединицы. Модели построены на основании данных Protein Data Bank file 1K4C. Представлена структура укороченного KcsA-канала и некоторые N- и С-терминальные участки не показаны

лиза различных кристаллических структур, причем каждая структура соответствовала определенной концентрации ионов K⁺. При разработке модели исходили из предположения, что в каждый данный момент времени ионы калия в селективном фильтре могут занимать или положения P1 и P3 (конфигурация 1,3), или P2 и P4 (конфигурация 2,4) (рис. 2.6). Эти конфигурации предпола-

гают, что ионы K⁺ не располагаются близко друг к другу из-за существования сил взаимного отталкивания. Две конфигурации энергетически близки друг к другу и находятся во взаимном равновесии. Как только ионы K⁺ из центральной полости поступают в селективный фильтр, силы электростатического отталкивания продвигают их по фильтру по пути одной из двух возможных конфигу-

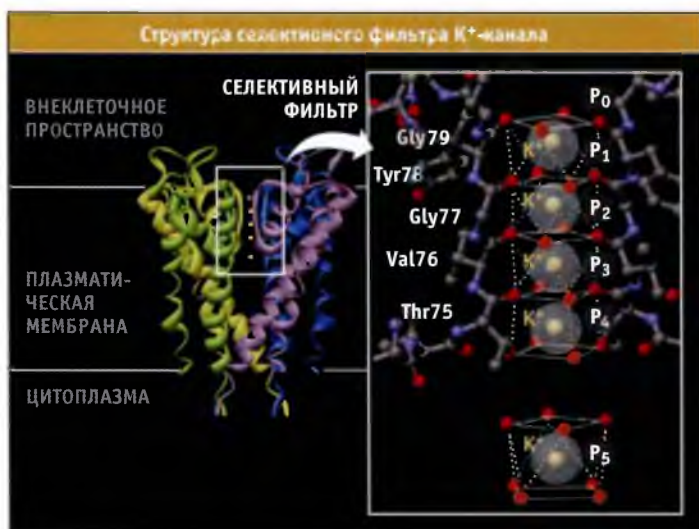


Рис. 2.6. Все четыре субъединицы KcsA K⁺-канала бактерий участвуют в формировании селективного фильтра. Для простоты показаны остатки поровой петли только двух субъединиц вместе с соответствующими атомами кислорода поровых петель двух других субъединиц. P0–P5 представляют собой шесть предполагаемых сайтов связывания ионов K⁺. P0 сайт расположен на наружном устье поры канала (ион K⁺ не показан). Каждый из P1–P4 сайтов селективного фильтра образован восемью атомами кислорода (помечены красным цветом). P-петель. Сайт P5 в центральной полости занят гидратированным ионом K⁺ (атомы кислорода восьми молекул воды помечены красным цветом). Модели построены на основании данных Protein Data Bank file 1K4C. Структура учитывает присутствие в кристалле всех белков, поэтому все сайты заняты ионами K⁺. Показано предполагаемое положение мембраны

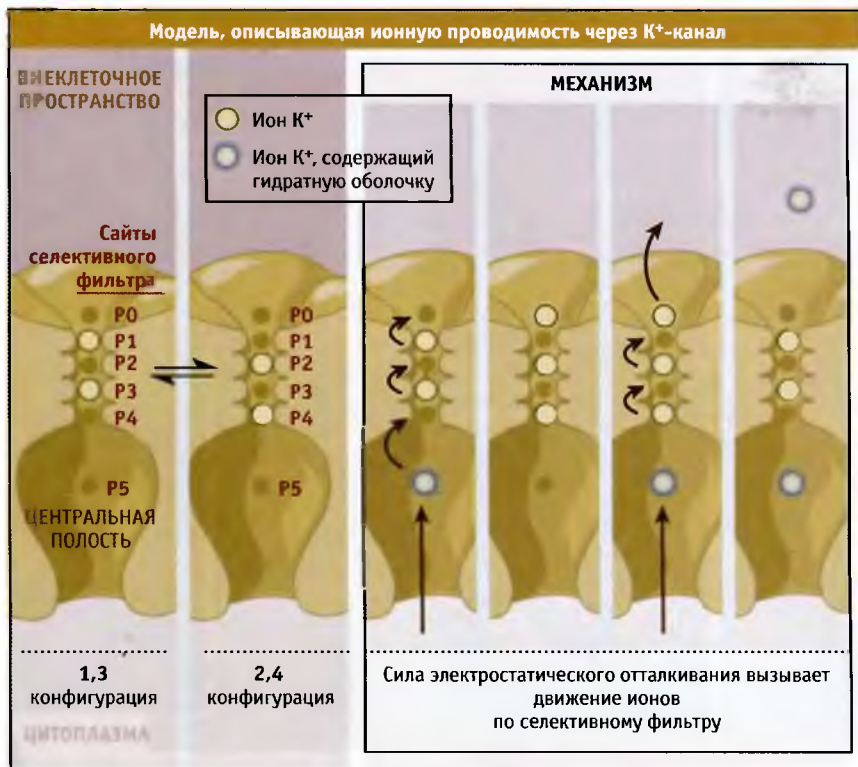


Рис. 2.10 Ионы K^+ движутся через мембрану в направлении концентрационного градиента, из внутриклеточной среды во внеклеточное пространство. Модель постулирует, что в каждый данный момент времени в селективном фильтре находятся два частично дегидратированных иона K^+ . Эти ионы быстро перемещаются между двумя конфигурациями, которые обладают одинаковой свободной энергией. Увеличение количества ионов вызывает рост силы электростатического отталкивания, за счет которой ионы продвигаются по селективному фильтру. Таким образом, селективный фильтр снимает энергетические барьеры и обеспечивает высокую скорость прохождения ионов K^+

раций. В результате ионы выходят с внешней стороны канала. Высокая проводимость канала обеспечивается в том числе отсутствием энергетического барьера между конфигурациями 1,3 и 2,4, который при его наличии существенно затруднял бы транспорт.

Отметим также, что общий принцип, определяющий быстрый транспорт ионов, заключается в том, что при

открытии канала поры расширяются и через них свободно проходят ионы, которые достигают селективного фильтра. Так, для K^+ -каналов эффективное расстояние, на которое проникают ионы, укорачивается до 12 Å, т. е. до длины селективного фильтра, а не до толщины мембраны. (Более подробно об открытой конформации K^+ -каналов см. 2.6 Различные K^+ -каналы используют похо-



Рис. 2.11 Четыре поровых α -спирали (помечены зеленым цветом) примыкают к центральной полости своими отрицательно заряженными участками диполей и стабилизируют положительно заряженный ион K^+ , занимающий сайт P5 (для простоты на правом рисунке представлены только две поровые спирали). Показан частичный заряд спиральных диполей. Модели построены на основании данных Protein Data Bank file 1K4C

жие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам.)

Другая особенность структуры K^+ -каналов заключается в существовании центральной полости диаметром 10 Å, расположенной с внутриклеточной стороны селективного фильтра. Изнутри полость выстлана гидрофобными остатками, что сводит к минимуму взаимодействие ее стенок с гидратированными ионами. В то же время центральная полость помогает ионам K^+ преодолевать силы отталкивания от гидрофобного центра липидного бислоя. Два характерных свойства центральной полости способствуют стабилизации ионов K^+ в канале, в центре мембраны, где существует максимальный энергетический барьер для прохождения ионов. Во-первых, ионы K^+ находятся в центральной полости в гидратированном состоянии. Во-вторых, как показано на рис. 2.11, частичный отрицательный заряд поровых спиралей каждой субъединицы канала направлен к центру центральной полости. (Частичные отрицательный и положительный заряды на α -спиралях возникают в результате образования водородных связей между соседними витками. При этом С-концевая часть приобретает более отрицательный заряд, чем N-концевая.)

2.6 Различные K^+ -каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам

Основные положения

- Воротный механизм (гейтинг) представляет собой важнейшее свойство ионных каналов
- Разные воротные механизмы определяют разные функциональные классы K^+ каналов
- Ворота K^+ -каналов отличаются от селективных фильтров
- K^+ -каналы регулируются величиной мембранного потенциала

Ионные каналы обладают двумя важными свойствами: селективностью по отношению к определенным ионам и механизмом ворот. Воротный механизм представляет собой способность канала открываться и закрываться в ответ на воздействие определенных стимулов. В данном разделе мы рассмотрим общие принципы воротного механизма и охарактеризуем этот процесс для различных K^+ -каналов. (Подробно о ионной проводимости по K^+ -каналам см. 2.5 *K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов.*)

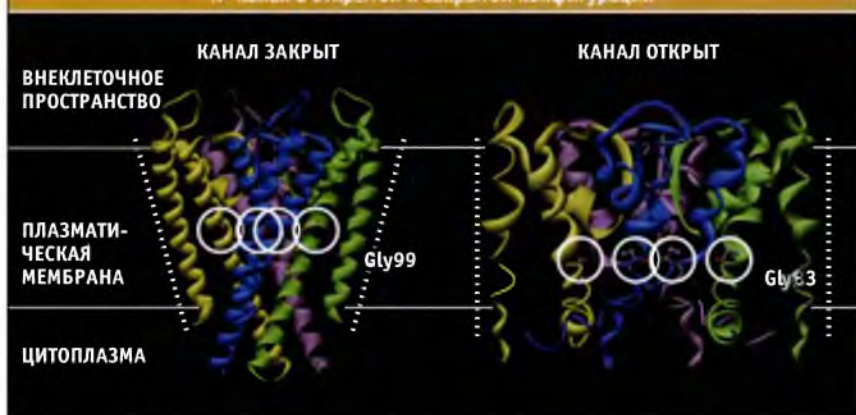
Поскольку при неконтролируемом потоке ионов через мембрану расходуется энергия и нарушаются клеточные функции, процесс открытия ионных каналов находится под строгим контролем. Учитывая объем клетки, концентрацию ионов K^+ во внутри- и внеклеточном пространстве и скорость их транспорта через ионные каналы, установлено, что открытие 10 канальных мо-

лекул лишь на одну секунду может привести к полному выходу из клетки ионов K^+ . В действительности, K^+ -каналы открываются и закрываются в пределах миллисекунд. При этом из клетки не происходит выход всех ионов, однако поддерживается отрицательная величина мембранного потенциала покоя. Закрытие и открытие K^+ -канала происходят за счет конформационных изменений, возникающих под действием специфических стимулов.

Разные типы K^+ -каналов открываются и закрываются под действием различных вне- или внутриклеточных сигналов. Для некоторых K^+ -каналов открытие ворот происходит при участии механизма, который учитывает состояние клеточного метаболизма. Еще один механизм реализуется при связывании лиганда с внутриклеточным доменом канала. При этом происходят конформационные изменения, в результате которых открываются ворота канала. К числу лигандов относятся ионы Ca^{2+} , АТФ, тримерный G-белок и полиамины. Наконец, когда K^+ -канал контролируется электрическим зарядом, изменения мембранного потенциала клетки приводят к изменению конформации трансмембранных сегментов и к открытию (или закрытию) канала. Такой контроль характерен для потенциал-зависимых K^+ -каналов, позволяющих поддерживать потенциал покоя и снижать величину потенциала действия в нервных и мышечных клетках. (Подробнее о потенциале действия см. 2.12 *Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов.*) Некоторые каналы включаются и выключаются как при изменении заряда, так и при связывании лиганда. В данном разделе мы рассмотрим воротный механизм Ca^{2+} -активируемого K^+ -канала, а также K^+ -канала, контролируемого электрическим зарядом.

Каким образом функционирует воротный механизм канала? Важнейшим компонентом процесса является внутренняя или порообразующая α -спираль, M2 в канале 2TM/P или S6 в канале 6TM/P. Спираль M2 или S6 от каждой из четырех субъединиц выстилает пору канала (см. рис. 2.8). В составе каждой внутренней спирали находится ключевой остаток глицина, обеспечивающий гибкость спирали и являющийся «дверной петлей». Этот глициновый остаток, который присутствует в большинстве K^+ -каналов, обеспечивает спирали возможность перемещаться в пору канала (см. рис. 2.12). Таким образом, в расправленной конфигурации четыре внутренние спирали закрывают пору, а в скрученной конфигурации внутренние спирали выпячиваются, образуя отверстие размером около 12 Å.

Строение Ca^{2+} активируемого K^+ -канала показано на рис. 2.13. Пора этого канала обладает тетрамерной структурой, типичной для K^+ -каналов. Наряду с этим на С-конце каждой субъединицы находится большой внутриклеточный домен, способный связывать два иона Ca^{2+} и носящий название «домен, регулирующий K^+ -проводимость» (RCK). Считается, что четыре этих RCK-домена связаны с четырьмя растворимыми цитоплазматическими RCK-доменами. На основании исследования кристаллической структуры этого канала в открытом состоянии



Кристаллическая структура KcsA и MthK K⁺-каналов в закрытой и открытой конфигурациях. Обведены глициновые остатки, образующие «дверную петлю». Модели построены на основании данных Protein Data Bank file 1K4C. и 1LNQ. Для канала MthK цитоплазматические домены не представлены. Показано предполагаемое положение мембраны

и содержащим связанные ионы Ca²⁺, а также исследуя структуры RCK-доменов без лиганда (без Ca²⁺) других K⁺-каналов, была разработана модель его открытия и закрытия с участием ионов Ca²⁺. Согласно этой модели, свободная энергия, которая высвобождается при связывании Ca²⁺, расходуется на перемещение RCK-доменов к

границе мембраны, что приводит к расхождению внутренних спиралей и к расширению поры с внутренней стороны мембраны.

Потенциал-зависимые K⁺-каналы являются представителями группы потенциал-зависимых катионных каналов, которая также включает Na⁺- и Ca²⁺-каналы. Эти

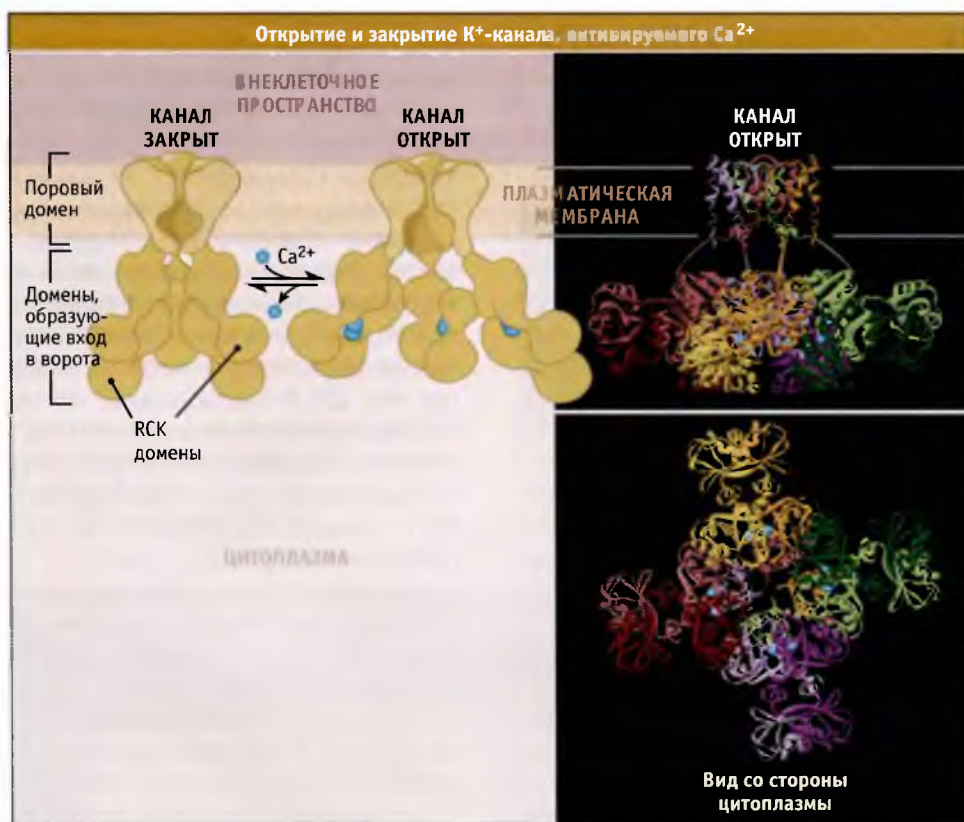


Рис. Схематическое изображение трех из четырех субъединиц K⁺-канала. После связывания Ca²⁺ с RCK-доменами, образующими вход в ворота, их диаметр увеличивается. За счет усилия, которое они оказывают на поровый домен, происходит открытие ворот канала. Модели кристаллической структуры MthK построены на основании данных Protein Data Bank file 1LNQ. Показано предполагаемое положение мембраны

каналы высокочувствительны и открываются уже при небольших изменениях мембранного потенциала. Каким образом канал «чувствует» потенциал и превращает его в событие открытия-закрытия ворот? Все потенциал-зависимые катионные каналы состоят из субъединиц, содержащих шесть трансмембранных сегментов (см. рис. 2.7). Первые четыре трансмембранных сегмента (S1–S4) каждой субъединицы образуют потенциал чувствительный модуль (сенсор заряда), который контролирует открытие и закрытие канала. Каждый сегмент S4 содержит несколько положительно заряженных аргининовых остатков (от 4 до 7, в зависимости от канала) которые называются «заряды ворот». Эти остатки узнают изменения электрического потенциала мембраны. Большое количество «зарядов ворот», приходящееся на один канал, дает возможность плавного увеличения прохождения ионов в ответ на небольшие изменения мембранного потенциала. Функционирование потенциал-зависимого K^+ -канала представлено на рис. 2.14.

Было показано, что положительные изменения мембранного потенциала, обнаруженные сегментом S4, вызывают движение сенсора заряда, который оттягивает спирали внутренней поры в стороны, тем самым открывая ворота канала. Впрочем, точно неизвестно, каким образом движение сенсора приводит к открытию канала. Предложены три модели, описывающие движение сенсора заряда, происходящее в ответ на изменение мембранного потенциала (см. рис. 2.14). Одна модель пред-

полагает, что канал открывается в результате движения положительно заряженного сегмента S4 через мембрану. Другая модель основывается на данных о кристаллической структуре потенциал-зависимого K^+ канала. Согласно этой модели, область поры окружена четырьмя сенсорами заряда, т. н. «лопастями», снабженными гибкими петлями, которые позволяют лопастям двигаться поперек мембраны. Каждая лопасть состоит из фрагментов спираль–поворот–спираль сегментов S3 и S4 типа. Третья модель предполагает, что вместо движения поперек мембраны S4 сегменты сенсора заряда поворачиваются, обеспечивая тем самым открытие и закрытие канала. Это движение близко к конформационным изменениям транспортеров (см. 2.15 *Сопряженный транспорт осуществляется за счет процессов симпорта и антипорта*, детали еще одного общего механизма регуляции канальной активности см. 2.25 *Приложение: Большинство K^+ -каналов способны обеспечивать входящее выталкивание*).

В каналах $K_v 1.2K^+$ клеток млекопитающих потенциал-зависимый воротный механизм, который обеспечивает появление и утрату состояния проводимости в диапазоне изменений в несколько милливольт, связан с перемещением независимых доменов внутри мембраны. Подобные сенсоры заряда (лопасти) выполняют механическую работу посредством линкерных спиралей, подобно тому как это происходит в случае связывающих доменов лиганд-зависимых ионных каналов.

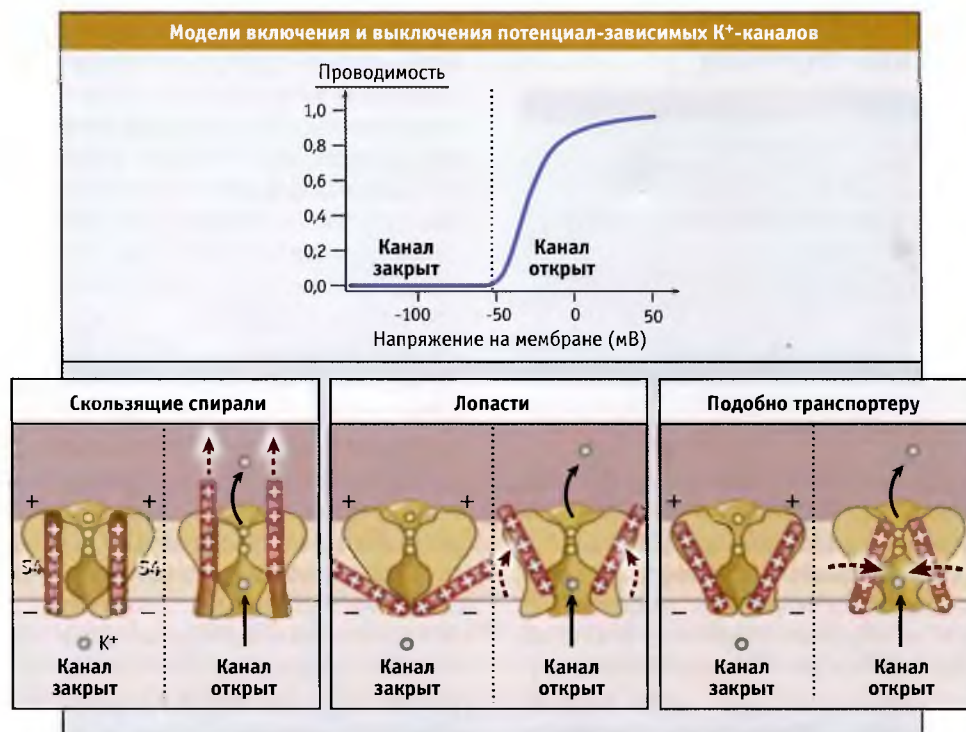


Рис. 2.14 Три модели, описывающие, каким образом небольшой заряд, который распознается K^+ -каналом, приводит к открытию канала. Трехмембранные спирали S4 представляют собой положительно заряженные трансмембранные сегменты домена зарядного сенсора (S1–S4). На схеме изображен тетрамерный канал в разрезе и представлены только две из четырех S4 спиралей

Исследование мутаций в генах, кодирующих K^+ -канальные белки, помогло выяснить функции различных изоформ K^+ -каналов, а также связь дефектов их структуры с развитием различных заболеваний. Ниже кратко рассмотрены некоторые из полученных данных. Эпизодическая атаксия 1 типа представляет собой заболевание нервной системы, вызванное мутацией в гене одного из белков K^+ -канала. Эта наследственная болезнь характеризуется кратковременными приступами расстройства координации произвольных движений, которые развиваются при стрессе и обусловлены повышением возбудимости мотонейронов. При этой форме атаксии наблюдается мутация в гене *KCNA1*, кодирующем синтез одного из белков K_v -канала. Синдром удлиненного интервала QT представляет собой наследственное заболевание, которое выявляется на ЭКГ покоя. Оно обусловлено мутацией в гене *KCNQ3*, который кодирует белок другого K_v -канала. В результате у больных удлиняется процесс реполяризации миокарда, возникают повторяющиеся приступы аритмии и увеличивается риск внезапной смерти (см. 2.12 *Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов*).

поскольку вызывает снижение общего электрического заряда клетки. Выход из клетки положительных зарядов приводит к тому, что ее содержимое заряжается более отрицательно по отношению к внеклеточной среде. Na^+ -насос позволяет клетке поддерживать отрицательное значение потенциала покоя. Энергия, необходимая для установления электрохимического градиента Na^+ , поставляется за счет гидролиза АТФ и сохраняется в форме электрохимического градиента Na^+ и K^+ по сторонам плазматической мембраны.

Биологическая роль электрохимического градиента Na^+ выяснилась после обнаружения большого количества Na^+ -зависимых каналов и белков переносчиков, функционирование которых непосредственно связано с существованием этого градиента. Некоторые из этих вторичных транспортных систем, зависящих от Na^+ или от электрического заряда, перечислены на рис. 2.16. Они используют электрохимический градиент Na^+ , направленный в клетку, и запасенную энергию для транспорта метаболитов против градиента концентрации или для генерации электрических сигналов в виде потенциала действия. Две основные группы Na^+ -зависимых мембранных белков включают потенциал-зависимые натриевые каналы, которые рассматриваются в данном разделе, и эпителиальные Na^+ -каналы (см. 2.8 *Эпителиальные Na^+ -каналы регулируют гомеостаз Na^+*). К третьей группе относятся переносчики Na^+ /субстрат (см. 2.16 *Трансмембранный градиент Na^+ необходим для функционирования многих переносчиков*).

Возбудимые клетки, например нейроны, мышечные и эндокринные, генерируют электрические сигналы или реагируют на них. Эти клетки активируются за счет быстрых и обратимых изменений их мембранного потенциала покоя, которые, например, происходят при возникновении и распространении потенциала действия. (Подробнее о потенциале действия см. 2.12 *Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов*.) При активации эти клетки используют трансмембранный градиент Na^+ , образованный за счет Na^+ / K^+ -АТФазы, для перевода электрических сигналов на мембране в клеточные функции. Критическую роль в этом процессе играют потенциал-зависимые Na^+ -каналы, поскольку они активируются при деполяризации, которая приводит к тому, что мембранный потенциал быстро приобретает более положительный заряд. Когда величина мембранного потенциала достигает критического порогового значения, происходит открытие Na^+ -канала, и ионы начинают транспортироваться в клетку, в направлении электрохимического градиента. Через несколько миллисекунд Na^+ -канал самопроизвольно инактивируется (закрывается) и поток ионов прерывается. В физиологических условиях быстрый поток относительно небольшого количества ионов Na^+ приводит к перемене знака электрического заряда плазматической мембраны (деполяризация), однако он не влияет на общую концентрацию Na^+ в клетке.

2.7 Потенциал-зависимые Na^+ -каналы активируются при деполяризации мембраны и транслируют электрические сигналы

Основные положения

- Для функционирования Na^+ -каналов необходимо существование направленного в клетку градиента Na^+ , который создается с помощью Na^+ / K^+ -АТФазы
- Электрические заряды на клеточной мембране активируют потенциал-зависимые Na^+ -каналы
- Пора потенциал-зависимых Na^+ -каналов образуется из одной субъединицы, однако их общая структура напоминает структуру 6TM/1P K^+ -каналов
- Потенциал-зависимые Na^+ -каналы инактивируются специфическими гидрофобными остатками, которые блокируют пору

Клетка поддерживает градиент концентрации Na^+ , направленный от внеклеточной среды (см. рис. 2.2), что является необходимой предпосылкой для работы многочисленных систем мембранного транспорта, зависящих от ионов Na^+ . Электрохимический градиент Na^+ по обеим сторонам мембраны создается с помощью Na^+ / K^+ -АТФазы (см. 2.19 *Na^+ / K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану*). Эта АТФаза также называется Na^+ -насосом, поскольку использует энергию АТФ для транспорта ионов Na^+ и K^+ против их электрохимического градиента. На каждые два иона K^+ , поступающих в клетку, из нее удаляются три иона Na^+ . Таким образом, Na^+ -насос выполняет функцию электрогенератора,

Транспорт ионов Na^+ через плазматическую мембрану			
	Транспортный белок	Стехиометрия транспорта	Физиологическая роль
УТЕЧКА Na^+	Na^+/K^+ -АТФаза	3 Na^+ выходят : 2 K^+ поступают	Поддержание трансмембранного градиента Na^+ и K^+
	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (обратимое функционирование)	3 Na^+ выходят : 1 Ca^{2+} поступает	Ca^{2+} поступает в фазу I потенциала действия кардиомиоцитов
	$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (обратимое функционирование)	4 Na^+ выходят : 1 K^+ поступает : 1 Ca^{2+} поступает	Световая адаптация
	$\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ – котранспортный белок (почки)	1 Na^+ выходит : 3 HCO_3^- выходят	Поддержание pH в крови и моче
ПОСТУПЛЕНИЕ Na^+	Каналы		
	Потенциал-зависимый натриевый канал		Быстрое поступление Na^+ при распространении потенциала действия
	Эпителиальные натриевые каналы		Выполняет различные функции в тканях, включая реабсорбцию Na^+ в почках, поддержание постоянного ионного состава легочного сурфактанта, поглощение ионов Na^+ в желудочно-кишечном тракте
	Обменники		
	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (способствует обмену)	3 Na^+ поступают : 1 Ca^{2+} выходит	Удаляет Ca^{2+} из цитозоля
	$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ (способствует обмену)	4 Na^+ поступают : 1 K^+ выходит : 1 Ca^{2+} выходит	Световая адаптация
	Na^+/H^+	1 Na^+ поступает : 1 H^+ выходит	Регуляция внутриклеточного pH и объема клетки
	$\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$	2 Na^+ поступают : 1 Mg^{2+} выходит	Поддержание внутриклеточной концентрации магния
	Котранспортеры		
	Na^+/Cl^-	1 Na^+ поступает : 1 Cl^- поступает	Реабсорбция NaCl в почках
	$\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (поджелудочная железа)	1 Na^+ поступает : 2 HCO_3^- поступают	Контроль pH панкреатического сока
	$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$	1 Na^+ поступает : 1 K^+ поступает : 2 Cl^- поступают	Реабсорбция NaCl в почках
	$\text{Na}^+/\text{глюкоза}$	2 Na^+ поступают : 1 глюкоза поступает	Усвоение глюкозы в кишечнике и реабсорбция почками
	$\text{Na}^+/\text{иодид}$	2 Na^+ поступают : 1 иодид поступает	Усвоение иода щитовидной железой и другими тканями
	$\text{Na}^+/\text{пролин}$	1 Na^+ поступает : 1 пролин поступает	Усвоение пролина бактериями. Аналогичные транспортеры участвуют в реабсорбции аминокислот почками

Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент Na^+ по сторонам плазматической мембраны, удаляя из клетки ионы Na^+ . Транспорт ионов в клетку в направлении градиента обеспечивается Na^+ -каналами. Некоторые переносчики используют высвобождающуюся при этом энергию для транспорта других метаболитов против градиента концентрации

Na^+ -каналы являются интегральными белками плазматической мембраны и транспортируют ионы Na^+ в клетку в направлении градиента. Они катализируют транспорт ионов с высокой скоростью, достига-

ющей 10^8 ионов на канал в 1 с. Потенциал-зависимые Na^+ -каналы содержат порообразующую α -субъединицу и дополнительные субъединицы, $\beta 1$ и $\beta 2$ (рис. 2.16). Субъединица α состоит из четырех повторяющихся до-

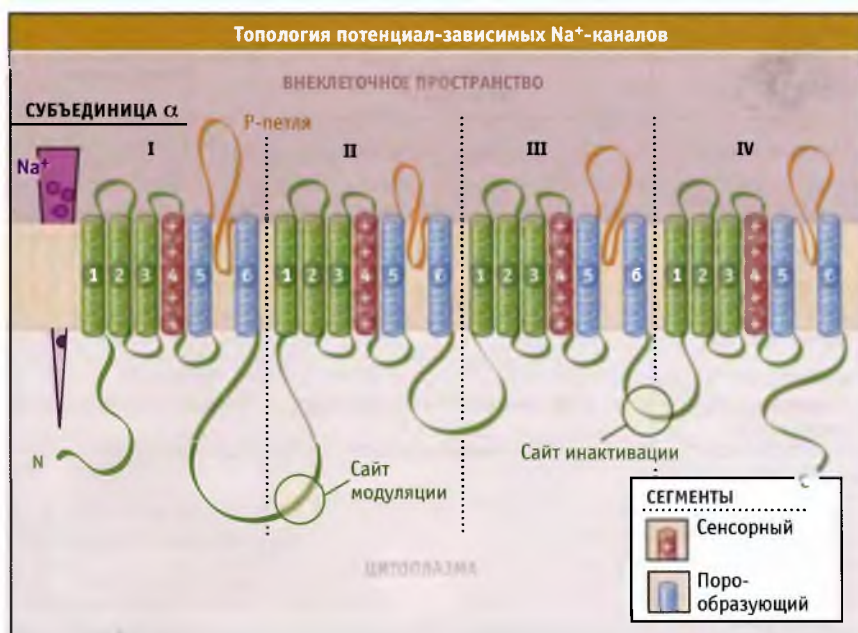


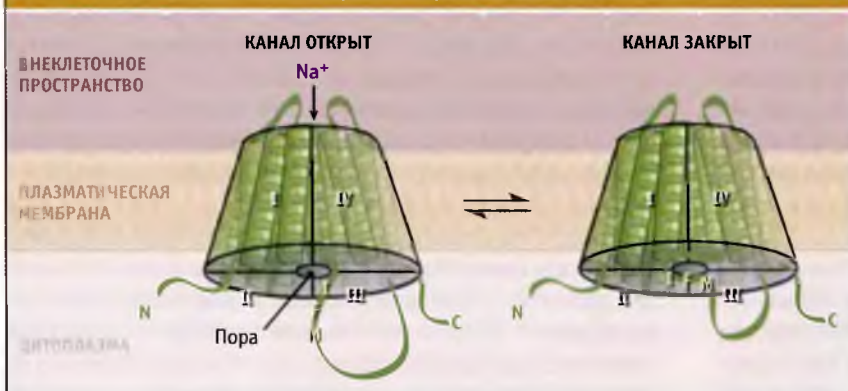
РИС. 2.16. Предполагаемая топология α -субъединицы потенциал-зависимых Na^+ -каналов. Так же как и в K^+ -каналах, четыре порообразующих сегмента, состоящие из трансмембранных спиралей 5 и 6 и соединяющих их Р-петель, образуют селективный фильтр и ворота канала. Слева показан трансмембранный градиент Na^+

менов (I–IV), обладающих близким строением. Каждый из повторяющихся доменов содержит шесть трансмембранных сегментов, обладающих структурой α -спирали (1–6), в том числе сегменты 5 и 6, с соединяющими поровыми (Р) петлями. Сенсоры заряда расположены в сегменте 4, который содержит положительно заряженные остатки аминокислот. Строение потенциал-зависимого Na^+ -канала на уровне атомарных структур еще не выяснено. Однако предполагается, что он обладает осью симметрии четвертого порядка, расположенной вдоль пути транспорта ионов, который облицован четырьмя доменами, состоящими из сегментов 5, 6 и Р-петель. По предполагаемому строению, Na^+ -канал напоминает потенциал-зависимый K^+ -канал, с тем исключением что последний собран из четырех отдельных идентичных субъединиц (см. 2.5 K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов и 2.6 Различные K^+ -каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам).

Эксперименты по мутагенезу, в которых оценивали влияние замен аминокислот на функции ионных каналов, позволили предположить, что Р-петли являются частью селективного фильтра Na^+ -канала. Р-петли содержат сигнатурную последовательность Trp-Asp-Gly-Leu. Мутации в этой последовательности влияют на селективность канала по отношению к катионам. Р-петля также способна связывать тетродотоксин рыбы фугу. Связывание этого токсина приводит к инактивации потенциал-зависимых Na^+ -каналов, участвующих в генерации и распространении потенциала действия нейронов, что вызывает паралич ЦНС.

Считается, что происходящие при деполяризации мембраны изменения конформации и перемещение сенсоров заряда лежат в основе быстрой активации (открытия) потенциал-зависимых Na^+ -каналов, подобно тому как это имеет место для потенциал-зависимых K^+ -каналов (см. рис. 2.14). При этом на кинетику и зависимость воротного механизма от заряда влияют β -субъединицы. Они также участвуют в транспорте ионов и определяют локализацию Na^+ -каналов в плазматической мембране.

После потенциал-зависимой активации Na^+ -каналов происходит их потенциал-зависимая инактивация (закрытие). Предполагается, что инактивация происходит в два этапа, вначале наступает быстрая инактивация, а затем вторая фаза медленной инактивации. Как установлено в экспериментах с использованием сайт-направленного мутагенеза, основным компонентом системы быстрой инактивации является цитоплазматическая петля между доменами III и IV α -субъединицы Na^+ -канала. Как предполагают, эта цитоплазматическая петля, подобно крышке, закрывает отверстие поры канала, причем последовательность Ile-Phe-Met (IFM) служит в качестве гидрофобной «затяжки» (IFM). Фланкирующие IFM остатки глицина и пролина сообщают необходимую гибкость «петле затяжки» и обеспечивают закрытие поры. В то же время медленная инактивация зависит от Р-петли и включает фазу конформационных изменений наружного устья поры. В событиях медленной фазы инактивации также может принимать участие центральная область четвертого сегмента сенсора электрического заряда.



Для быстрой инактивации Na^+ -каналов с внутренней стороны поры используется механизм шарнирной крышки. На внутриклеточной петле, соединяющей домены III и IV канала, находится гидрофобная последовательность инактивации IFM (Ile-Phe-Met), которая блокирует пору закрытого канала

Na^+ -каналы служат важными мишенями действия анестетиков. Исследования с применением сайт-направленного мутагенеза показали, что местные анестетики имеют повышенное сродство к домену IV и к трансмембранному сегменту б, который выстилает пору Na^+ -каналов. Некоторые лекарственные препараты, используемые для коррекции сердечного ритма, также ингибируют транспорт ионов через потенциал-зависимые Na^+ -каналы. Эти препараты, относящиеся к антиаритмическим средствам I класса, по химической структуре близки к таким местным анестетикам, как четвертичные амины, которые действуют на нейроны. При развитии сердечных аритмий происходит аномальная деполяризация мембраны. Считается, что антиаритмические средства I класса селективно подавляют потенциал-зависимые Na^+ -каналы, которые находятся в инактивированном состоянии. Эти антиаритмические препараты и близкие к ним по структуре местные анестетики очевидно, связываются с Na^+ -каналом со стороны клетки, и ингибируют деполяризацию мембраны, которая служит причиной развития аритмии.

порт воды через слой клеток. Как и для многих других белков, транспортирующих ионы Na^+ , функционирование ENaCs зависит от градиента Na^+ , формирующегося под действием Na^+/K^+ -АТФазы (см. 2.19 Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану; 2.7 Потенциал-зависимые Na^+ -каналы активируются при деполяризации мембраны и транслируют электрические сигналы; 2.16 Для функционирования многих переносчиков необходимо существование трансмембранного градиента ионов Na^+). В отличие от других Na^+ -каналов, ENaCs менее зависимы от величины потенциала и не подвержены быстрой инактивации, однако им присуща сложная система долговременной гормональной регуляции. Впервые ENaCs были обнаружены в клетках эпителия, однако они также находятся в нейронах и в других клетках. Аминокислотная последовательность белков ENaCs близка к последовательности дегенеринов *C. elegans*, участвующих в формировании тактильных ощущений.

ENaCs выполняют разнообразные функции, например регулируют кровяное давление, размножение, пищеварительные процессы, а также координацию движений. Например, ENaCs клеток почек и желудочно-кишечного тракта участвуют в поддержании необходимой концентрации K^+ и Na^+ в плазме крови, а также в моче и фекалиях. Транспорт ионов Na^+ через каналы клеток легкого и слюнных желез поддерживает ионный состав легочного сурфактанта и слюны. В настоящем разделе мы рассмотрим роль ENaCs в поглощении и транспорте ионов Na^+ через мембрану клеток почечного эпителия.

Основная функция почек состоит в очистке плазмы крови путем фильтрации из нее метаболитических шлаков, например мочевины, в мочу. При этом почки участвуют в поддержании гомеостаза за счет регуляции количества жидкости в организме и концентрации растворенных в ней веществ, которые, в свою очередь, влияют на кровяное давление. В ходе сложных процессов фильтрации, реабсорбции и секреции ионы, сахара, аминокислоты и небольшие белки проходят через почечные каналы, содержащие ультрафильтрат плазмы. Почечные каналы и трубочки выстланы поляризованными эпители-

2.8 Эпителиальные Na^+ -каналы регулируют гомеостаз Na^+

Основные положения

- Семейство эпителиальных Na^+ -каналов/дегенеринов отличается разнообразием
- Транспорт ионов Na^+ через эпителиальные клетки происходит при участии эпителиальных Na^+ -каналов и Na^+/K^+ -АТФазы
- По строению селективный фильтр ENaC близок к селективному фильтру K^+ -канала

Эпителиальные Na^+ -каналы (ENaCs) представляют собой основной тип каналов, по которым в клетки поступают ионы Na^+ . В отличие от электрических функций потенциал-зависимых каналов, эпителиальные Na^+ -каналы обеспечивают потоки ионов Na^+ и контролируют транс-

альными клетками. Со стороны люмена, заполненного фильтратом, расположена апикальная мембрана, а со стороны полости кровеносного сосуда находится базолатеральная мембрана (рис. 2.18). Эти специализированные эпителиальные клетки реабсорбируют многие компоненты фильтрата, например соли и воду, перенося их назад, в плазму. Тем самым сохраняется постоянство объема крови и поддерживается необходимая концентрация этих компонентов.

ENaCs расположены в апикальной мембране специализированных клеток эпителия дистальных канальцев и собирательных трубочек почки. Они расположены на пути в клетку ионов Na^+ , поступающих из фильтрата плазмы (предшественника мочи) (рис. 2.18). Ионы Na^+ проходят через ENaCs в направлении электрохимического градиента (вне клетки их концентрация выше, чем внутри клетки). Транспорт ионов Na^+ через ENaCs, расположенные на апикальной мембране, сопряжен с их транспортом через базолатеральную мембрану, который происходит с участием Na^+/K^+ -АТФаз и приводит к переносу натрия в кровь через стенки капилляров. За счет транспорта Na^+ из цитозоля Na^+/K^+ -АТФазы создают значительный электрохимический градиент Na^+ , необходимый для функционирования ENaCs. В результате совместного действия ENaCs и Na^+/K^+ -АТФаз ионы натрия транспортируются через эпителиальные клетки из фильтрата плазмы в просвет канальца и в конце концов попадают назад в плазму крови. Na^+/K^+ -АТФаза является

электрогенератором: на каждые три атома Na^+ , выходящие из клетки, она закачивает два атома K^+ . В результате транспорта Na^+ через ENaCs также генерируются электрические заряды: сторона апикальной мембраны, обращенная к просвету канальца, получает больше отрицательных зарядов, чем расположенная со стороны цитоплазмы. За счет этого в просвете создается отрицательное электроокружение, что способствует секреции K^+ в фильтрат через апикальные K^+ -каналы. Таким образом, транспорт ионов Na^+ через клетки эпителия играет важную роль в поддержании состава и объема жидкости, находящейся с апикальной и базолатеральной сторон слоя эпителиальных клеток. За счет функционирования ENaC клеток дистальных канальцев и собирательных трубочек почек реабсорбируется примерно 7% отфильтрованных ионов Na^+ и Cl^- , а также секретируются различные количества K^+ . (Подробнее о Na^+/K^+ -АТФазе см. 2.19 *Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану.*)

Процесс реабсорбции Na^+ из фильтрата почек, происходящий через ENaCs, регулируется гормонами — альдостероном и вазопрессином. Эти гормоны высвобождаются соответственно из надпочечников и гипофиза при дегидратации или солевой недостаточности и связываются с рецепторами почечных клеток. При этом происходит экспрессия ENaCs на плазматической мембране и увеличивается реабсорбция Na^+ из фильтрата, а также его транспорт в плазму крови. За счет гормональной

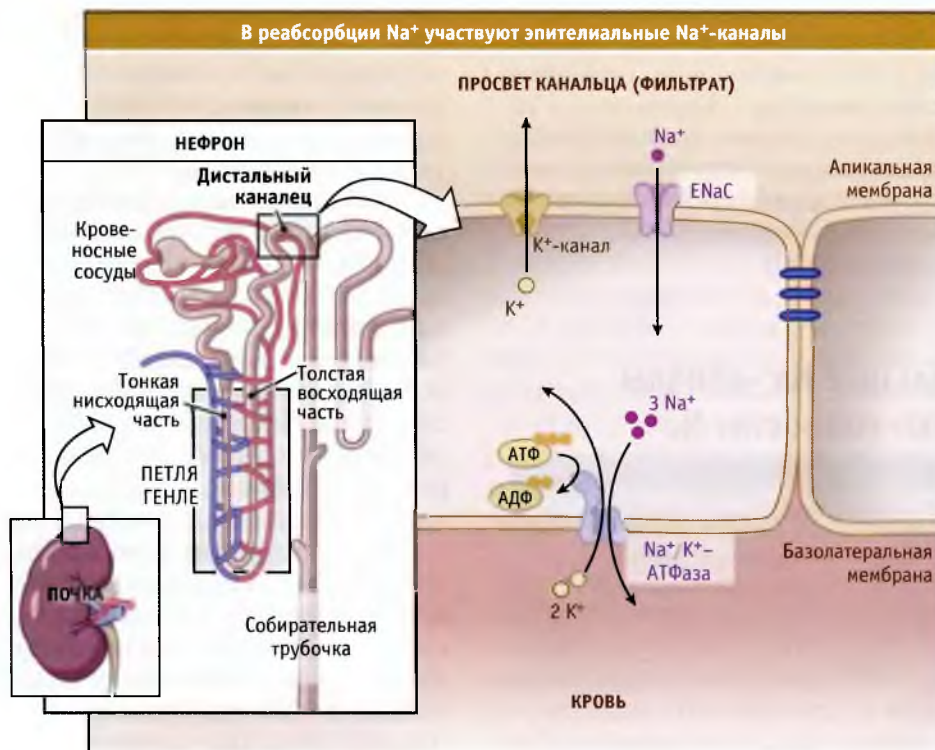


рис. 2.18. Через эпителиальные Na^+ -каналы (ENaCs), расположенные в апикальной мембране клеток, выстилающих почечные канальцы, происходит реабсорбция ионов Na^+ из клубочкового фильтрата

регуляции, при экстремальных условиях концентрации Na^+ и баланс жидкости поддерживаются на оптимальном уровне. (Подробнее о роли других каналов в функции почек см. 2.10 *Cl⁻-каналы выполняют различные биологические функции* и 2.11 *Селективный транспорт воды происходит через аквапориновые каналы*.)

ENaC состоит из трех гомологичных субъединиц, α , β и γ , образующих мультимерный каналный комплекс. Атомарные структуры ENaCs пока не получены. Однако на основании данных секвенирования белков и реконструкции *in vitro* предполагается, что каждый комплекс ENaC состоит из четырех субъединиц (двух α , одной β и одной γ), и каждая субъединица участвует в образовании центральной поры канала (). Топологически каждая субъединица состоит из двух трансмембранных сегментов с N- и C-терминальными цитоплазматическими доменами. В образовании поры участвует второй трансмембранный сегмент каждой субъединицы тетрамерного канала.

Селективный фильтр ENaC обеспечивает возможность избирательного транспорта ионов Na^+ . Фильтр содержит сигнатурную последовательность Gly-X-Ser (X — одна из нескольких аминокислот), которая примыкает к второму трансмембранному сегменту со стороны наиболее узкой части поры (см. 2.19 *Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану*). Мутация в любом из трех аминокислотных остатков коренным образом меняет проводимость кана-

ла, что определяется с помощью электрофизиологических экспериментов. Предполагается, что карбонильные атомы кислорода Gly-X-Ser остатков выстилают селективный фильтр и оказывают стабилизирующее действие на частично дегидратированные ионы определенного диаметра. Такое устройство напоминает селективный фильтр некоторых K^+ -каналов, однако последние не содержат последовательностей гомологичных ENaC (см. рис. 2.9 и 2.5. *K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов*).

Диуретик амилорид блокирует реабсорбцию Na^+ с участием ENaC, которая происходит через апикальные мембраны дистальных канальцев и собирательных трубочек (рис. 2.18). (Таким образом, в электрофизиологических экспериментах функция ENaC характеризуется как обеспечивающая поток ионов Na^+ , чувствительный к амилориду.) Амилорид конкурирует с ионами Na^+ за связывание с наружной частью ENaC, расположенной вблизи от селективного фильтра. Влияние амилорида на реабсорбцию Na^+ в дистальном отделе нефрона является основой клинического использования этого препарата в качестве диуретика и в лечении гипертонии. Поскольку лечение амилоридом приводит к снижению реабсорбции из фильтрата Na^+ , эти ионы (и вода) попадают в мочу в повышенных количествах. Снижение уровня реабсорбции Na^+ в эпителиальные клетки уменьшает его содержание в крови, что приводит к понижению или к нормализации кровяного давления.

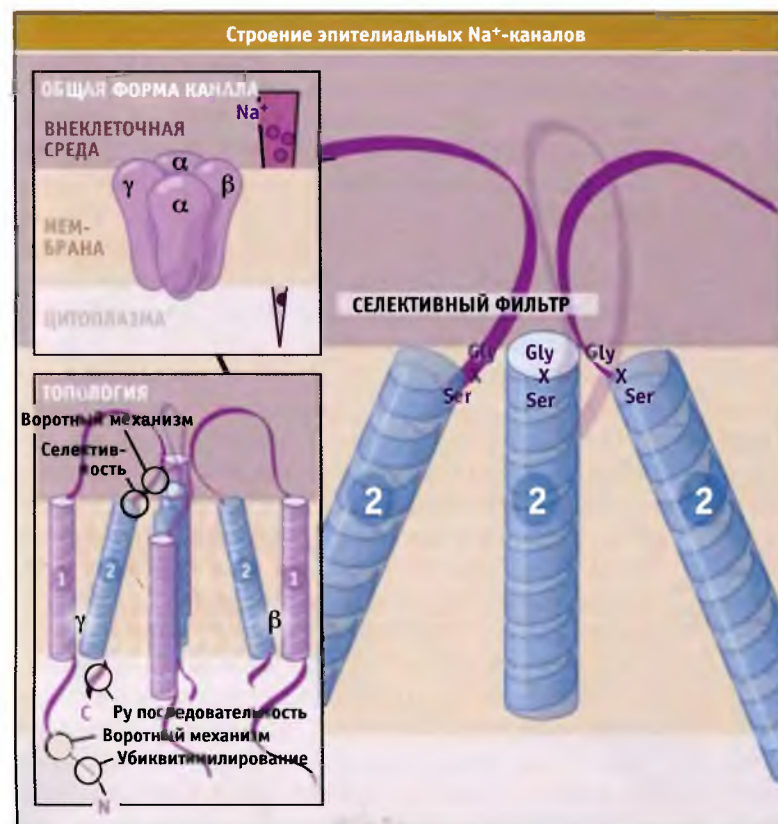


РИС. 2.18 Эпителиальные Na^+ -каналы (ENaCs) состоят из двух α -субъединиц, одной β - и одной γ -субъединицы. Предполагается, что каждая субъединица состоит из двух трансмембранных сегментов, петли, расположенной вне мембраны, и содержит N- и C-концевые участки, находящиеся в пределах клетки. Последовательность Gly-X-Ser каждой субъединицы входит в состав селективного фильтра. Модификация ENaCs под действием убиквитина является одним из механизмов, регулирующих интернализацию каналов и транспорт ионов Na^+ . Еще один механизм включает фосфорилирование внутриклеточных последовательностей, происходящее под действием альдостерона

Мутации в генах, кодирующих синтез белков ENaC, вызывают тяжелые расстройства регуляции кровяного давления. При редкой наследственной форме гипертензии, называемой синдромом Лиддла, обнаружены изменения белков ENaC, которые вызывают гиперреактивность каналов и аномально высокий уровень реабсорбции Na^+ в дистальной части почечных канальцев. В результате увеличивается объем плазмы крови, возникает артериальная гипертензия, и в плазме снижается уровень K^+ . Мутации, приводящие к развитию синдрома Лиддла, локализованы в генах, кодирующих β - или γ -субъединицу канала. Напротив, мутации, ответственные за снижение функционирования ENaC при псевдогипоальдостеронизме типа I, вызывают развитие гипотонии (снижение кровяного давления). При этом содержание Na^+ в плазме крови снижается, а содержание K^+ увеличивается. Изучение этих генетических заболеваний в существенной мере способствовало пониманию сложных механизмов влияния альдостерона на функции эпителиальных Na^+ -каналов, а также выяснению их роли в регуляции кровяного давления и гомеостаза плазмы.

2.9 Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны активируют внутриклеточные функции

Основные положения

- Ca^{2+} -каналы, расположенные на поверхности клетки, переводят сигналы, получаемые мембраной, во внутриклеточные Ca^{2+} -сигналы
- Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы представляют собой асимметричные белковые комплексы, состоящие из пяти различных субъединиц
- Подобно K^+ -каналу, α -субъединица потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов образует пору и содержит структуру поровой петли
- Селективный фильтр Ca^{2+} -канала образует электростатическую ловушку
- Ca^{2+} -канал стабилизируется в закрытом состоянии с помощью блокаторов канала

Ионы Ca^{2+} представляют собой вторичный мессенджер и контролируют многие клеточные функции, такие как сокращение сердечной и скелетных мышц, зрительный процесс в сетчатке глаза, иммунный ответ Т-клеток, возбудимость нервных клеток и поведенческие реакции, а также секрецию инсулина β -клетками поджелудочной железы. Активация клеточных функций наступает в ответ на изменения концентрации Ca^{2+} в цитозоле покоящейся клетки, которая примерно в 10 000 раз ниже, чем его концентрация во внеклеточной среде (см. рис. 2.2). Запасы Ca^{2+} в эндоплазматическом (ЭПР) и в саркоплазматическом ретикулуме (СР) достигают таких же величин, как его содержание во внеклеточной среде.

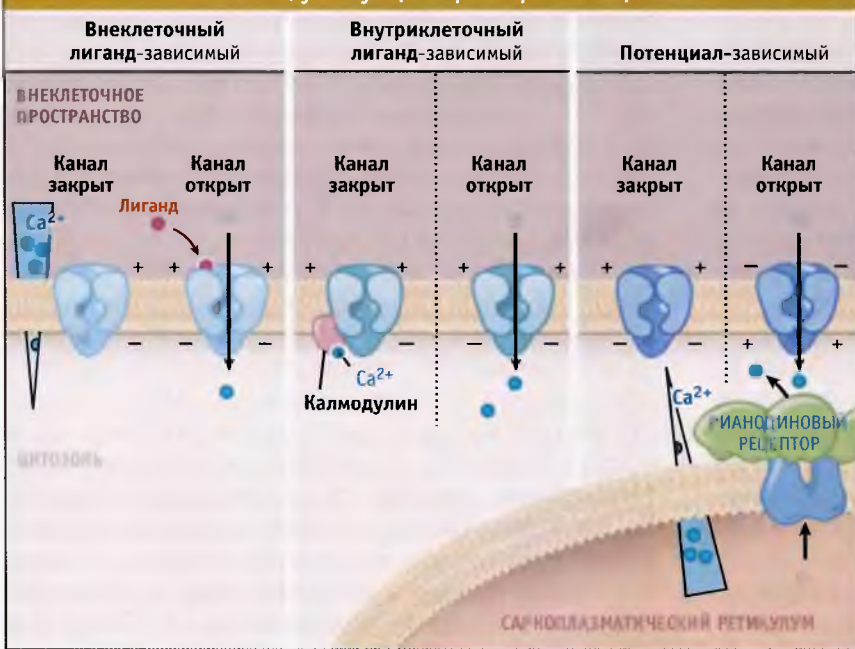
Уровень Ca^{2+} в цитозоле регулируется за счет совместного функционирования различных растворимых Ca^{2+} связывающих белков, а также белков, осуществля-

ющих его трансмембранный перенос. Например, различные типы Ca^{2+} -каналов в плазматической мембране, в ЭПР и СР катализируют селективный транспорт ионов в цитозоль в направлении их электрохимического градиента. Различные типы каналов характеризуются различными воротными механизмами с участием внеклеточных лигандов, электрического потенциала, или же самих ионов Ca^{2+} (рис. 2.18). При закрытии Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны прерывается передача сигнала, и ионы Ca^{2+} начинают выходить из цитозоля при участии специальных транспортных белков (см. 2.18 *Ca^{2+} -АТФаза закачивает Ca^{2+} во внутриклеточные депо*). (Более подробно о высвобождении Ca^{2+} из ЭПР и СР см. 2.13 *Сердечная и скелетная мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения*.) Закрытие Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны, которое предотвращает попадание в клетку избытка ионов Ca^{2+} , происходит с участием двух основных механизмов: Ca^{2+} -зависимой и потенциал-зависимой инактивации. При активации белка калмодулина, который связывается с внутриклеточным доменом Ca^{2+} -канала в ответ на поступление Ca^{2+} в клетку, происходит инактивация многих типов Ca^{2+} -каналов по механизму отрицательной обратной связи. В настоящем разделе мы рассмотрим предполагаемый механизм транспорта ионов через Ca^{2+} -каналы, основное внимание уделив потенциал-зависимым Ca^{2+} -каналам, и сравним механизмы их функционирования с работой K^+ -каналов.

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы обеспечивают транспорт Ca^{2+} в клетки в тех случаях, когда значения мембранного потенциала изменяются в положительную сторону за счет деполяризации (см. рис. 2.20). Эти каналы переводят электрический сигнал плазматической мембраны во внутриклеточный сигнал. Поступление в клетку ионов Ca^{2+} приводит к увеличению его концентрации до определенного уровня и тем самым к запуску различных процессов, таких, как, например, мышечное сокращение, высвобождение гормонов и нейромедиаторов, активация Ca^{2+} -зависимых каскадных процессов и транскрипция генов (подробнее о мышечном сокращении см. 2.13 *Сердечная и скелетная мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения*). Существуют различные типы потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, которые классифицируются в соответствии с их электрофизиологическими и фармакологическими свойствами. В данном разделе мы рассмотрим Ca^{2+} -каналы L-типа, которые были клонированы первыми и остаются наиболее изученными. Каналы этого типа находятся в плазматической мембране скелетных мышц, миокарда и гладких мышц, а также нейронов. Активация их происходит при деполяризации мембраны.

Эти каналы называются каналами L-типа потому, что они в течение долгого времени могут оставаться в открытом состоянии. В клетках скелетных и гладких мышц, миокарда, в нейронах, эндокринных клетках и сетчатке они представлены основными $\text{Ca}_v1.X$ изоформами. Ca^{2+} -каналы L-типа представляют собой гетероолигомерные белковые комплексы, состоящие из пяти

Типы каналов, участвующих в транспорте Ca^{2+} в цитозоль



Три основных типа каналов транспорта ионов Ca^{2+} из внеклеточной среды в клетку. Ионные каналы также осуществляют транспорт ионов Ca^{2+} из внутриклеточных депо в цитозоль. Слева показан градиент ионов Ca^{2+} , создающийся по обеим сторонам плазматической мембраны и мембраны саркоплазматического ретикула

субъединиц: α_1 , α_2 , δ , β и γ (). Функционирование канала и его позиционирование на мембране требуют участия всех субъединиц. Присутствие гидрофобных и гидрофильных последовательностей в составе α_1 -субъединицы позволяет предполагать существование четырех порообразующих структур, каждая из которых состоит из трансмембранных сегментов 5 и 6 и из поровой петли, входящей в состав селективного фильтра. Также предполагается существование четырех сенсорных сегментов, каждый из которых со-

стоит из трансмембранных сегментов 1–4. Такой тип трансмембранной организации напоминает потенциал-зависимые Na^+ -каналы (см. рис. 2.16 и 2.7 Потенциал-зависимые Na^+ -каналы активируются при деполяризации мембраны и транслируют электрические сигналы) и K^+ -каналы (см. 2.6 Различные K^+ -каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам). Субъединица β участвует в инактивации и закрытии канала. Вместе с α -субъединицей она может контролировать воротный

Строение потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала

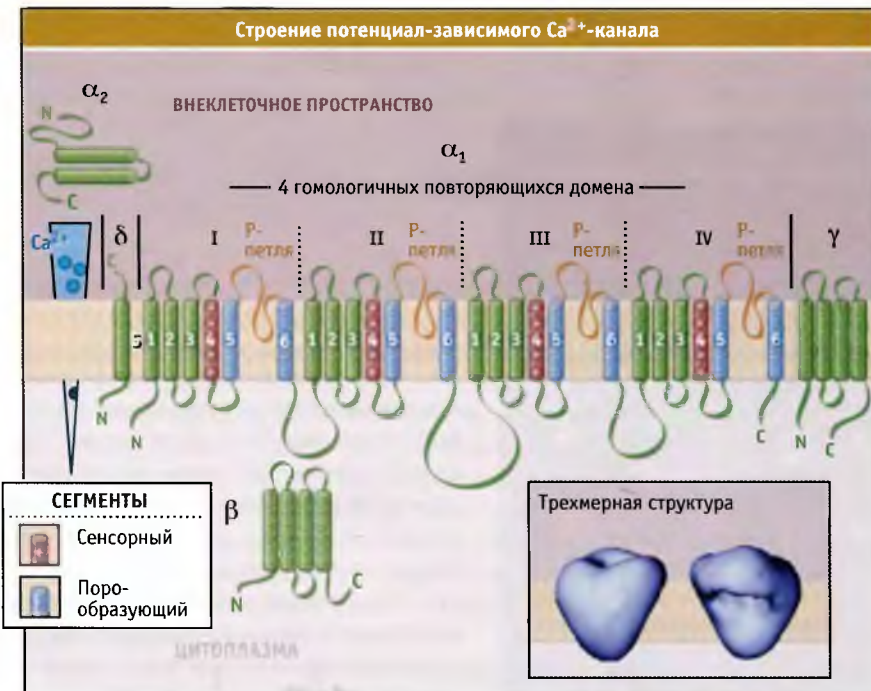


РИС. 2.21. Предполагаемая структура субъединиц Ca^{2+} -канала L типа. Внизу на вставке показана трехмерная структура, полученная с использованием метода электронной криомикроскопии. Из работы Serysheva, I. I., et al. 2002. PNAS. 99: 10370–10375. Copyright 2002 National Academy of Sciences. С разрешения Сьюзен Л. Гамильтон, Медицинский колледж Бэйлора

механизм за счет взаимодействия с порообразующим трансмембранным сегментом S6 домена I.

При использовании метода электронной криомикроскопии были получены данные, позволившие предложить трехмерную структуру, описывающую строение потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала L-типа. Как показано на рис. 2.21, канал представляет собой асимметричный белок, по форме напоминающий сердце и в широкой части снабженный подобием ручки. Большая часть локализована вне клетки и включает структуру наподобие ручки, α_2 -субъединицу, N-терминальный участок субъединицы δ и внеклеточные петли субъединиц α_1 и γ .

Ca^{2+} -каналы обладают высокой селективностью по отношению к ионам Ca^{2+} и осуществляют транспорт ионов с высокой скоростью. Ионы Na^+ относятся к числу самых распространенных внеклеточных катионов, и их концентрация почти в 100 раз превышает концентрацию ионов Ca^{2+} (рис. 2.2). Диаметр ионов Na^+ близок к диаметру ионов Ca^{2+} (2,0 Å). Поэтому посредством простого молекулярного сита разделить их невозможно. Каким же образом Ca^{2+} -каналы достигают высокой селективности в отношении ионов Ca^{2+} и в то же время обеспечивают их быстрый транспорт?

Поры K^+ -каналов обладают селективными фильтрами, которые имитируют водное окружение, стабилизирующее транспортируемые ионы. При прохождении через фильтр ионы подвергаются дегидратации. Например, селективные фильтры K^+ -каналов обладают четырьмя Р-петлями, образующими довольно жесткую структуру, изнутри облицованную атомами кислорода карбонильной группы. Этим достигается определенное расположение ионов K^+ на пути транспорта (см. 2.5 *K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов*). Селективный фильтр потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов, вероятно, также образован четырьмя Р-петлями. Однако полагают, что он представляет собой более гибкую структуру, каждая Р-петля ко-

торой содержит глутаминовый остаток, причем транспортный путь ионов облицован атомами кислорода не от карбонильных, а от карбоксильных групп (Рис. 2.22). (Такая конструкция напоминает EF руку сайта связывания Ca^{2+} , когда ион располагается в полости, содержащей атомы кислорода, многие из которых относятся к карбоксильным группам.) Четыре глутаминовых остатка образуют т. н. локус ЕЕЕЕ, консервативную структуру, характерную для Ca^{2+} -каналов.

Локус ЕЕЕЕ контролирует предпочтительный транспорт ионов Ca^{2+} по сравнению с другими катионами. Замещение любого из четырех остатков глутамата другими аминокислотами резко снижает селективность канала в отношении ионов Ca^{2+} . Предполагается, что специфическое связывание именно ионов Ca^{2+} в области устья поры обеспечивается боковыми цепями глутаминовой кислоты. Это подтверждается данными *in vitro* электрофизиологических измерений, которые демонстрируют, что в отсутствие ионов Ca^{2+} через Ca^{2+} -каналы начинают проходить ионы Na^+ . Ионы Na^+ проходят через канал быстрее ионов Ca^{2+} . Более низкая скорость транспорта ионов Ca^{2+} позволяет предполагать, что они прочнее связываются с порами канала. Это препятствует входу в пору ионов натрия, несмотря на то что во внеклеточном пространстве их содержится больше, чем ионов Ca^{2+} .

Сродство каналов к ионам Ca^{2+} составляет около 10^{-6} М. Однако скорость транспорта, рассчитанная на основании этих данных, получается в 1000 раз ниже, чем измеренная, которая составляет 10^6 в 1 с. Для разрешения этого противоречия была предложена специальная модель. Согласно этой модели, локус ЕЕЕЕ способен связывать несколько ионов Ca^{2+} , и входящий в пору ион, благодаря возникающим силам электростатического отталкивания, вызывает высвобождение с внутренней стороны связанного иона Ca^{2+} (см. рис. 2.22). Таким образом, электростатическое отталкивание помогает преодолеть силу срод-

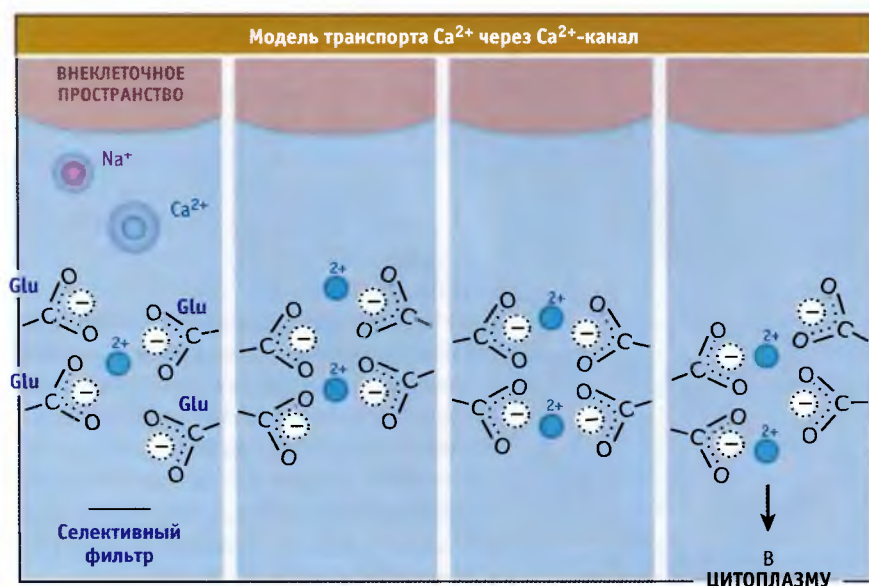


РИС. 2.22. Гипотетический механизм, описывающий транспорт Ca^{2+} через канал с участием ЕЕЕЕ-локуса. Ионы Ca^{2+} энергетически стабилизируют атомы кислорода карбоксильных групп и предотвращают транспорт ионов Na^+ , которые не обладают достаточной величиной положительного заряда, чтобы попасть в локус ЕЕЕЕ и подвергнуться там эффективной дегидратации. Силы электростатического отталкивания, существующие в поро между ионами Ca^{2+} , облегчают быструю диффузию

тва связывания Ca^{2+} , которая бы замедлила его транспорт. Эта модель напоминает предложенную для K^+ -каналов, которые, как показано, обладают несколькими сайтами связывания катиона (см. 2.5 *K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов*).

Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы являются основными клиническими мишенями для лекарственных препаратов, используемых при лечении гипертензии и других заболеваний. К числу наиболее часто применяемых лекарственных средств относятся фенилалкиламины, бензотиазепины и дигидропиридины, которые обычно называют кальциевыми антагонистами. Первоначально, Ca^{2+} -антагонисты были введены в клиническую практику для лечения гипертензии как сосудорасширяющие средства. Они уменьшали уровень Ca^{2+} в гладких мышцах, например в стенке кровеносных сосудов, приводя к снижению тонуса и кровяного давления. Эксперименты по сайт-направленному мутагенезу и по связыванию лекарств позволили идентифицировать сайты, связывающие лечебные препараты. Они находятся в сегментах S5 и S6 III домена и в сегменте S6 IV домена, расположены с цитоплазматической стороны селективного фильтра (см. рис. 2.21). Ингибиторы ряда фенилалкиламина блокируют Ca^{2+} -каналы за счет прямого взаимодействия с остатками глутамата Р-петли селективного фильтра, которые находятся со стороны цитоплазмы, а дигидропиридины и бензотиазепины проникают в пору канала со стороны наружного устья.

2.10 Cl^- -каналы выполняют различные биологические функции

Основные положения

- Cl^- -каналы являются анионными каналами и обладают различными физиологическими функциями
- Селективность Cl^- -каналов обеспечивается антипараллельным расположением субъединиц
- Селективная проводимость и воротный механизм (гейтинг) в Cl^- -каналах структурно сопряжены
- В K^+ - и Cl^- -каналах используются различные механизмы гейтинга и селективности

Хлоридные каналы (Cl^-) относятся к большой группе анионных каналов. Как и другие ионные каналы, каналные белки хлоридных каналов образуют поры в биологических мембранах. Cl^- -каналы обеспечивают транспорт отрицательно заряженных ионов Cl^- в направлении их электрохимического градиента. В экспериментах *in vitro* Cl^- -каналы функционируют как неселективные анионные каналы, которые иногда способны транспортировать другие анионы даже лучше, чем Cl^- . Однако Cl^- относится к наиболее распространенным анионам клетки, и поэтому *in vivo* по таким каналам, главным образом, осуществляется транспорт Cl^- анионов.

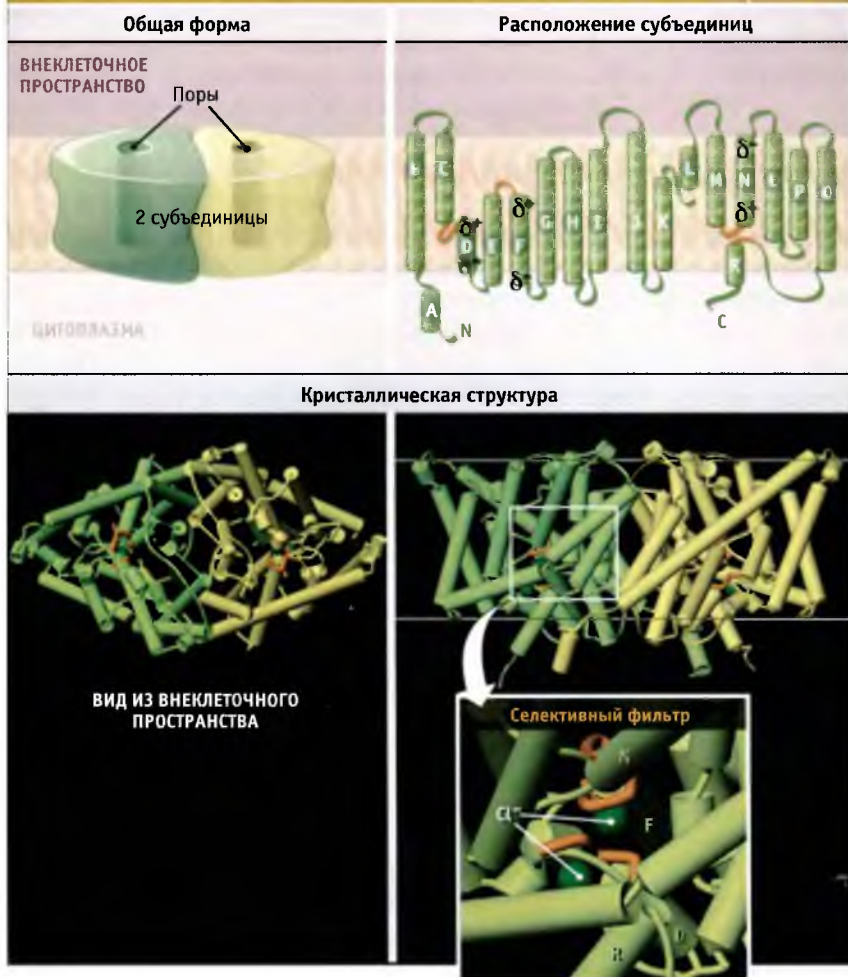
Хлоридные каналы находятся в плазматической мембране и в мембранах внутриклеточных органелл.

К числу их важнейших функций относятся регуляция клеточного объема, ионного гомеостаза и трансэпителиального транспорта ионов. Транспорт Cl^- через плазматическую мембрану играет важную роль в регуляции возбудимости мышц и нейронов. При закислении внутриклеточных компартментов, например эндосом, транспорт в них Cl^- по соответствующим каналам нейтрализует положительный заряд протонов, переносимых H^+ -АТФазами (см. 2.21 *H^+ -АТФазы переносят протоны из цитозоля*).

Гены, кодирующие белки Cl^- -каналов, относятся к трем различным семействам. Первая группа — гены семейства CLC, включает несколько генов, кодирующих белки плазматической мембраны, а также мембран внутриклеточных компартментов. CLC-каналы присутствуют во всех организмах — от бактерий до человека и, в свою очередь, подразделяются на подгруппы по принципу гомологии. Ко второй группе относятся ABC-переносчики, функционирующие как ионные каналы. Единственный представитель этой группы — регулятор трансмембранного переноса при кистозном фиброзе (см. 2.26 Приложение: Мутации в генах белков анионного канала вызывают кистозный фиброз). К третьей группе принадлежат рецепторы γ -аминомасляной кислоты, находящиеся под контролем лигандов, и глициновые рецепторы. Все они являются представителями группы Cl^- -каналов, обладающих специализированными функциями в ЦНС.

CLC Cl^- -каналы представляют собой гомодимеры, каждая субъединица которых образует отдельную проводящую пору. Рентгеноструктурный анализ CLC Cl^- -каналов клеток эукариот не проводился, и мы не располагаем данными об их атомарной структуре. Однако охарактеризована кристаллическая структура соответствующих бактериальных белков. Эти белки функционируют как переносчики, транспортирующие Cl^- -ионы в обмен на протоны, а не в качестве хлоридных каналов, как это предполагалось ранее. Однако результаты секвенирования бактериальных переносчиков демонстрируют их сходство с CLC Cl^- -каналами эукариот. Действительно, CLC-переносчики бактерий представляют собой также гомодимеры (рис. 2.23). Каждая субъединица состоит из 18 α -спиралей, собранных в сложный трансмембранный комплекс. N-терминальная половина (спирали А–I) одной субъединицы близка по структуре к С-терминальной половине (спирали J–R). Две половины субъединицы обладают противоположной (антипараллельной) мембранной ориентацией, напоминающей структуру аквапориновых каналов (см. 2.11 *Селективный транспорт воды происходит через аквапориновые каналы*).

Важнейшим свойством всех CLC Cl^- -каналов является внутренняя сопряженность ионной проводимости и воротного механизма. Это следует из структуры селективного фильтра CLC прокариотических клеток. В центре белковой структуры, в самой узкой части поры, расположен селективный фильтр, а устье поры имеет форму часового стекла. Селективность канала, которая обуславливает преимущественный транспорт по нему анионов, связана



Схематическое строение бактериального транспортного CLC Cl⁻-комплекса и его структура по данным рентгенокристаллографического исследования. Cl⁻-транспортные белки из семейства CLC образуют гомодимеры, и каждая субъединица образует отдельную пору. Части белковой субъединицы, образующие селективный фильтр, выделены оранжевым цветом. Модель кристаллической структуры построена на основании данных Protein Data Bank file 1KPK. Вид из внеклеточного пространства по масштабу меньше, чем вид сбоку. Показано предполагаемое положение мембраны

с двумя особенностями его строения. Первая состоит в том, что положительно заряженные N-концевые группы четырех α -спиральных сегментов (D, F, N и R) обращены к центральной плоскости мембраны (см. рис. 2.23). Вторая особенность касается аминокислотных остатков, которые облицовывают пору. Они образуют водородные связи с Cl⁻-ионами (рис. 2.24). Такое строение поры создает благоприятное электростатическое окружение для ионов Cl⁻ за счет стабилизации их в селективном фильтре и отталкивания положительно заряженных катионов.

Предполагается, что роль ворот выполняет боковая цепь остатка глутаминовой кислоты, расположенная на одной стороне селективного фильтра. (см. рис. 2.24). Механизм работы ворот становится понятным при анализе кристаллической структуры бактериальных CLC-переносчиков дикого типа и их мутантных форм, у которых глутамат заменен остатком другой аминокислоты. В закрытом канале боковая цепь остатка глутамата занимает сайт связывания Cl⁻, имитируя анион. При открытии боковая цепь отклоняется в сторону, тем самым освобождая канал, и ее место занимает хлорид-ион. Остаток глутаминовой кислоты присутствует почти во всех CLC-каналах. Поэтому можно предполагать, что селективный

фильтр CLC-переносчика у бактерий имеет такое же строение, как и CLC Cl⁻-канал клеток эукариот.

Что вызывает вращение остатка глутамата, который играет роль ворот? Различные хлоридные каналы контролируются лигандами, электрическим потенциалом или изменениями концентрации Ca²⁺ в клетке. Они также могут активироваться за счет градиента ионов Cl⁻. Модель, изображенная на рис. 2.24, предполагает, что при превышении определенной внеклеточной концентрации ионов Cl⁻ они вытесняют глутамат из сайтов связывания анионов и начинают транспортироваться через канал. Таким образом, хлорид-ионы и отрицательно заряженные карбоксильные группы боковой цепи глутамата взаимно отталкиваются и конкурируют между собой за связывание с частичными положительными зарядами на α -цепи N. Это обеспечивает быстрый транспорт анионов через канал и дает возможность регулировать воротный механизм непосредственно с помощью хлорид-ионов. Поскольку изменения заряда на мембране могут привести к усилению электрохимического потенциала трансмембранных градиентов Cl⁻, эта модель также объясняет потенциал-зависимое открытие большинства CLC Cl⁻-каналов. Эти каналы не имеют заряженных

ВНЕКЛЕТОЧНОЕ ПРОСТРАНСТВО

КАНАЛ ЗАКРЫТ

КАНАЛ ОТКРЫТ



ЦИТОПЛАЗМА

Селективный фильтр Cl^- -канала содержит три сайта связывания хлорид-ионов. В закрытом канале боковая цепь глутаминовой кислоты (Glu148) занимает сайт связывания иона Cl^- , который ближе всего расположен к устью поры. При открытии канала боковая цепь отклоняется и выходит из канала, а в него поступает хлорид-ион. Показаны остатки аминокислот, участвующие в позиционировании двух других хлорид-ионов. Модели построены на основании данных по кристаллической структуре CLC-канала *E. coli*, Protein Data Bank file 10TS

трансмембранных доменов, выполняющих роль сенсоров заряда, подобно тем, которые находятся в потенциал-зависимых катионных каналах (см. 2.6 *Различные K^+ -каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам*).

Cl^- и K^+ -каналы обладают принципиально различными механизмами, которые обеспечивают транспорт и селективность отбора ионов. Во-первых, в CLC Cl^- -каналах селективный фильтр и ворота представляют собой одну структурную единицу. Напротив, в K^+ -каналах селективный фильтр и ворота образованы двумя отдельными структурами, находящимися на наружной и внутренней сторонах канала соответственно (см. рис. 2.8). Такое разделение двух компонентов канала дает возможность домену, связывающему лиганд, или сенсору заряда открывать и закрывать поры за счет конформационных изменений. Структура селективного фильтра при этом не меняется, и его способность различать катионы, лишь незначительно отличающиеся по размеру, сохраняется. Во-вторых, воротный механизм хлоридного канала предполагает более ограниченное движение (вращение боковой цепи глутамата), чем то, которое происходит при существенных конформационных изменениях в K^+ -канале (см. 2.6 *Различные K^+ -каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам*). В-третьих, необходимое электрическое окружение для транспортируемых ионов Cl^- и K^+ создается частичными положительными или отрицательными зарядами соответственно. Как показано на рис. 2.25, для того чтобы направить частичный положительный заряд диполя N-терминальной спирали к селективному фильтру, CLC Cl^- -каналы имеют антипараллельную структуру. Напротив, для структуры K^+ -каналов характерна параллельная направленность, при которой частичный отрицательный заряд диполя C-терминальной спирали направлен на заполненную водой полость, представляющую собой часть их селективного фильтра (рис. 2.11).

Диполи Cl^- -канала стабилизируют хлоридные ионы

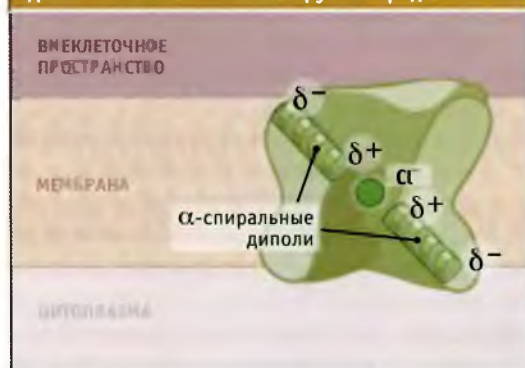


Рис. 2.25. Две половины субъединицы CLC Cl^- -канала находятся в антипараллельной ориентации таким образом, что положительно-заряженные участки диполей определенных α -спиралей обращены в сторону селективного фильтра и влияют на связывание аниона Cl^- с обеих сторон мембраны. Показана одна субъединица

Роль Cl^- -каналов в трансэпителиальном транспорте ионов можно проиллюстрировать на примере функционирования CLC K^+ -каналов почек (рис. 2.26). Для экспрессии этих каналов на базолатеральной мембране толстой восходящей части петли Генле необходима ассоциация с β -субъединицей бартина. Через восходящую часть петли Генле реабсорбируется 25% ионов (NaCl и K^+), однако она непроницаема для воды. Для реабсорбции NaCl особенно необходимы CLC K^+ -каналы, и они также косвенным образом поддерживают необходимую концентрацию K^+ в плазме крови. Это особенно важно, поскольку нервная система и сердце очень чувствительны к изменениям содержания ионов K^+ . Почки фильтруют из крови конечные продукты обмена и ионы. В ходе этого процесса в фильтрат плазмы, который является первичной мочой, переходят анионы и катионы. В дальнейшем они должны реабсорбироваться с тем, чтобы их концентрация в кро-

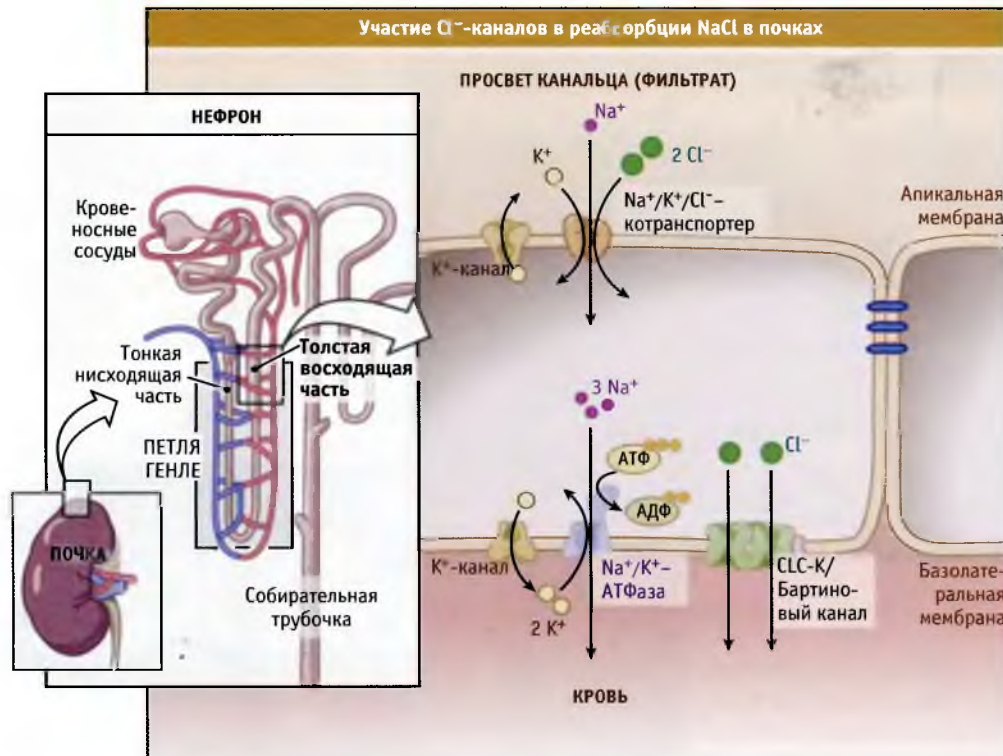


РИС. 2.26. Трансэпителиальный транспорт NaCl в почках. Эпителиальные клетки специализированных участков нефрона (толстая восходящая часть петли Генле) реабсорбируют ионы Na^+ и Cl^- из фильтрата (мочи) посредством $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -котранспортеров, находящихся в апикальной мембране, и через CLC-каналы базолатеральной мембраны

ви поддерживалась на необходимом уровне. Ионы Na^+ и Cl^- реабсорбируются из фильтрата в дистальном прямом канальце — эпителиальном тубулярном сегменте толстой восходящей части петли Генле (подробнее о реабсорбции ионов Na^+ см. 2.8 *Эпителиальные Na^+ -каналы регулируют гомеостаз Na^+*). Реабсорбция хлорид-ионов из фильтрата происходит в апикальной мембране посредством $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -котранспортеров. Транспорт осуществляется за счет действия базолатеральной Na^+/K^+ -АТФазы, которая создает трансмембранный градиент ионов Na^+ , выкачивая их из клетки. Низкое внутриклеточное содержание ионов Na^+ создает благоприятный электрохимический градиент для протекания транспортных процессов, сопряженных с Na^+ . Реабсорбция хлорид-ионов происходит при участии апикальных $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -котранспортеров и приводит к увеличению концентрации в клетке ионов Cl^- . Таким образом, их концентрация становится выше, чем во внеклеточной среде и в просвете канальца, и они начинают выходить из клетки в направлении градиента. Хлорид-ионы выходят в кровь через CLC-K- Cl^- -каналы базолатеральной мембраны. Ионы K^+ , которые проникли в клетку через $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -котранспортеры и базолатеральную Na^+/K^+ -АТФазу, выходят из клетки через K^+ -каналы в апикальной и базолатеральной мембране. Без CLC-K- Cl^- -каналов поток ионов через $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -котранспортеры был бы недостаточным и привел бы к снижению абсорбции NaCl и ионов K^+ .

В противоположность большинству клеток млекопитающих, для которых значение мембранного потенциала покоя определяется проводимостью ионов K^+ , в скелетных мышцах примерно 80% значения мембранного потенциала покоя обеспечивается CLC-1 изоформой хлоридного канала. Важная роль различных CLC Cl^- -каналов и других белков транспорта ионов была установлена в экспериментах по сайт-специфическому мутагенезу при развитии болезней человека и на нокаутных мышцах, у которых отсутствует экспрессия специфических изоформ Cl^- -канала. Например, мутации, приводящие к инактивации CLC-1-канала, вызывают различные формы длительного сокращения мышц, получивших название миотонии. При развитии миотонии аномальная раздражимость вызывает напряженность скелетных мышц и невозможность их расслабления. Мутации в генах, кодирующих синтез белков CLC-K-хлоридных каналов или субъединиц бартина, которые экспрессируются в клетках почек и некоторых отделов преддверно-улиткового органа, приводят к развитию аутосомно-рецессивного наследственного заболевания, называемого синдромом Бартера. При этом заболевании не достигается достаточно полная реабсорбция ионов Cl^- из мочи, что приводит к снижению уровня K^+ в плазме, метаболическому алкалозу, развитию компенсаторного гиперальдостеронизма (при котором организм старается преодолеть последствия снижения объема плазмы и низкого

кровенного давления), а также к сенсорно-невральной глухоте. При эндоцитозе, а также при эндосомальном закислении функционирует ClC-5-изоформа внутриклеточного хлоридного канала. Мутации в соответствующем гене приводят к болезни Дента, которая характеризуется избыточным выведением Ca^{2+} и белка с мочой и образованием почечных камней. Для обеспечения электронейтральности среды при кислотной секреции мембраны остеокластов содержат ClC-7 Cl^- -каналы, которые функционируют совместно с H^+ -АТФазами, закисляющими среду. Мутации в изоформе ClC-7 хлоридного канала приводят к нарушению резорбции кости, сопровождающемуся сжатием костномозговой полости и ее деформацией, называемой остеопетроз.

2.11 Селективный транспорт воды происходит через аквапориновые каналы

Основные положения

- Аквапорины обеспечивают быстрый и селективный транспорт молекул воды через мембраны клетки
- Аквапорины являются тетрамерами, состоящими из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых образует пору
- Селективный фильтр аквапорина характеризуется тремя главными особенностями (фильтрация по размеру, электростатическое отталкивание и ориентация диполей воды), которые обеспечивают его высокую селективность по отношению к воде

Вода представляет собой основной компонент нашего организма, на долю которого приходится 70% веса, и надлежащее ее распределение важно для поддержания баланса жидкости. Для протекания многих физиологических процессов необходим транспорт воды через клеточные мембраны. Однако пассивная диффузия воды через липидный бислой биологических мембран не поддается регуляции и характеризуется ограниченной проницаемостью и низкой скоростью. Быстрый и селективный транспорт воды через мембраны клетки обеспечивается аквапоринами, которые представляют собой специальные трансмембранные каналы. Аквапорины консервативны во всех клетках — от бактерий до человека, и принадлежат к суперсемейству транспортных белков.

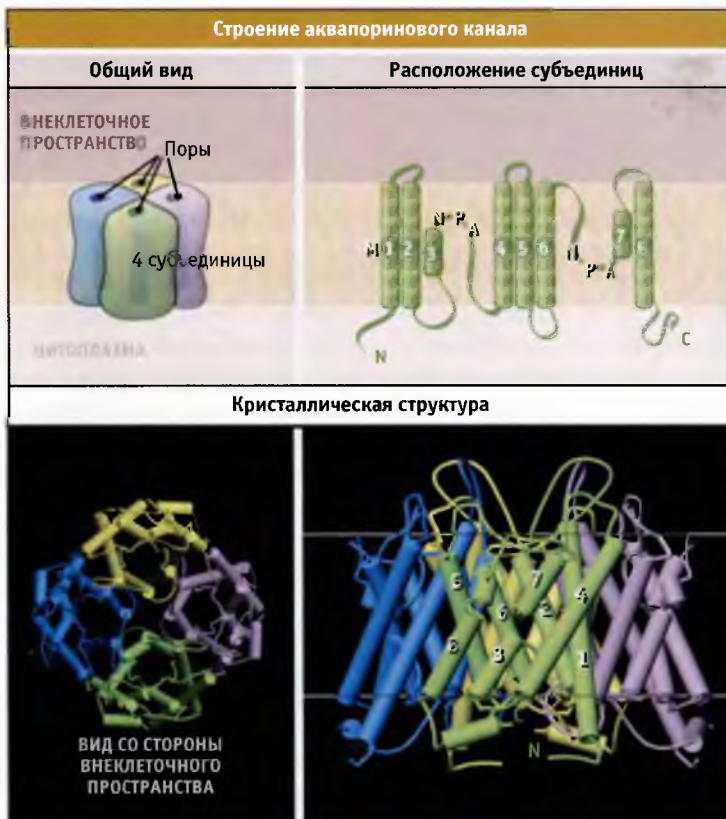
У животных аквапорины участвуют во многих физиологических процессах. Так, они обуславливают развитие чувства жажды; участвуют в концентрировании мочи почками, в пищеварении, регуляции температуры тела, секреции и абсорбции спинномозговой жидкости, выделении слез, слюны, пота и желчи, а также в размножении. Например, эпителиальные клетки почек реабсорбируют обратно в кровь 99% воды из первичной мочи, что предотвращает обезвоживание организма. Если начинается обезвоживание, то клетки нефрона, чувствительные к изменению осмотического давления,

обнаруживают повышение осмоларности внеклеточных жидкостей. В ответ стимулируется выброс из гипофиза гормона вазопрессина (антидиуретического гормона). Повышение уровня этого гормона в плазме приводит к уменьшению объема мочи и к ее концентрированию. Связывание вазопрессина с рецепторами клеточной мембраны приводит к быстрой экспрессии аквапорина-2 в апикальной мембране собирательных трубочек почек. Это достигается слиянием внутриклеточных везикул, содержащих аквапорин-2, с апикальной мембраной эпителиальных клеток. Таким образом, в ответ на повышение осмотического градиента, которое наступает при обезвоживании, аквапорины увеличивают реабсорбцию воды из мочи в кровь.

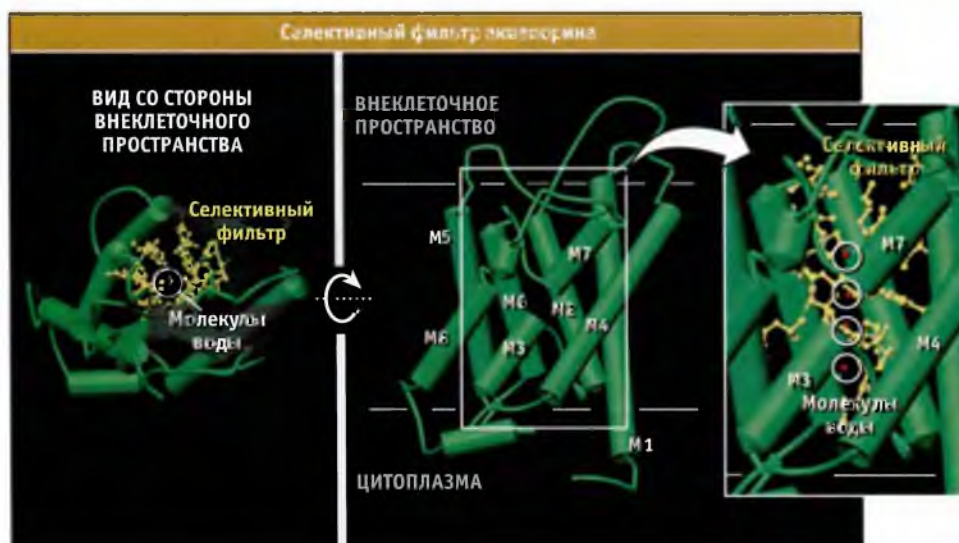
Аквапорины являются гомотетрамерными водными каналами, которые регулируют транспорт воды, происходящий за счет осмотического градиента. В отличие от K^+ -каналов, в которых четыре субъединицы образуют одну пору, в аквапорине каждая субъединица образует независимую пору (рис. 2.28) (см. 2.5 K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов). Каждая субъединица аквапорина состоит из шести трансмембранных сегментов (M1, M2, M4, M5, M6, и M8), образующих тандемные повторы, каждый из которых, в свою очередь, состоит из трех сегментов. Петли, соединяющие второй и третий трансмембранные сегменты каждого повтора, содержат сигнатурную последовательность аспарагин-пролин-аланин (NPA), одинаковую для всех аквапоринов. Эти две NPA-последовательности в центре водной поры располагаются рядом, образуя часть селективного фильтра. Одна субъединица аквапорина обладает крайне высокой способностью к транспорту воды, которая достигает 3×10^9 молекул в 1 с. В то же время транспорт других растворителей и ионов происходит с существенно меньшей скоростью. Необходимо отметить, что аквапорины содержат трансмембранный водяной канал, через который вода проходит с высокой скоростью и в обоих направлениях. В то же время этот канал не пропускает ионы и даже протоны в форме H_3O^+ . Такая высокая селективная пропускная способность играет существенную роль в функционировании почек, поскольку одновременная реабсорбция воды и протонов привела бы к несовместимому с жизнью ацидозу.

Пора аквапорина подразделяется на три отдела: наружное устье, собственно узкая пора, содержащая селективный фильтр, и внутреннее устье размером 20 Å. Эти три отдела формируют транспортный путь, форма которого напоминает часовое стекло. На рис. 2.28 выделены остатки аминокислот, участвующие в образовании селективного фильтра. Большая часть стенки канала селективного фильтра построена гидрофобными остатками. Гидрофильные остатки имеют химические группы, необходимые для осуществления селективного транспорта молекул воды.

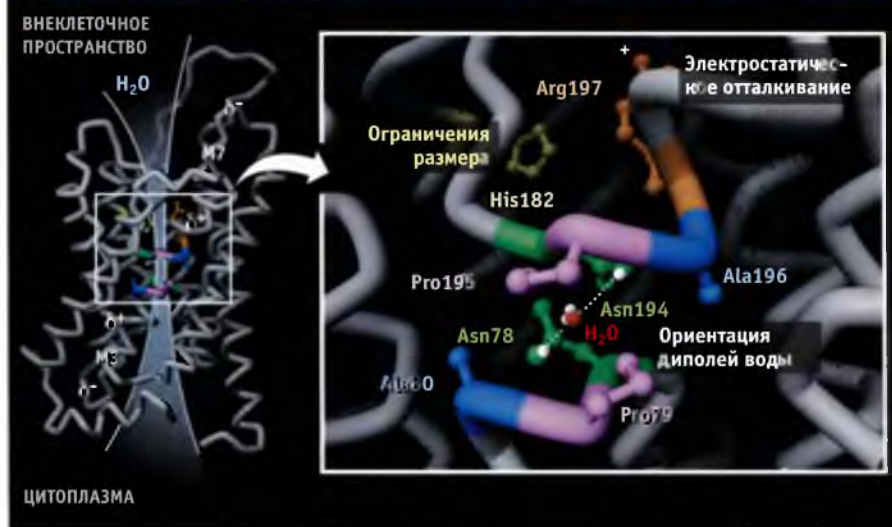
Поры аквапорина характеризуются тремя особенностями, которые обеспечивают им необходимую специфичность по отношению к молекулам воды (рис. 2.29, AQP1 человека):



Схематическая структура и кристаллическое строение комплекса аквапоринового канала. Комплекс состоит из четырех идентичных субъединиц, и каждая субъединица образует пору. Кристаллическая структура построена на основании данных Protein Data Bank file 1J4N. Масштаб структуры, видимой со стороны внеклеточного пространства, меньше, чем при виде сбоку. Показано предполагаемое положение мембраны



Кристаллическая структура субъединицы аквапоринового канала AQP1. Показано предполагаемое положение мембраны. Остатки, входящие в селективный фильтр, обозначены желтым цветом. Остальная часть белка представлена в виде петель и спиралей (цилиндров). Использованы данные Protein Data Bank file 1J4N



- Ограничения размера. С внешней стороны мембраны в самой узкой точке устье поры достигает 2,8 Å в диаметре. Эта область называется область сжатия. Молекулы воды транспортируются через эту область поодиночке, причем гидратированные ионы и протоны в пору не проходят.
- Электростатическое отталкивание. Положительный заряд остатков Arg 197, выступающих пору, способствует электростатическому отталкиванию положительно заряженных молекул и не дает возможность ионам гидрония (H₃O⁺, образующимся при протонизации молекул воды) проходить через пору. Вместе с тем, в результате немембранного перекрытия α-спиралей M3 и M7 возникают частичные положительные заряды, которые блокируют протонную проводимость.
- Ориентация диполей воды. Селективность увеличивается за счет реориентации диполей воды при образовании водородных связей с частичными положительными зарядами боковых цепей двух аспарагиновых остатков в последовательности NPA (Asn78 и Asn194), находящихся в центре канала. При этом молекулы приобретают определенную ориентацию, и создается второй барьер для входа в пору H₂O⁺. Способность аквапорина связывать воду приводит к снижению энергетического барьера для процессов транспорта преимущественно по гидрофобному пути. Однако количество актов взаимодействия и величина сродства недостаточны для того, чтобы обеспечить быстрый транспорт воды.

Перечисленные особенности селективного фильтра аквапорина обеспечивают быстрый транспорт воды через мембраны, причем протоны, находящиеся в форме H₃O⁺, и другие ионы в пору не проходят.

Различные формы аквапорина играют важную роль в поддержании гомеостаза жидкостей на орган-

ном и системном уровнях. В почках экспрессируется несколько изоформ аквапорина, которые участвуют в абсорбции воды из канальцев. Аквапорин I присутствует в эпителиальных клетках проксимальных канальцев и нисходящих тонких участков петли Генле, где обеспечивается постоянная высокая проницаемость для молекул воды. В организме человека аквапорин-1 ежедневно обеспечивает концентрацию 180 л крови до объема 1,5 л, что соответствует объему выводимой мочи. При этом, за счет реабсорбции через апикальную мембрану, около 178,5 л воды из первичного фильтрата возвращается в кровь (реабсорбция воды также происходит внеклеточным путем). У больных с генетическими дефектами аквапорина-1 процесс концентрации мочи нарушен. Экспрессия аквапорина-2 в эпителиальных клетках почек отличается от экспрессии аквапорина-1. Как отмечалось ранее в данном разделе, гормон вазопрессин стимулирует экспрессию аквапорина-2 в клетках собирательных трубочек, что приводит к концентрированию мочи. Повышение потребления воды или подавление секреции вазопрессина при потреблении больших количеств алкоголя или кофе приводит к экскреции почками больших количеств разбавленной мочи. У больных несахарным диабетом аквапориновые-2 каналы обладают генетическим дефектом. Такие больные ежедневно выделяют до 20 л мочи. В клетках головного мозга, расположенных рядом с небольшими кровеносными сосудами, экспрессируется аквапорин-4. Он регулирует транспорт воды между паренхимой мозга и сосудами. Аквапорин-4 является потенциальной мишенью для лекарственных средств, используемых при отеке мозга, который часто определяет прогноз при травмах головы и инсульте. Аквапорин-0 экспрессируется только в волокнах хрусталика, и миссенс-мутации приводят к развитию у детей врожденных катаракт.

2.12 Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов

Основные положения

- Потенциал действия обеспечивает клеткам способность быстро взаимодействовать друг с другом
- Ключевыми элементами потенциала действия являются потоки ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+}
- Деполяризация мембраны обеспечивается потоком в клетки ионов Na^+ через потенциал-зависимые Na^+ -каналы
- Реполяризация возникает за счет транспорта ионов K^+ через несколько различных K^+ -каналов
- Электрическая активность органов выражается как сумма векторов потенциала действия
- Нарушения генерации или распространения потенциала действия могут predispose к развитию аритмий или эпилепсии

Нейроны, мышечные и эндокринные клетки относятся к числу возбудимых клеток, поскольку они могут создавать электрические сигналы и/или отвечать на них. В этих клетках происходят быстрые обратимые изменения мембранного потенциала, которые переводятся в электрические сигналы, например в нервный импульс, распространяющийся по аксону нейрона, или в сигнал, который приводит к мышечному сокращению. Такой электрический сигнал называется **потенциал действия**. Процесс восприятия в головном мозгу включает обработку огромного количества потенциалов действия. Эти потенциалы действия могут возникать до появления стимула, одновременно с ним, или после него, и имеют различные пространственные и временные характеристики. В клетках скелетных мышц и миокарда потенциал действия играет критическую роль в инициации и координации процесса их синхронного сокращения. Амплитуда и продолжительность потенциала действия измеряются электрофизиологическими методами. В нейронах продолжительность потенциала действия составляет несколько миллисекунд, а в клетках миокарда — сотни миллисекунд. Более высокая продолжительность потенциала действия в клетках миокарда необходима для координации процессов активации в миллионах мышечных клеток, ответственных за сердечные сокращения (см. 2.13 *Сердечная и скелетная мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения*). Распространение потенциала действия по мембране происходит со скоростью несколько метров в секунду. Этим обеспечивается быстрая взаимосвязь на значительном расстоянии между клетками. Такая связь является основой для реализации сложных физиологических функций головного мозга и сердца.

Ключевую роль в генерации потенциала действия играет трансмембранный потенциал. В состоянии покоя в клетке поддерживается отрицательное значение мембранного потенциала, т. е. внутренняя ее среда по отношению к внешнему окружению заряжена несколько более отрицательно. Мембранный потенциал покоя поддерживается, главным образом, за счет действия Na^+/K^+ -

АТФаз, которые нагнетают в клетку три иона Na^+ на каждые два иона K^+ , транспортируемые из клетки, а также за счет функционирования K^+ -каналов (см. 2.4 *Электрохимический градиент по обеим сторонам мембраны создает мембранный потенциал* и 2.19 *Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану*).

Около пятидесяти лет назад на основании электрофизиологических данных была предложена модель механизма возникновения потенциала действия (см.

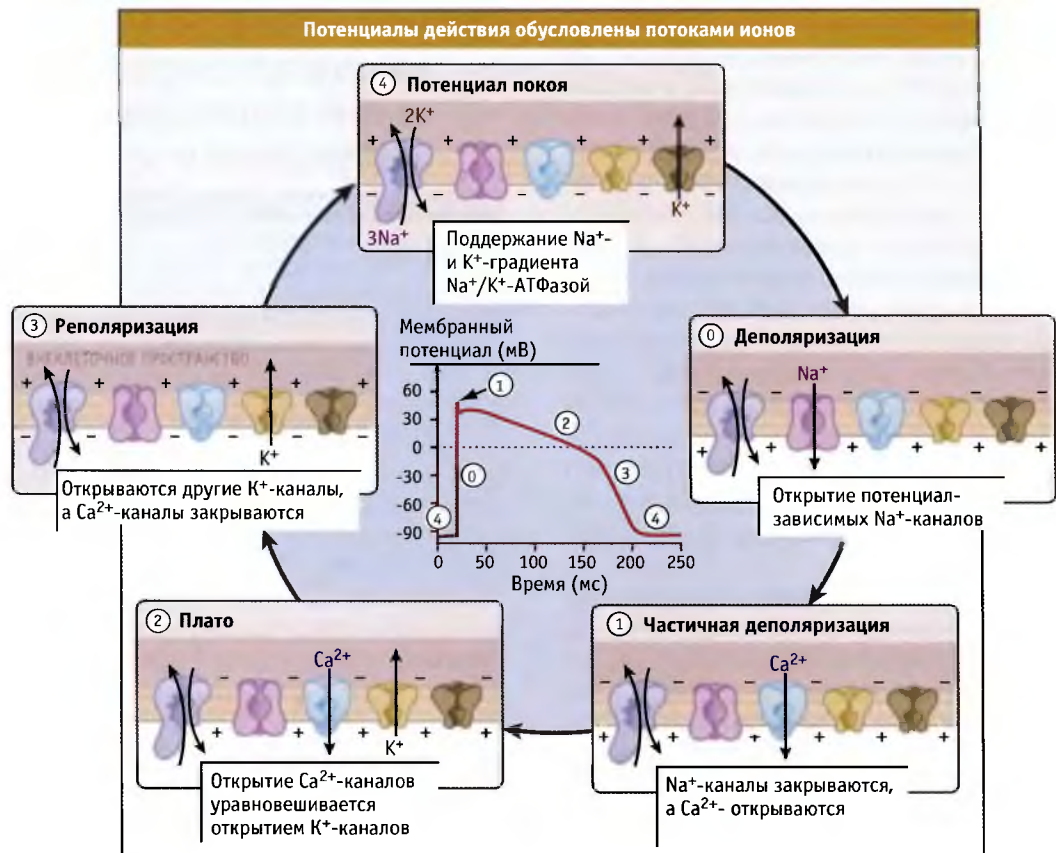
EXP:2-0001). Модель предусматривает два ключевых момента, определяющих возникновение потенциала действия:

- наличие обратимых скоординированных изменений в селективной проводимости клеточной мембраны для ионов Na^+ или K^+ ;
- эти изменения проводимости зависят от мембранного потенциала.

Потенциал действия возникает за счет скоординированных процессов активации и инактивации ионных каналов нескольких различных типов. Возникновение электрических сигналов в мембране становится возможным при реализации сенсорной функции потенциал-зависимых ионных каналов и их реакции на изменения мембранного потенциала. Как показано для клеток миокарда, открытие и закрытие различных типов ионных каналов происходит последовательным образом в различных фазах потенциала действия (*). Быстрые изменения мембранного потенциала обусловлены локальными трансмембранными изменениями концентрации ионов, которые почти не влияют на общую их концентрацию в клетке.

Потенциал действия возникает при быстром скачке заряда (фаза 0), который инициируется открытием потенциал-зависимых Na^+ -каналов и обеспечивает быстрый поток в клетку ионов натрия в направлении их концентрационного градиента (см. рис. 2.30). В результате транспорта ионов натрия происходит деполяризация мембраны, и внутриклеточная среда приобретает более положительный заряд по сравнению с внеклеточным окружением. (Подробнее о потенциал-зависимых Na^+ -каналах см. 2.7. *Потенциал-зависимые Na^+ -каналы активируются при деполяризации мембраны и транслируют электрические сигналы.*)

Через несколько миллисекунд, по мере того как происходит быстрая инактивация Na^+ -каналов, деполяризация прекращается, и наступает ранняя реполяризация (фаза 1). Когда в клетках миокарда происходит закрытие потенциал-зависимых Na^+ -каналов, открываются потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы и выводящие K^+ -каналы. Эти каналы активируются по мере роста положительного мембранного потенциала, который происходит при деполяризации мембраны. Устанавливается новая величина мембранного потенциала. Эта величина определяется тонким балансом между токами деполяризации и реполяризации мембраны в фазе 2. Для того чтобы Na^+ -каналы снова приобрели способность к активации, они должны выйти из фазы инактивации, а для этого необходима реполяризация мембранного потенциала. Небольшая часть



2.10. Генерация и распространение потенциала действия обусловлены потоками ионов. Потенциал действия клеток миокарда подразделяется на пять фаз. Каждая фаза связана с открытием и/или с закрытием определенных ионных каналов. Разные типы K^+ -каналов, которые открываются и закрываются в различные фазы потенциала действия, неспецифичны для данной фазы и показаны одинаковым образом. Во время генерации и распространения потенциала действия функционирует Na^+/K^+ -АТФаза, однако скорость ее работы меняется по мере изменения мембранного потенциала

Na^+ -каналов не инактивируется и обеспечивает небольшой, но постоянный поток ионов, который наряду с поддерживающим транспортом Ca^{2+} в клетку способствует продолжительности пребывания клеток миокарда в деполаризованном состоянии. По сравнению с потенциалом действия нейронов, потенциал действия клеток миокарда проявляется в течение более длительного промежутка времени. Длительный потенциал действия необходим для того, чтобы обеспечить достаточно времени для высвобождения внутриклеточного кальция, необходимого для мышечного сокращения и предотвращения при этом aberrантной мембранной деполаризации (см. 2.13 *Сердечная и скелетная мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения*).

В клетках крупных животных и человека фазы 1 и 2 потенциала действия разделены небольшим пиком. В фазе 2 (плато-фазе) при последовательной активации нескольких различных K^+ -каналов из клетки выходят ионы K^+ . При этом их убыль быстро уравнивается положительно заряженными ионами, поступающими в клетку по Na^+ - и Ca^{2+} -каналам. Более того, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ обменник вытес-

няет ионы Ca^{2+} из цитозоля, создавая деполаризующий поток, направленный внутрь клетки (см. 2.16 *Для функционирования многих переносчиков необходимо существование трансмембранного градиента ионов Na^+*). Вместе с тем, Na^+/K^+ -АТФаза продолжает вытеснять из клетки три иона Na^+ в обмен на два иона K^+ , что сдвигает мембранный потенциал в сторону реполаризации (фаза 3). Попеременное открытие и закрытие различных ионных каналов снижают потенциал действия, и в клетке устанавливается отрицательный мембранный потенциал покоя (фаза 4). Для прекращения эффекта потенциала действия необходима высокая скорость транспорта ионов. Это достигается с помощью K^+ -каналов, которые к тому же проявляют высокую селективность (см. 2.5 *K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов*). Например, для того чтобы быстро снять эффект потенциала действия в нейронах, из клетки за миллисекунду выходят миллионы ионов K^+ .

В различных типах клеток генерация и передача электрического сигнала обеспечивается участием большого количества потенциал-зависимых K^+ -каналов. На-

пример, входные выпрямляющие K^+ -каналы необходимы для установления стабильного мембранного потенциала покоя и продолжительной плато-фазы в клетках миокарда. При положительном мембранном потенциале эти каналы в основном закрыты, что обеспечивает большую продолжительность процесса мембранной деполяризации (подробнее о внутренних очистительных K^+ -каналах см. 2.25 Приложение: Большинство K^+ -каналов способны обеспечивать входящее выпрямление). Изначально, в клетках миокарда, когда значение мембранного потенциала меняется от -40 мВ в положительную сторону, отмечается лишь минимальный поток ионов K^+ . Это поддерживает влияние деполяризующих потоков натрия и кальция на продолжительность потенциала действия до момента активации K^+ -канала входящего выпрямления, в результате функционирования которого мембранный потенциал возвращается к состоянию покоя (см. рис. 2.30).

Суммарная электрическая активность, которая складывается из индивидуальных потенциалов действия всех нейронов мозга, всех клеток определенной группы мышц, или всех клеток миокарда, после амплификации может быть зарегистрирована в виде электроэнцефалограммы (ЭЭГ), электромиограммы (ЭМГ) или электрокардиограммы (ЭКГ) соответственно. Процедура регистрации изменений электрической активности используется для контроля над развитием различных патологических состояний: эпилепсии, миотоний или аритмий. Развитие этих патологических состояний может явиться следствием мутаций, влияющих на функционирование определенных типов ионных каналов.

Мутации, возникающие в генах, кодирующих белки потенциал-зависимых Na^+ , K^+ или Ca^{2+} -каналов, обуславливают нарушения функций головного мозга и сердца. Например, мутации в гене *SCN5A*, кодирующем белок потенциал-зависимого натриевого канала клеток миокарда, вызывают некоторые болезни сердца. В результате некоторых типов мутаций в этом гене развивается синдром удлиненного QT, при котором неполная инактивация Na^+ -каналов увеличивает продолжительность потенциала действия. Наряду с этим, мутации в гене одного из белков $Ca_v1.2$ канала, который определяет длительность плато-фазы потенциала действия, приводят к развитию синдрома удлиненного QT и аритмий. Последние вызывают задержку реполяризации сердца и увеличивают у больных риск внезапной смерти. Другие мутации, затрагивающие белки потенциал-зависимых Na^+ -каналов, приводят к развитию различных болезней сердца, параличам скелетных мышц или к наследственным формам эпилепсии. Примером мутации в белках потенциал-зависимого K^+ -канала, связанной с болезнью сердца, является мутация в гене *HERG*. Она увеличивает скорость инактивации канала, что снижает поток ионов K^+ из клетки и замедляет фазу реполяризации потенциала действия. Таким образом, эта мутация увеличивает продолжительность потенциала действия, подобно тому как это происходит при мутациях в генах, кодирующих потенциал-зависимые Na^+ -каналы.

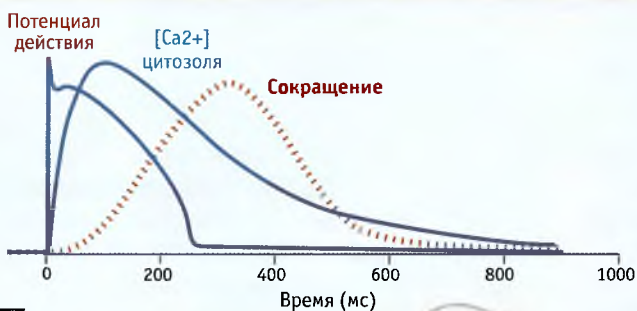
2.13 Сердечная и скелетные мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения

Основные положения

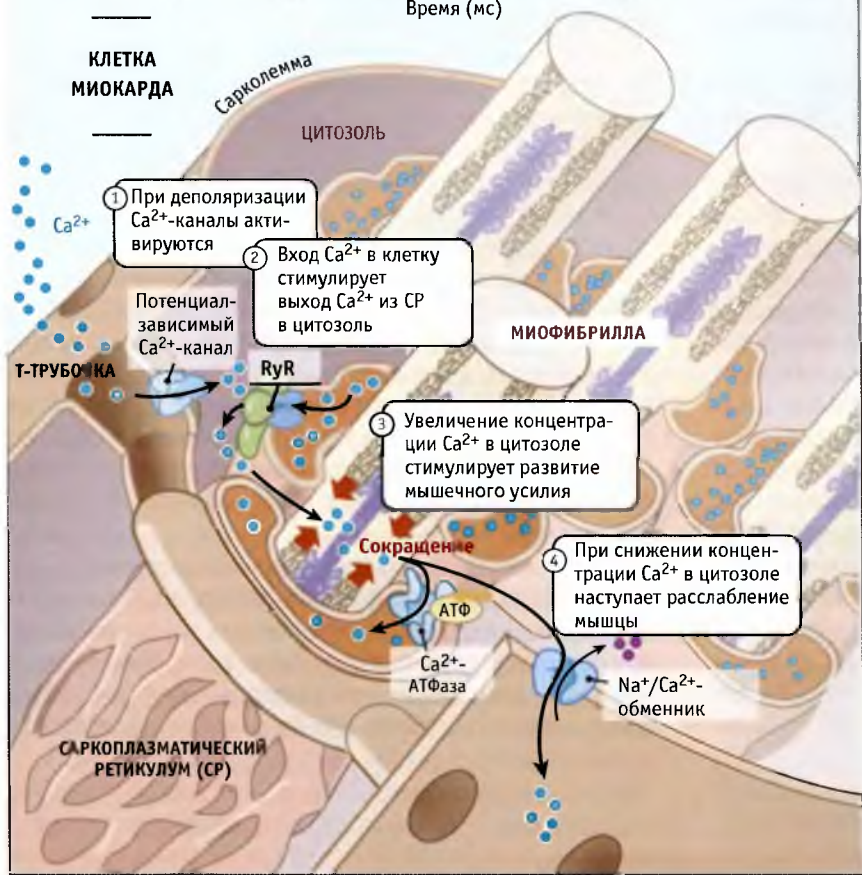
- Мышечное сокращение контролируется сопряжением процессов возбуждения и сокращения, которые инициируются при деполяризации мембраны
- Рианодиновые рецепторы и рецепторы инозитол 1,4,5-трифосфата представляют собой Ca^{2+} -каналы, через которые ионы Ca^{2+} высвобождаются из внутриклеточных депо в цитозоль
- Внутриклеточное высвобождение Ca^{2+} через рианодиновые рецепторы мембраны саркоплазматического ретикулама стимулирует сокращение микрофиламентов
- В снижении концентрации Ca^{2+} в цитозоле и расслаблении мышц участвуют несколько разных типов Ca^{2+} -транспортных белков, включая Na^+/Ca^{2+} -обменник и Ca^{2+} -АТФазу.

Ионы Ca^{2+} представляют собой **вторичный мессенджер**, принимающий участие в многочисленных процессах передачи сигнала в различных клетках. У высших организмов внутриклеточный Ca^{2+} участвует в таких разнообразных процессах, как синаптическая передача, мышечное сокращение, секреция инсулина, оплодотворение и экспрессия генов. В данном разделе мы рассмотрим вопросы регуляции мышечного сокращения и сердечного ритма ионами Ca^{2+} (подробнее о роли цитоскелета в мышечном сокращении см. 8 Актин). Процесс, в результате которого деполяризация мембраны приводит к генерации мышечных усилий, называется **сопряжением возбуждения и сокращения**. Это фундаментальный механизм, контролирующей функции скелетных и сердечной мышц. В цитозоле клеток покоящихся мышц поддерживается гораздо более низкая концентрация свободного Ca^{2+} ($\sim 10^{-7}$ М), чем во внеклеточной среде ($\sim 10^{-3}$ М) и в саркоплазматическом ретикулуме. В начале процесса сопряжения возбуждения и сокращения ионы Ca^{2+} начинают поступать в цитозоль, а по мере возвращения клетки в состояние покоя выходят оттуда. Такое увеличение и снижение концентрации Ca^{2+} в цитозоле представляют собой фазный момент в процессе сопряжения возбуждения и сокращения. Для его протекания необходимо участие нескольких типов Ca^{2+} -транспортных белков.

В клетках сердечной мышцы процесс возбуждения и сокращения подразделяется на четыре стадии (рис. 2.31). На первой стадии, при деполяризации плазматической мембраны (сарколеммы) на ней генерируется электрический сигнал. При этом, благодаря входящему потенциалу действия, мембранный потенциал приобретает более положительное значение по сравнению с потенциалом покоя (см. рис. 2.30 и 2.12 Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов). Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы (которые называются $Ca_v1.2$ Ca^{2+} -каналы) улавливают эти изменения мембранного потенциала и открываются (фаза 2 потенциала действия



КЛЕТКА МИОКАРДА



При генерации и распространении потенциала действия в клетках миокарда концентрация Ca^{2+} в цитозоле увеличивается и снижается. Это обеспечивается несколькими различными типами белков, транспортирующих Ca^{2+}

клеток миокарда). Небольшой поток ионов Ca^{2+} начинает транспортироваться в клетку в направлении электрохимического градиента (подробнее о потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналах см. 2.9 *Ca²⁺-каналы плазматической мембраны активируют внутриклеточные функции*).

На второй стадии при поступлении Ca^{2+} через $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} -каналы начинается высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, в котором он депонирован в миллимолярных концентрациях. Выход Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума происходит через особые каналы, называемые рианодиновыми рецепторами (RyRs). В клетках сердечной мышцы этот процесс носит название Ca^{2+} -зависимый выход Ca^{2+} . Количество Ca^{2+} , выходящее в цитозоль из саркоплазматического ретикулума, в несколько раз превышает поступающее в цитозоль через сарколемму. Ca^{2+} -зависимые Ca^{2+} -каналы саркоплазмати-

ческого ретикулума клеток миокарда называются рианодиновыми рецепторами, поскольку они специфически связывают растительный алкалоид рианодин, блокирующий их действие. В различных клетках экспрессируются разные каналы внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} , которые открываются в ответ на разнообразные сигналы, вызывающие мышечное сокращение. Основной вид каналов, высвобождающих Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума клеток миокарда, относится к изоформе RyR2.

На третьей стадии увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле приводит к активации Ca^{2+} -зависимого белка тропонина С, который стимулирует сокращение мышечных волокон. Для эффективной активации всех внутриклеточных микрофиламентов и сокращения сердечной мышцы необходимо увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле со 100 нМ до 1,0 мкМ.

На четвертой стадии, когда Ca^{2+} вытесняется из цитозоля, наступает расслабление мышцы. Вытеснение Ca^{2+} происходит по нескольким механизмам. Основной из них — мобилизация Ca^{2+} обратно в депо саркоплазматического ретикулума с помощью Ca^{2+} -АТФазы. Этот фермент осуществляет функцию насоса и направляет обратно в депо Ca^{2+} , который высвободился из саркоплазматического ретикулума при участии RyRs (подробнее о Ca^{2+} -АТФазе см. 2.18 *Ca^{2+} -АТФаза закачивает Ca^{2+} во внутриклеточное депо*). Наряду с этим, Ca^{2+} удаляется из цитозоля при участии таких Ca^{2+} -транспортных белков, как $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник плазматической мембраны. Этот обменник выводит из цитозоля небольшую часть Ca^{2+} , поступившего через потенциал-зависимые $\text{Ca}_v1.2$ Ca^{2+} -каналы. Немного Ca^{2+} также обменивается между цитозолем и митохондриями.

В общем, за небольшими исключениями, процессы возбуждения и сокращения в скелетных и сердечной мышцах сходны. В отличие от клеток миокарда, потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны скелетных мышц представлены другой изоформой и стимулируют выход Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума при физическом взаимодействии с изоформой рианодинового рецептора — RyR1. Наряду с этим, активация скелетных мышц может постепенно нарастать за счет вовлечения в процесс все большего количества мышечных волокон, что приводит к увеличению силы сокращения. Таким образом, активация скелетных мышц может варьировать от коротких одиночных до повторяющихся тетанических сокращений и в конце концов ограничивается степенью мышечной усталости.

Каналы высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} относятся к числу уникальных ионных каналов. Они подразделяются на две группы: RyRs включаются и выключают-

ся под действием Ca^{2+} или при прямом взаимодействии с Ca^{2+} -каналами плазматической мембраны, и близкие к ним рецепторы инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3Rs), которые регулируются IP_3 . Четыре RyR или IP_3R субъединицы собираются в симметрично организованный комплекс, образующий канал (иллюстрирует строение IP_3R). Оба типа каналов состоят из двух доменов: порового и большого цитоплазматического, снабженного воротным механизмом. Предполагается, что канал IP_3Rs имеет шесть трансмембранных сегментов и одну поровую петлю на субъединицу. Близкая структура постулируется и для RyRs.

Ca^{2+} -каналы RyR представляют собой самые большие из известных ионных каналов. Структура их доменной организации получена при трехмерном моделировании с использованием данных электронно-микроскопических исследований. Эти каналы в 10 раз больше, чем Na^+ , Ca^{2+} - или K^+ -каналы (рис. 2.13). Каждая субъединица RyR состоит примерно из 5000 остатков аминокислот, почти вдвое превышая размер частично гомологичной IP_3R субъединицы. Величина поровых доменов RyRs и IP_3Rs примерно такая же, как для K^+ -каналов. Большие цитоплазматические домены RyRs и IP_3Rs контролируют открытие–закрытие каналов с помощью Ca^{2+} и IP_3 , подобно тому, как это имеет место в лиганд-зависимых K^+ -каналах (см. 2.6 *Различные K^+ -каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам*).

Мутации, нарушающие процессы открывания–закрывания каналов внутриклеточного высвобождения Ca^{2+} , приводят к развитию различных заболеваний. Например, миссенс-мутации в гене, кодирующем белок RyR2, связаны с двумя генетическими формами аритмии и внезапной смерти при физической нагрузке. Му-

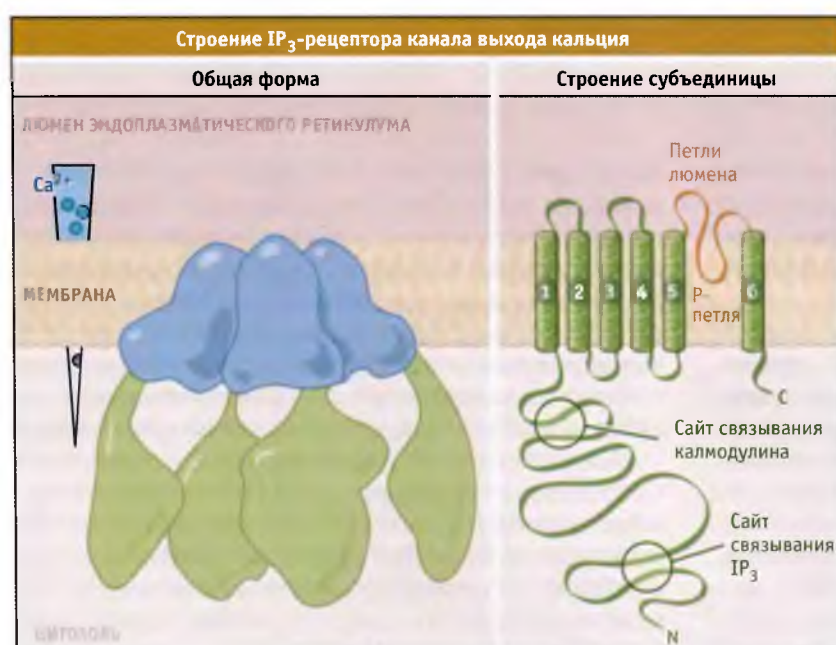


Рис. 2.13. Предполагаемая структура инозитол-1,4,5-трифосфатного рецептора эндоплазматического ретикулума. Слева показан Ca^{2+} -градиент, создающийся по сторонам мембраны эндоплазматического ретикулума в покоящихся клетках животных



и 3 Два внутриклеточных канала, высвобождающих Ca^{2+} : IP_3 -рецептор (IP_3R) и рианодинный рецептор (RyR), и два K^{+} -канала: потенциал-зависимый канал Шейкера и Ca^{2+} -зависимый канал MthK различаются по размерам. Поровые домены обозначены голубым и желтым цветом соответственно

тантная форма RyR Ca^{2+} -канала обладает пониженным сродством к калстабину 2 (который также называется FKBP12.6). Калстабин2 представляет собой субъединицу Ca^{2+} -канала, которая стабилизирует закрытое состояние RyR миокарда, предотвращая его aberrantную активацию. В результате мутации в белке RyR в фазе покоя или диастолы сердца, из саркоплазматического ретикулума начинается усиленный выход ионов Ca^{2+} . Более того, разрегулирование RyR2 при болезнях сердца увеличивает вероятность ухудшения сердечной функции и наступления внезапной смерти. К общему механизму, вероятно, относится внутриклеточная утечка Ca^{2+} , которая за счет aberrантной деполяризации мембраны может вызвать угрожающую аритмию.

Мутации в гене, кодирующем RyR -изоформу клеток скелетных мышц, также приводят к aberrантному выходу внутриклеточного кальция, что служит причиной заболевания, известного под названием злокачественная гипертермия. Больные крайне чувствительны к неконтролируемому внутриклеточному выходу Ca^{2+} , при этом у них поднимается температура и отмечается генерализованная мышечная контрактура. При применении в ингаляциях некоторых анестетиков и мышечных релаксантов у больных могут наступить серьезные нарушения метаболических процессов, представляющие угрозу для жизни. Мутации в гене, кодирующем белок потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов плазматических мембран скелетных мышц, который физически взаимодействует с RyRs и активирует его, также обеспечивают восприимчивость к развитию злокачественной гипертермии.

2.14 Некоторые белки осуществляют перенос глюкозы за счет унипортного транспорта

Основные положения

- Для того чтобы преодолеть гематоэнцефалический барьер, глюкоза транспортируется в астроциты через эндотелиальные клетки небольших кровеносных сосудов
- Белки переносят глюкозу за счет унипорта, транспортируя ее в направлении градиента концентрации
- Белки, переносящие глюкозу, претерпевают конформационные изменения, которые приводят к реориентации их субстратных сайтов в мембране клетки

В клетках эукариот основным источником энергии является глюкоза, и многие клетки нуждаются в постоянном ее поступлении, поскольку у них глюкоза служит основным источником энергии для синтеза АТФ. Глюкоза представляет собой полярную молекулу, которая способна к гидратации, а клеточные мембраны не пропускают такие небольшие полярные метаболиты, как сахара. Поэтому для транспорта глюкозы в клетку требуется участие специфических мембранных белков. Транспорт глюкозы через плазматическую мембрану происходит с участием продуктов двух семейств генов. Переносчики глюкозы (GLUTs) осуществляют независимый перенос (унипорт), при котором через мембрану происходит облегченный транспорт глюкозы. В противоположность GLUT-белкам, котранспортеры Na^{+} /глюкоза расходуют энергию трансмембранного градиента Na^{+} на транспорт глюкозы (см. 2.16 Для

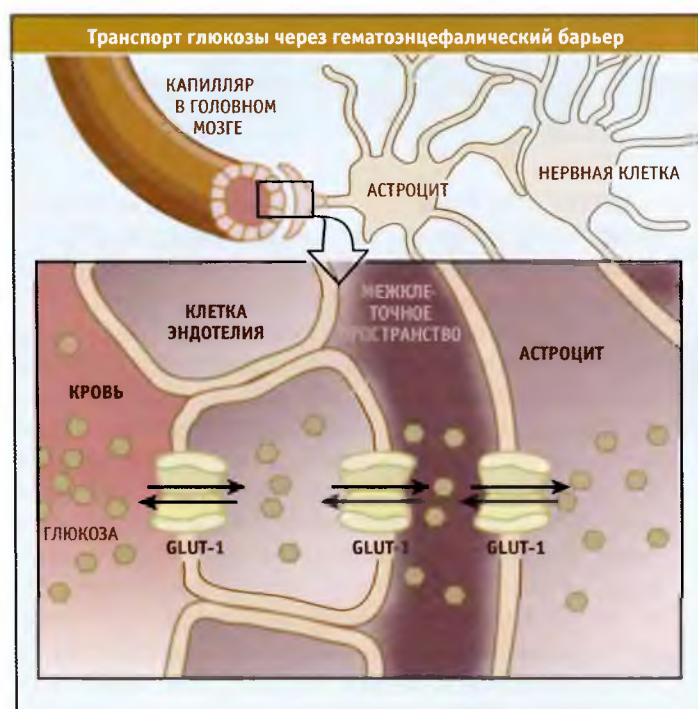
функционированию многих переносчиков необходим трансмембранный градиент Na^+). В настоящем разделе мы рассмотрим GLUT-белки.

Семейство GLUT-белков является частью более обширного суперсемейства белков, облегчающих основные транспортные процессы (MFS) и широко представленных в клетках всех организмов. GLUT-белки представляют собой интегральные белки мембран клеток эукариот. Изоформы переносчиков GLUT различаются по своим кинетическим характеристикам, специфичностью по отношению к переносимым сахарам, тканевой локализацией и механизмами регуляции. Некоторые GLUT-белки, наряду с глюкозой, транспортируют и другие метаболиты, например галактозу, воду и анальгетики из группы гликопептидов. GLUT-белки осуществляют унипорт, при котором вещества проходят через мембрану в направлении градиента концентрации (см. рис. 2.4). Таким образом, в зависимости от концентрации, GLUT-белки переносят метаболиты в клетку или в противоположном направлении. Поступление в клетку глюкозы, происходящее при участии GLUT-белков, часто определяет жизнеспособность клеток, которые характеризуются высоким уровнем потребления энергии.

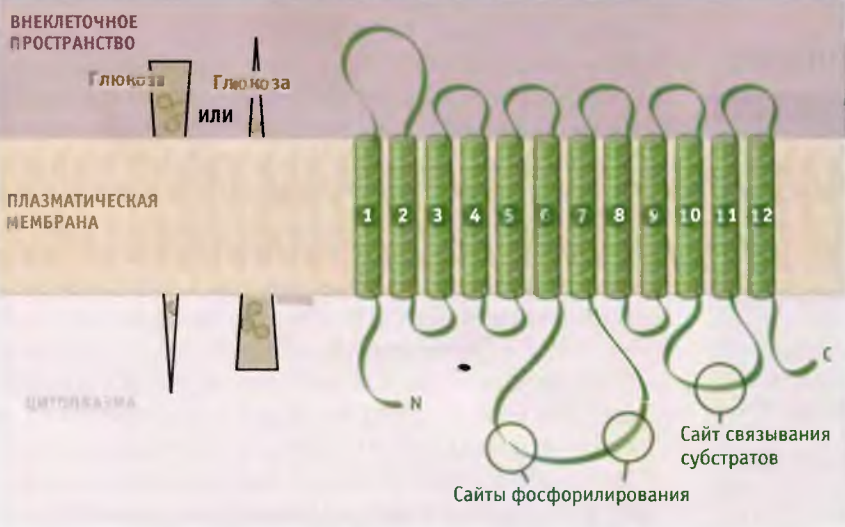
Питательные метаболиты, такие как сахара, через кровеносные сосуды транспортируются в органы. Эндотелиальные клетки, выстилающие стенки небольших сосудов, контролируют процессы обмена питательных веществ. В этих эндотелиальных клетках, особенно расположенных в области гематоэнцефалического барьера, содержится много GLUT-белков. Надлежащее функционирование головного мозга сильно зависит от глюкозы, и его клетки особенно чувствительны к снижению ее содержания. Транспорт глюкозы в нервные клетки происходит через капилляры мозга в несколько этапов и с участием изо-

формы GLUT-1 (). Эта изоформа экспрессируется в мембране клеток эндотелия, находящихся на границе между кровью и межклеточным пространством, а также в плазматической мембране астроцитов, функция которых важна в гематоэнцефалическом барьере. Расположенные в этих местах белки GLUT-1 транспортируют глюкозу из крови в эндотелиальные клетки, и оттуда в астроциты. В них глюкоза превращается в другие источники энергии, которые транспортируются в нейроны.

В различных тканях содержатся разные изоформы GLUT. Например, в клетках мышечной и жировой ткани транспорт глюкозы осуществляется с участием GLUT-4. В процессе приема пищи или после еды в клетки этих тканей под действием инсулина увеличивается поступление глюкозы. При этом происходит регулируемый транспорт изоформы GLUT-4 к клеточной поверхности. Эта изоформа также называется инсулин-зависимый переносчик. Белок GLUT-4 локализован во внутриклеточных везикулах, которые сливаются с плазматической мембраной. Этим обеспечивается доставка переносчика GLUT-4 к плазматической мембране и увеличивается емкость транспортного процесса. Связывание инсулина со своим поверхностным рецептором запускает каскад внутриклеточных процессов, приводящих к быстрому слиянию этих везикул с мембраной. Это, в свою очередь, приводит к быстрому увеличению транспорта глюкозы в клетку с участием GLUT-4. При диабете типа II не происходит транспорт глюкозы из крови в мышцы и жировую ткань, очевидно, из-за нарушения позиционирования GLUT-4 на плазматической мембране. (Подробнее о регулируемой секреции белков см. 4.19 Некоторые клетки запасают белки для последующей секреции.) Более того, GLUT-2 способен экспортировать глюкозу из клеток тех органов, в которых она образуется, например из клеток печени.



Глюкоза селективно транспортируется через гематоэнцефалический барьер посредством изоформы 1 (GLUT-1) белка-переносчика. Перенос глюкозы из крови в головной мозг и в другие отделы ЦНС представляет собой многоступенчатый процесс, в котором участвуют различные типы клеток

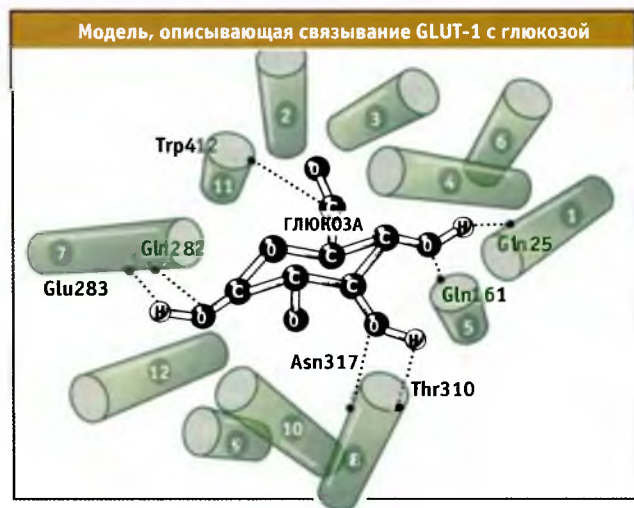


Предполагаемое строение GLUT-переносчика, состоящего из 12 трансмембранных сегментов с внутриклеточными С- и N-концевыми участками. Внутриклеточные петли содержат сайты фосфорилирования и связывания субстратов. Показано, что градиент глюкозы по обеим сторонам мембраны может возникать в любом направлении, в зависимости от типа клеток и их метаболизма. Градиент определяет направление транспорта

По строению переносчик GLUT напоминает другие члены суперсемейства MFS (). Предполагается, что он состоит из 12 трансмембранных α -спиралей, имеющих внутриклеточные N- и C-концевые участки и петли. Последние содержат сайт связывания субстрата и сайты фосфорилирования.

Модель структуры GLUT-1 предложена на основании результатов по сайт-направленному мутагенезу и по измерению транспорта глюкозы мутантным белком. Для построения модели также использовались данные по кристаллической структуре бактериальной лактопермеазы, относящейся к подсемейству переносчиков олигосахаридов/ H^+ , входящих в MFS (см. 2.15 *Сопряженный транспорт осуществляется за счет процессов симпорта и антипорта*). Согласно этой модели, при соответствующей ориентации трансмембранных спиралей создается полость поры, через которую транспортируется глюкоза, а также обеспечивается образование водородных связей между GLUT-белком и глюкозой (). Результаты кинетического анализа транспорта глюкозы в эритроцитах позволяют предполагать существование специального механизма, который обеспечивает белку GLUT возможность принимать одну из двух основных конформаций. Этот механизм аналогичен постулируемому для бактериальной лактопермеазы (см. рис. 2.39). Когда белок находится в одной конформации, сайт связывания глюкозы обращен в сторону внеклеточного пространства. В другой конформации он обращен в сторону цитозоля. При связывании глюкозы с любой стороны происходят конформационные изменения, которые приводят к реориентации сайтов связывания глюкозы к противоположной стороне мембраны и к ее высвобождению. Таким образом, хотя переносчики GLUT являются унипортерами, а бактериальная лактопермеаза представляет собой симпортер, предполагается, что они функционируют по одному механизму.

Мутации в гене GLUT-1 вызывают значительные дефекты развития. У детей потребность головного моз-



Предполагаемая ориентация трансмембранных α -спиралей переносчика глюкозы GLUT-1. Показаны остатки, участвующие в связывании глюкозы (размер молекулы глюкозы представлен без учета масштаба). Вид на спирали со стороны внутренней части плазматической мембраны. Эта модель построена с использованием гомологичной структуры лактопермеазы *E.coli* в качестве матрицы

га в глюкозе в 3–4 раза выше, чем у взрослых, и в мозг поступает до 80% всей глюкозы. Мутации в гене GLUT-1 человека служат причиной проявления редкого синдрома недостаточности GLUT-1, который характеризуется развитием припадков и замедлением развития. Считается, что это связано с нарушением транспорта глюкозы в головной мозг. Эмбрионы мышей, дефектных по гену GLUT-1, отстают в росте, и у них обнаруживаются различные пороки развития. Аналогичные дефекты возникают у мышиных эмбрионов, которые развиваются в организме диабетических самок. При этом избыток глюкозы в крови подавляет экспрессию GLUT-1 в органах эмбриона.

2.15 **Сопряженный транспорт**
осуществляется за счет
процессов симпорта и антипорта

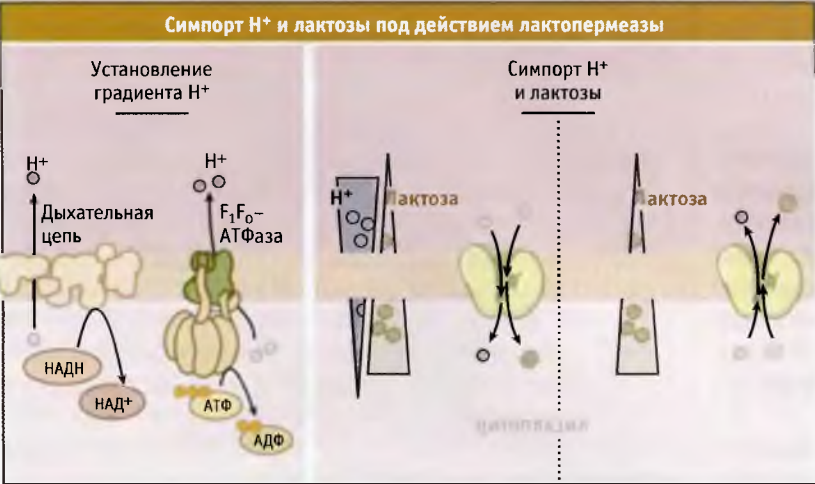
Основные положения

- Бактериальная лактопермеаза функционирует как симпортер, который осуществляет сопряжение транспорта лактозы и протонов через цитоплазматическую мембрану
- Для поступления в клетку лактозы с участием лактопермеазы используется электрохимический H^+ -градиент
- Для создания градиента протонов по обе стороны цитоплазматической мембраны лактопермеаза может также использовать градиент лактозы
- В процессе транспорта лактопермеаза, вероятно, меняет свою конформацию. При этом субстрат связывается с одной стороны мембраны и высвобождается с другой ее стороны
- Бактериальный переносчик глицерин-3-фосфата представляет собой антипорт, по строению напоминающий лактопермеазу

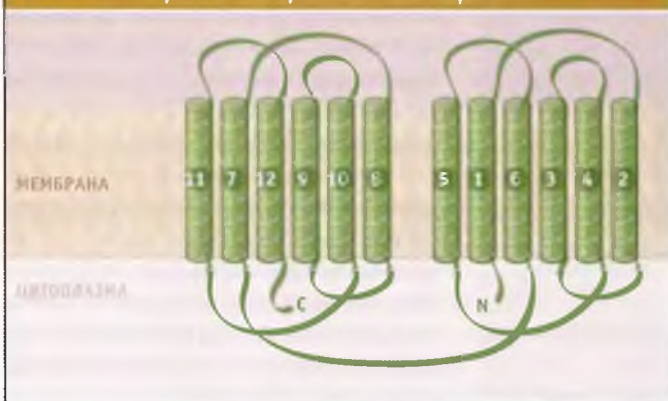
Транспортные белки представляют собой интегральные белковые компоненты мембран, обеспечивающие прохождение молекул через мембранный барьер (см. рис. 2.4). Унипортеры транспортируют метаболиты в направлении их концентрационного градиента (см. 2.14 *Некоторые белки осуществляют перенос глюкозы за счет унипортного транспорта*). Симпортеры и антипортеры осуществляют транспорт одного метаболита против его концентрационного градиента. Этот транспорт осуществляется за счет сопряжения с движением второго метаболита в направлении градиента. Многие переносчики относятся к суперсемейству белков, облегчающих основные транспортные процессы (MFS) и переносящих сахара, их фосфаты, лекарства, нейромедиаторы, нуклеозиды, аминокислоты, пептиды и другие метаболиты через клеточные мембраны. В данном разделе мы рассмотрим два MFS транспортера: бактериальную лактопермеазу, LacY, которая функционирует как мономерный олигосахарид/ H^+ -симпортер, и бактериальный переносчик глицерин-3-фосфата, GlpT, являющийся антипортером.

LacY был первым из выделенных генов, кодирующих мембранный транспортный белок (подробнее о регуляции усвоения лактозы см. MBIO:2-0001). Этот симпортер использует свободную энергию, высвобождающуюся при транспорте H^+ в направлении электрохимического градиента (обычно при этом происходит защелачивание цитозоля), для транспорта питательных метаболитов, таких как лактоза, против градиента концентрации (рис. 2.15). Протонный градиент по сторонам цитоплазматической мембраны устанавливается за счет дыхательной цепи и F_1F_0 -АТФазы, которая осуществляет сопряженный гидролиз АТФ и экспорт протонов из клетки (см. 2.20 *F_1F_0 -АТФ-синтаза вызывает сопряжение движения H^+ синтезом или гидролизом АТФ*). Стехиометрия транслокации лактозы и H^+ для LacY равняется 1:1, и оба субстрата транспортируются в одном направлении. Однако совместный транспорт лактозы и протонов может происходить в любом направлении, в зависимости от трансмембранного градиента. Так, за счет градиента лактозы, протоны могут транспортироваться против своего градиента и создавать градиент H^+ , направленный в клетку или из клетки, в зависимости от направления градиента концентрации лактозы. В отсутствие значительного электрохимического градиента H^+ совместный транспорт лактозы и протонов может происходить в любом направлении и зависит от направления трансмембранного градиента лактозы.

В состав LacY входят 12 трансмембранных спиралей, соединенных гидрофильными петлями, и цитоплазматические N- и C-терминальные участки (рис. 2.15). Он содержит два домена, каждый из которых состоит из шести трансмембранных сегментов, образующих симметричную структуру, по форме напоминающую сердце (рис. 2.15). Эта модель разработана на основании данных рентгеноструктурного анализа. Сайт связывания субстрата представляет собой гидрофильную полость, которая находится приблизительно в центре липидного бислоя. Кристаллическая структура LacY представлена во внутренней конфигурации, с полостью, открытой в сторону цитоплазмы.



Лактопермеаза бактерий, LacY, катализирует захват лактозы за счет энергии градиента H^+ , направленного в клетку. Градиент устанавливается при дыхании бактерий или гидролизе АТФ, при котором из клетки выходят протоны. LacY также может использовать энергию градиента лактозы для транспорта протонов из клетки против градиента концентрации



Ранее была предложена аллостерическая модель транспорта лактозы/протонов с участием LacY, которая согласуется с кристаллической структурой белка. В модели, представленной на рис. 2.39, сайт связывания субстрата на LacY оказывается доступным или изнутри клетки, или с внешней стороны мембраны, но недоступен с двух сторон одновременно. Протонирование и связывание лактозы белком, находящимся в наружной конформации, изменяет его конформацию на внутреннюю. Такая организация структуры, при которой оба субстрата связываются с белком до наступления конформационных изменений, обеспечивает процессы сопряженного и одновременного транспорта. Вход в клетку лактозы и протонов снова приводит к наружной конформации белка. Таким образом, связывание субстрата и его высвобождение снижают энергетический барьер между внутренней и наружной конформацией и облегчают их взаимные переходы в белке.

Бактериальный переносчик глицерин-3-фосфата, GlpT, является антипортером, близким к LacY. Он

транспортирует в клетку глицерин-3-фосфат, который необходим для выработки энергии и синтеза фосфолипидов. GlpT функционирует как обменник между органическим и неорганическим фосфатом за счет энергии градиента P_i (рис. 2.40). Подобно LacY, он обладает симметричными терминальными N- и C-доменами, каждый из которых состоит из шести трансмембранных сегментов, окружающих транспортный путь. Хотя LacY действует как симпортер, а GlpT как антипортер, оба переносчика, по-видимому, используют один и тот же механизм транспорта с попеременным доступом. Однако связывание глицерин-3-фосфата с GlpT и высвобождение фосфата происходит, когда белок находится в наружной конформации, а для внутренней конформации характерны противоположно направленные процессы. Для унипортеров глюкозы также предполагается механизм попеременного доступа (см. 2.14 *Некоторые белки осуществляют перенос глюкозы за счет унипортного транспорта*).

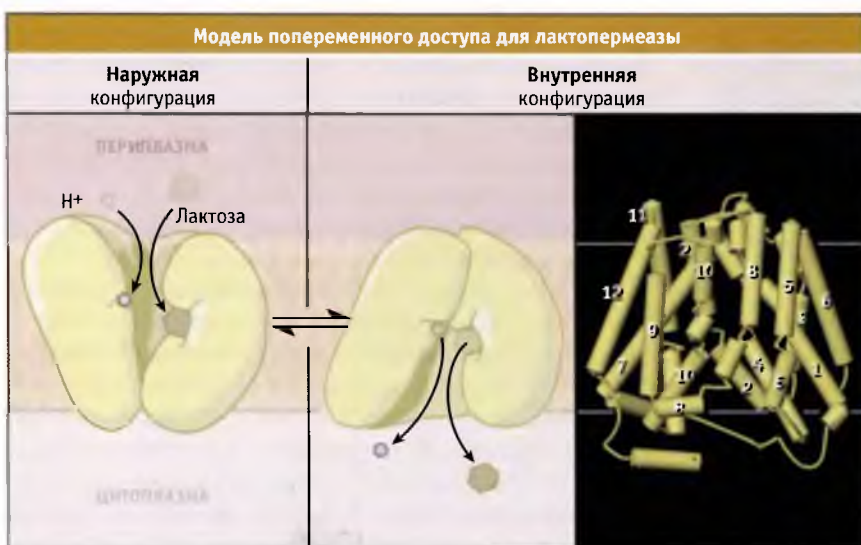
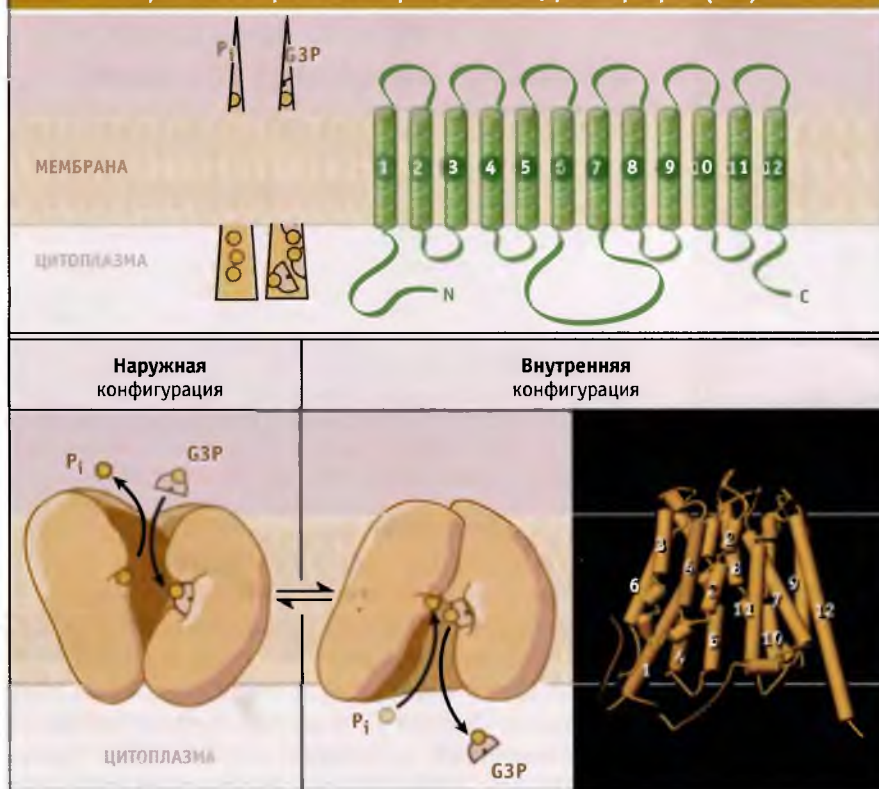


РИС. 2.39 Модель, описывающая конформационные изменения между внутренней и наружной конфигурациями лактопермеазы LacY. Кристаллическая структура представлена для внутренней конформации переносчика, и связывающая субстрат полость открыта в цитоплазму. Модель построена на основании данных Protein Data Bank file 1PV6. Указано предполагаемое положение мембраны

Строение бактериального переносчика глицерин-3-фосфата (G3P)



Схематическое изображение и рентгеноструктурное строение бактериального переносчика глицерин-3-фосфата, а также модель попеременного доступа для транспортного процесса. Этот переносчик напоминает лактопермеазу LacY. Вверху слева показаны градиенты фосфата и глицерин-3-фосфата по сторонам клеточной мембраны бактерии. Кристаллическая структура представлена для внутренней конформации переносчика. Модель построена на основании данных Protein Data Bank file 1PW4. Указано предполагаемое положение мембраны

2.16 Для функционирования многих переносчиков необходимо существование трансмембранного градиента ионов Na^+

Основные положения

- Градиент ионов Na^+ через плазматическую мембрану поддерживается за счет Na^+/K^+ -АТФазы
- Энергия, которая высвобождается при транспорте Na^+ в направлении градиента, расходуется на транспорт различных субстратов
- В желудочно-кишечном тракте усвоение сахара происходит за счет переносчика $\text{Na}^+/\text{глюкозы}$
- Удаление ионов Ca^{2+} из цитозоля возбудимых клеток осуществляется в основном посредством транспортного механизма с участием $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника
- Внутриклеточная концентрация Cl^- регулируется с помощью $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -котранспортеров
- Ионы магния транспортируются из клетки с помощью $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ -обменников

Клетки поддерживают трансмембранный градиент ионов Na^+ , направленный со стороны внеклеточного пространства (см. рис. 2.2). Существование такого градиента необходимо для протекания многих процессов мембранного транспорта, зависящих от Na^+ . Электрохимический градиент Na^+ на плазматической мембране поддерживается Na^+/K^+ -АТФазой, которая представляет собой наиболее активный транспортный

белок. Этот белок расходует энергию гидролиза АТФ на транспорт трех ионов Na^+ из клетки в обмен на поступление туда двух ионов K^+ . Оба иона перемещаются против своих градиентов концентрации. Поскольку при этом суммарный положительный заряд клетки снижается, Na^+ насос рассматривается как генератор энергии. Благодаря Na^+/K^+ -АТФазе по обеим сторонам мембраны возникает разность потенциалов, причем внутренняя среда клетки, по сравнению с внешней, заряжена более отрицательно. Разница в зарядах составляет отрицательный мембранный потенциал покоя. Иными словами, энергия, необходимая для поддержания электрохимического градиента Na^+ , запасается на плазматической мембране. (Подробнее о мембранном потенциале см. 2.4 Электрохимический градиент по обеим сторонам мембраны создает мембранный потенциал; подробнее о Na^+/K^+ -АТФазе см. 2.19 Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану.)

Существование электрохимического градиента ионов Na^+ важно для поддержания физиологических функций клеток многих тканей. Некоторые из Na^+ или потенциал-зависимых каналов и вторичных транспортных белков представлены на рис. 2.15. Для транспорта веществ против концентрационного градиента или для генерации электрических сигналов в форме потенциала действия они используют энергию, которая запасена в виде электрохимического градиента Na^+ , направленного

ного внутри клетки. Две основные группы Na^+ -зависимых мембранных белков включают потенциал-зависимые Na^+ -каналы и эпителиальные Na^+ -каналы (см. 2.7 Потенциал-зависимые Na^+ -каналы активируются при деполяризации мембраны и транслируют электрические сигналы и 2.8 Эпителиальные Na^+ -каналы регулируют гомеостаз Na^+). К третьей группе относятся Na^+ /субстратные переносчики, которые в зависимости от степени сходства первичной структуры подразделяются на несколько семейств. В данном разделе мы рассмотрим некоторые из этих переносчиков. Na^+ -зависимые переносчики, участвующие в регуляции pH, рассматриваются в следующем разделе (см. 2.17 Некоторые переносчики Na^+ регулируют pH в цитозоле или во внеклеточной среде).

На представлены некоторые Na^+ -зависимые переносчики субстратов. С эволюционной точки зрения большинство этих переносчиков не связаны между собой и поэтому различаются по природе переносимого субстрата или по механизму транспортного процесса. Na^+ /субстратные переносчики могут функционировать в процессах катаболизма, обеспечивая субстратами метаболические процессы в клетке. Они используют Na^+ -градиент для транспорта в клетку или из нее таких субстратов, как ионы, сахара, аминокислоты, витамины и мочевины. К таким переносчикам относятся котранспортеры Na^+ /глюкоза и Na^+ /иодид. У некоторых бактерий в осмотической регуляции участвует котранспортер Na^+ /пролин. У других выживаемость

при инфекции обеспечивается функционированием Na^+ /субстрат симпортеров.

Некоторые клетки, например клетки ворсинок кишечника, при всасывании используют трансмембранный градиент Na^+ для транспорта сахаров против градиента концентрации. Котранспортер Na^+ /глюкоза (см. рис. 2.41) обеспечивает усвоение из кишечника двух сахаров, D-глюкозы и D-галактозы. Этот котранспортер кодируется геном, относящимся к семейству SGLT1. Белки этого семейства имеют общую коровую структуру, состоящую из 13 трансмембранных спиралей. Сайт связывания сахара и транспортный путь котранспортера Na^+ /глюкоза образованы четырьмя трансмембранными спиральями, поблизости от С-терминального участка. Предполагается, что связывание Na^+ обеспечивается N-терминальным участком котранспортера Na^+ /глюкоза и что совместный транспорт Na^+ и глюкозы происходит при взаимодействии N- и С-терминальных доменов белка. Основной вопрос заключается в том, каким образом перенос сахара сопряжен с электрохимическим градиентом Na^+ . Современная модель предполагает, что внеклеточный ион Na^+ связывается с незанятым сайтом на транспортере и вызывает изменения конформации, в результате которых происходит связывание сахара. При связывании сахара конформация изменяется еще раз, в результате чего Na^+ и сахар оказываются на внутриклеточной стороне мембраны. После высвобождения Na^+ и сахара в клетку пустой контранспортер Na^+ /глюкоза

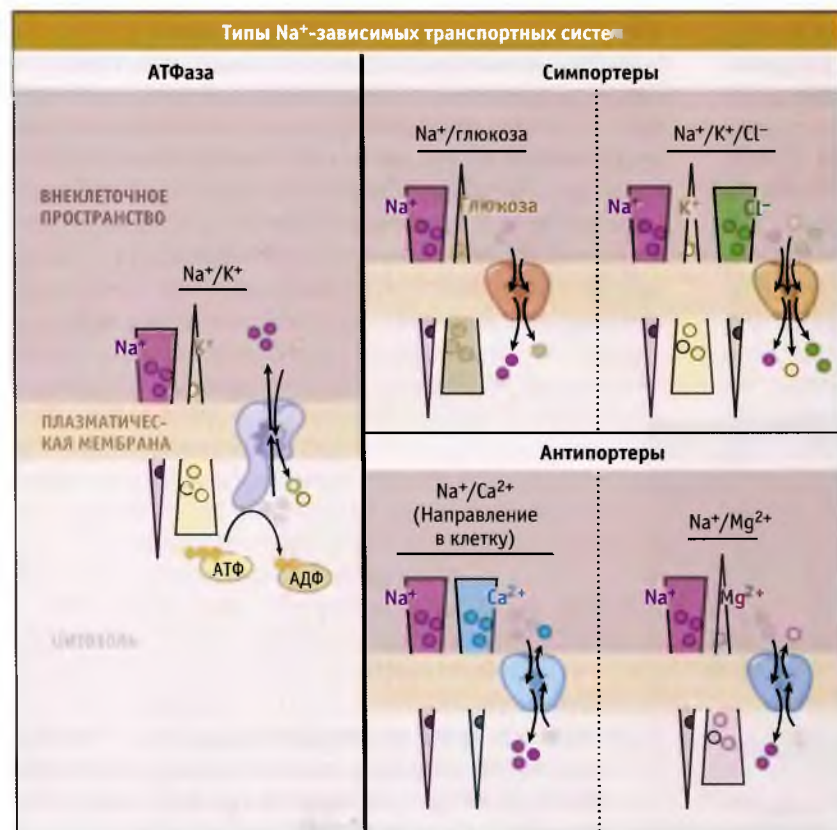


РИС. 2.41 Примеры Na^+ -зависимых переносчиков. В этих и во многих других транспортных системах используется энергия градиента Na^+ по сторонам плазматической мембраны, который поддерживается Na^+/K^+ -АТФазой. Показано направление ионного градиента в типичной животной клетке

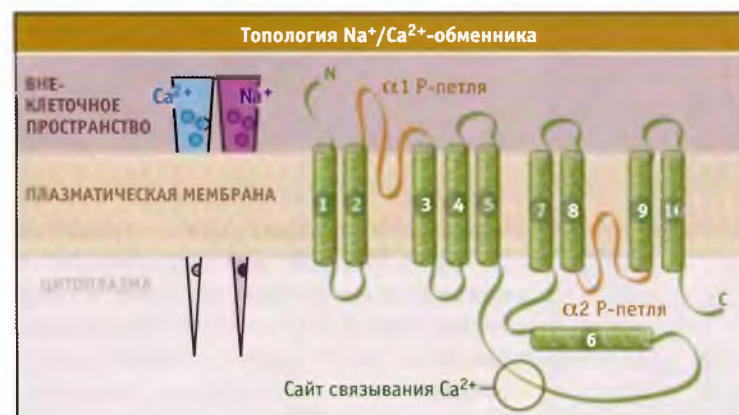
меняет свою конформацию, возвращаясь к исходной. В общем, конформационные изменения, постулируемые в этой модели, напоминают изменения в унипортере GLUT-1, который функционирует как переносчик глюкозы (см. 2.14 *Некоторые белки осуществляют перенос глюкозы за счет унипортного транспорта*).

Многие внеклеточные сигналы индуцируют высвобождение внутриклеточного Ca^{2+} (см. 14 *Функционирование внутриклеточных систем передачи сигнала*). В цитозоле покоящейся клетки поддерживается низкая концентрация ионов Ca^{2+} , порядка 10^{-7} М. При Ca^{2+} -зависимой передаче сигнала происходит активация, при которой концентрация этого катиона в цитозоле увеличивается за счет поступления извне и высвобождения из депо саркоплазматического ретикулума. Когда сигнал проходит, то Ca^{2+} транспортируется из цитозоля через плазматическую мембрану и в саркоплазматический ретикулум. К числу двух главнейших белков плазматической мембраны, удаляющих Ca^{2+} в большинстве клеток животных, относится $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник (NCX) (см. рис. 2.41) и АТФ-зависимый Ca^{2+} -насос. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник обладает примерно в 10 раз более низким сродством к ионам Ca^{2+} , но характеризуется в 10–50 раз более высоким числом оборотов, чем Ca^{2+} АТФаза плазматической мембраны. Поэтому в возбудимых клетках $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник представляет собой основную систему выведения Ca^{2+} на внешнюю сторону плазматической мембраны (подробнее о Ca^{2+} -зависимой сигнальной системе в возбудимых клетках см. 2.13 *Сердечная и скелетные мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения*).

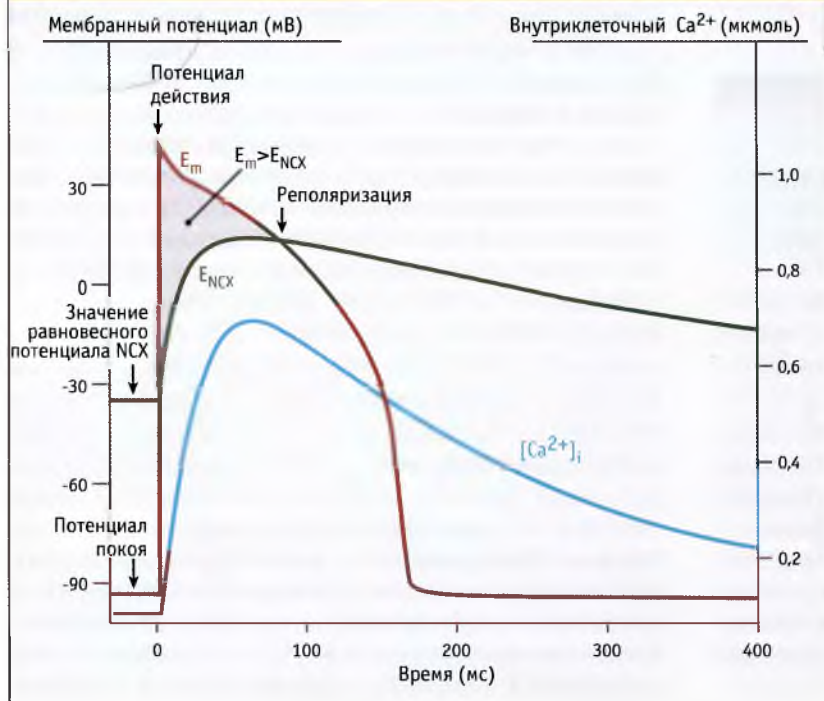
$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменники образуют семейство белков. Предполагается, что в клетках миокарда они состоят из девяти трансмембранных сегментов, большой внутриклеточной петли, принимающей участие в регуляции обмена, и антипараллельных доменов, содержащих α -повторы, которые необходимы для транслокации ионов (рис. 2.42). Две области α -повторов содержат участки трансмембранных сегментов 2, 3, 8 и 9 и, подобно аквапориновым водным каналам, имеют противоположную ориентацию. Также обменник обладает двумя Р-петлями, содержащими Gly-Ile-Gly

последовательности, напоминающие Gly-Tyr-Gly последовательности селективного фильтра K^+ -канала. (Подробнее об аквапоринах см. 2.11 *Селективный транспорт воды происходит через аквапориновые каналы*. Подробнее о селективном фильтре K^+ -канала см. 2.5 *K^+ -каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов*.) Такая топологическая модель $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника была предложена с учетом данных секвенирования, мутагенеза и опытов по функциональной активности. Таким образом, в отличие от переносчика глюкозы GLUT-1 и котранспортера $\text{Na}^+/\text{глюкоза}$, предполагают, что $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник имеет общие черты строения с канальными белками.

Считается, что $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник транспортирует три иона Na^+ в обмен на один ион Ca^{2+} , в результате чего на транспортный цикл возникает один положительный электрический заряд. Обменник может транспортировать ионы Ca^{2+} или в клетку, или из нее, в зависимости от электрохимической движущей силы. Например, в клетках миокарда, находящихся в состоянии покоя, значение мембранного потенциала E_m меньше, чем значение равновесного потенциала для E_{NCX} , и ионы Ca^{2+} вытесняются из клетки. Однако при генерации потенциала действия в фазе 0 и 1, E_m превышает E_{NCX} , что вызывает кратковременный вход в клетку Ca^{2+} через обменник. По мере реполяризации мембраны, мембранный потенциал опять принимает более отрицательное значение. ($E_m < E_{\text{NCX}}$), и ионы Ca^{2+} снова выходят из клетки. Таким образом, ионы Ca^{2+} на короткое время, перемещаемые обменником, меняют направление движения. Это происходит, когда мембранный потенциал принимает более положительное значение по отношению к обратному потенциалу $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (рис. 2.43). Через несколько миллисекунд, в начале развития относительно длительного потенциала действия миокарда, при изменении трансмембранного Na^+ - или Ca^{2+} -градиента в клетки входят ионы Ca^{2+} . При физиологических условиях обменник в основном выполняет функцию вытеснения Ca^{2+} из клетки за счет Na^+ -градиента. Однако положительные значения мембранных потенциалов при выходе на плато потенциала действия могут ограничивать выход Ca^{2+} (подробнее о потенциале действия



3.4.2. Предположительное строение $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника клетки сердечной мышцы. Показано направление градиентов $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ в покоящейся животной клетке млекопитающих



миокарда см. 2.12 Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов и 2.13 Сердечная и скелетные мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения).

Еще одним переносчиком, использующим энергию Na⁺-градиента для переноса ионов через плазматическую мембрану, является котранспортер Na⁺/K⁺/Cl⁻. Он осуществляет электронейтральный перенос ионов в стехиометрическом отношении 1Na⁺:1K⁺:2Cl⁻ (см. рис. 2.41). Этот котранспортер катализирует поступление ионов в клетку в физиологических условиях. Он также поддерживает необходимую внутриклеточную концентрацию ионов Cl⁻, а в специализированных эпителиальных клетках обеспечивает их накопление до уровня, превышающего состояние электрохимического равновесия. Например, в почке котранспортер Na⁺/K⁺/Cl⁻ находится на апикальной мембране специализированных эпителиальных клеток, выстилающих просвет канальца толстой восходящей части петли Генле. Как иллюстрирует рис. 2.26, котранспортер играет критическую роль в реабсорбции NaCl из почечного фильтрата.

Мутации в гене, кодирующем изоформу котранспортера Na⁺/K⁺/Cl⁻, приводят к развитию аутосомного рецессивного заболевания, которое называется синдром Бартера. У больных наблюдается увеличение потерь воды и солей с мочой, снижение концентрационной функции почек и усиленное выведение из организма ионов Ca²⁺. Такой эффект мутации в одной изоформе транспортера свидетельствует о том, что транспорт ионов че-

рез клетки осуществляется с одновременным участием многих типов транспортных белков и что нарушение функционирования одного из них отражается на функционировании остальных. Действительно, мутации в других транспортных белках, которые функционируют совместно с котранспортером Na⁺/K⁺/Cl⁻ и регулируют поглощение солей в почках, также приводят к развитию синдрома Бартера. К числу таких мутаций относятся мутации в K⁺- и в Cl⁻-канале (CLC-K). Последний представляет собой часть базолатеральной системы проводимости Cl⁻-ионов (рис. 2.26).

Еще одним примером Na⁺ зависимого вторичного транспортного белка является Na⁺/Mg²⁺-обменник (см. рис. 2.41). Поскольку ионы Mg²⁺ в больших концентрациях влияют на многие клеточные функции, внутриклеточная концентрация этого катиона тщательно контролируется буферным механизмом. Например, ионы Mg²⁺ конкурируют с ионами Ca²⁺ за общие Ca²⁺/Mg²⁺-сайты активации/инактивации, расположенные на различных белках. Поскольку Mg²⁺ с небольшой скоростью проникает через плазматическую мембрану, он должен постоянно выводиться из цитоплазмы с тем, чтобы его концентрация поддерживалась в физиологических пределах. Выход Mg²⁺ из клетки происходит, главным образом, с участием Na⁺/Mg²⁺-обменника. Предполагается, что этот обменник в физиологических условиях электронейтрален, и на каждый ион Mg²⁺, удаляемый из клетки, в нее закачиваются два иона Na⁺. Na⁺/Mg²⁺-обменник также является главной мишенью действия широко используемых антидепрессантов.

2.17 Некоторые переносчики Na^+ регулируют pH в цитозоле и во внеклеточной среде

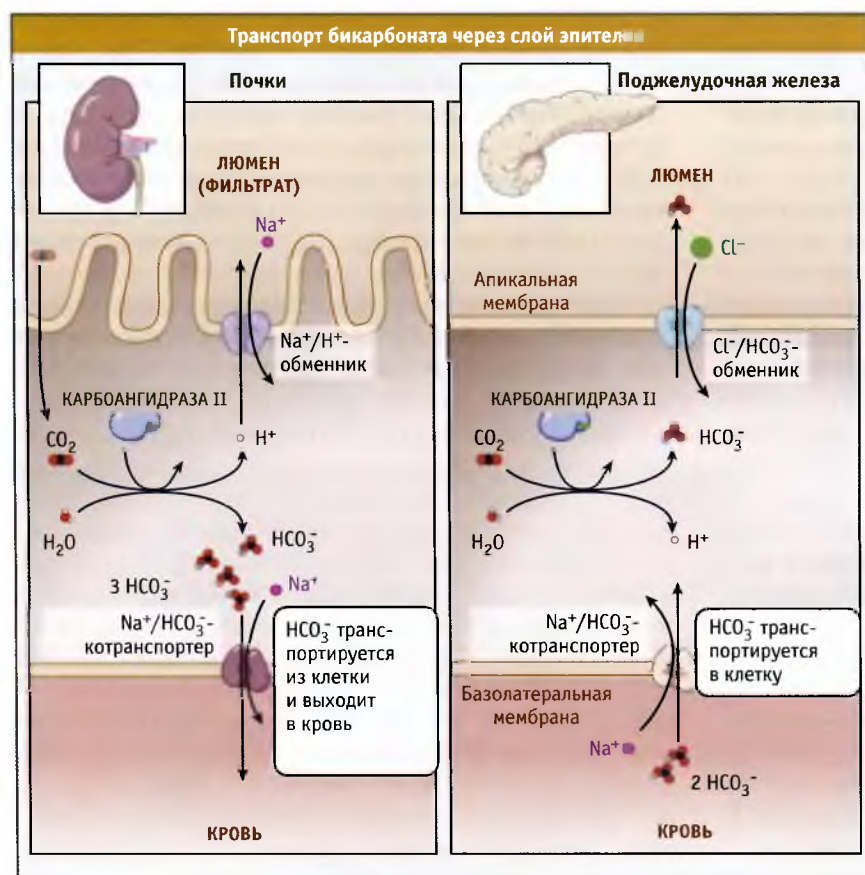
Основные положения

- pH внутриклеточной среды и объем клетки поддерживаются за счет процессов Na^+/H^+ -обмена
- В результате действия переносчика $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ снижается закисление среды за счет прямого транспорта в клетку ионов HCO_3^-

Как отмечалось в предыдущем разделе, многие транспортные белки используют энергию трансмембранного градиента Na^+ для перемещения ионов и других метаболитов через плазматическую мембрану (см. 2.16 Для функционирования многих переносчиков необходимо существование трансмембранного градиента ионов Na^+). В данном разделе мы рассмотрим два других переносчика, Na^+/H^+ -обменник и $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -котранспортер, которые используют энергию трансмембранного градиента Na^+ . Эти транспортеры принимают участие в регуляции pH, важного фактора, определяющего функциональную активность белков, поскольку свойства многих из них зависят от величины pH.

Na^+/H^+ -обменники и $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -котранспортеры помогают поддерживать необходимый кислотно-щелочной баланс внутри и вне клетки. Наиболее важной буферной системой во внеклеточной среде, например в плазме, явля-

ется обменная система бикарбонат/двуокись углерода, которая функционирует при участии фермента карбоангидразы. Обычно кровь обладает слабощелочным значением pH (7,4), которое находится под эффективным контролем, поскольку функциональная активность многих клеток и белков существенным образом зависит от величины pH. Легкие и почки относятся к органам, принимающим участие в поддержании кислотно-щелочного равновесия плазмы за счет процессов экскреции летучих (CO_2) и нелетучих кислот. Почки контролируют pH крови за счет регуляции транспорта HCO_3^- через эпителиальные клетки, выстилающие начало проксимального канальца (). В этих клетках существуют два источника CO_2 : диффузия через мембрану и синтез с участием специфических ферментов. В проксимальных канальцах карбоангидраза катализирует образование H_2O и CO_2 из HCO_3^- и H^+ . Двуокись углерода свободно диффундирует в эпителиальные клетки проксимальных канальцев, где происходит синтез HCO_3^- и H^+ из H_2O и CO_2 с участием карбоангидразы. Таким образом, секреция протонов (кислоты) в почечный фильтрат (мочу) за счет Na^+/H^+ -обменника апикальной мембраны (NHE) сочетается с транспортом в кровь равного количества эквивалентов бикарбоната через $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -котранспортер, находящийся в базолатеральной мембране проксимального канальца. Такой сопряженный выход из клетки ионов H^+ и HCO_3^- не сопровождается изменениями электрического заряда и представляет собой важный механизм выделения в мочу нелетучих кислых эквивалентов; он служит важным



Модели, описывающие транспорт бикарбоната через эпителиальные клетки в почках и поджелудочной железе

звенном гомеостаза. Суммарный эффект заключается в *реабсорбции* бикарбоната из фильтрата плазмы в виде CO_2 , который затем, как HCO_3^- , транспортируется в плазму через апикальную мембрану. В то же время NHE в проксимальном канальце способствует реабсорбции ионов Na^+ из плазматического фильтрата, после чего они транспортируются назад, в плазму. Ключевым элементом, регулирующим кислотность и реабсорбцию в проксимальном канальце, является Na^+/K^+ -АТФаза. Суммируя вышесказанное отметим, что экскреция H^+ и вход в клетку Na^+ через апикальную мембрану происходят с участием специфических симпортеров и антипортеров.

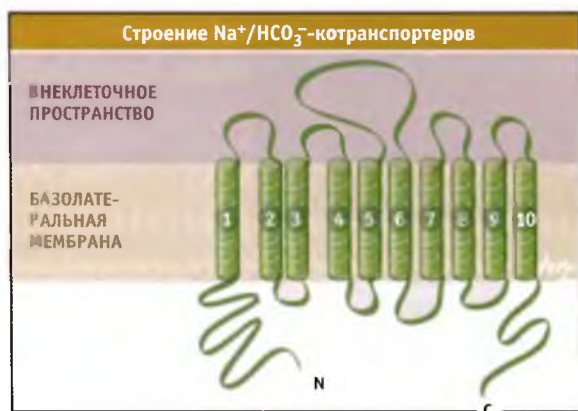
В отличие от почек эпителиальные клетки поджелудочной железы и других секреторных органов *секретируют* бикарбонат через апикальную мембрану. В клетках секреторных органов за счет градиента ионов Na^+ происходит котранспорт HCO_3^- в стехиометрическом отношении 1 Na^+ на 1 или более HCO_3^- (см. рис. 2.44). В базолатеральной мембране клеток поджелудочной железы котранспортер $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ обеспечивает захват бикарбоната из плазмы, HCO_3^- образуется под действием карбоангидразы, и он транспортируется в желудочно-кишечный тракт посредством $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -обменника в апикальной мембране. Панкреато-дуоденальная секреция бикарбоната играет важную роль в буферизации кислой среды, создающейся за счет желудка, а также в активации важнейших пищеварительных ферментов. В почках и поджелудочной железе экспрессируются различные изоформы $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -котранспортеров. На рис. 2.45 представлена модель, описывающая их строение и предложенная на основании анализа первичной структуры белков.

Na^+/H^+ -обменник представляет собой интегральный мембранный белок плазматической мембраны и внутриклеточных органелл. Наряду с ролью, которую он играет в поддержании внутриклеточного pH, этот обменник участвует в регуляции объема клетки, осуществляет системный контроль за электролитами, метаболизмом кислот и гомеостазом жидкостей организма. Na^+/H^+ -обменник катализирует транспорт ионов Na^+ и H^+ в направлении их концентрационных градиентов. Он является вторичным актив-

ным переносчиком. Градиент ионов натрия, направленный в клетку и образованный за счет функционирования Na^+/K^+ -АТФазы плазматической мембраны, обеспечивает продвижение протонов в обратном направлении со стехиометрией 1 Na^+ на 1 H^+ . Поток ионов натрия через мембрану регулирует клеточный объем и поглощение солей и воды через эпителиальные клетки. Регуляция функционирования Na^+/H^+ -обменников осуществляется при изменении внутриклеточного pH и под действием различных внешних стимулов, например ростовых факторов, гормонов, а также механических стимулов, например осмотического стресса и распластывания клеток. В физиологических условиях в результате деятельности Na^+/H^+ -обменника плазматической мембраны удаляется избыток кислот, накопленный за счет метаболизма и за счет их поступления извне. Вместе с бикарбонат-транспортной системой Na^+/H^+ -обменники играют критическую роль в поддержании кислотно-щелочного равновесия в цитоплазме.

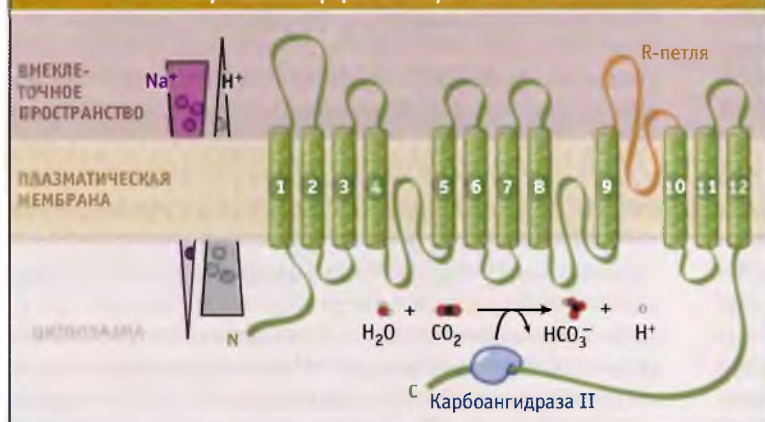
Изоформа 1 Na^+/H^+ -обменника (NHE1) рассматривается как прототип обменника плазматической мембраны клеток млекопитающих; другие изоформы отличаются уровнем тканевой экспрессии и характером локализации в мембране. Все изоформы Na^+/H^+ -обменника имеют общее строение. Компьютерное моделирование вторичной структуры позволило предположить, что изоформы состоят из 12 встроенных в мембрану и сходно расположенных N-концевых сегментов с консервативной структурой и из более переменных по структуре С-концевых областей, содержащих многочисленные сайты фосфорилирования и способных связывать регуляторные белки и медиаторы (рис. 2.45). Предполагается, что N-терминальный трансмембранный домен содержит каталитическую коровую структуру, принимающую участие в обмене Na^+/H^+ . Большая петля, частично расположенная в мембране, а частично вне клетки (R-петля), между трансмембранными сегментами 9 и 10, напоминает структуру поровой петли K^+ -каналов и, вероятно, является составным элементом транспортного пути ионов. Два Na^+/H^+ белковых обменника могут образовывать гомодимерную структуру.

Бактерии обладают Na^+/H^+ -белками-обменниками, которые для выведения Na^+ в обмен на поток H^+ в клетку используют энергию электрохимического градиента H^+ по сторонам мембраны. В клетках *Escherichia coli* основным Na^+/H^+ -обменником является NhaA, который регулирует содержание в клетке ионов Na^+ и значение pH и обеспечивает выживаемость бактерий в условиях засолёности или щелочности окружающей среды. NhaA существует в цитоплазматической мембране в виде димера, и каждый мономер состоит из 12 трансмембранных сегментов. На рис. 2.47 представлена кристаллическая структура мономера NhaA в неактивной конформации, которая характерна для кислых значений pH. По обеим сторонам мембраны белок имеет воронкообразные поверхности, которые выстилаются отрицательно заряженными остатками аминокислот, притягивающими катионы. В центре мембраны расположены аминокислоты Asp163 и Asp164, образующие сайт связывания Na^+ . При кислых значени-



Предполагаемое строение $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -котранспортеров

Строение изоформы 1 Na⁺/H⁺-обменника



Предполагаемое строение изоформы 1 Na⁺/H⁺-обменника (NHE1). Функция NHE1 регулируется несколькими путями. Показано связывание карбоангидразы II, которое приводит к стимуляции транспортной активности NHE1. Слева показано направление Na⁺- и H⁺-градиента по сторонам плазматической мембраны клеток животных

Строение Na⁺/H⁺-обменника

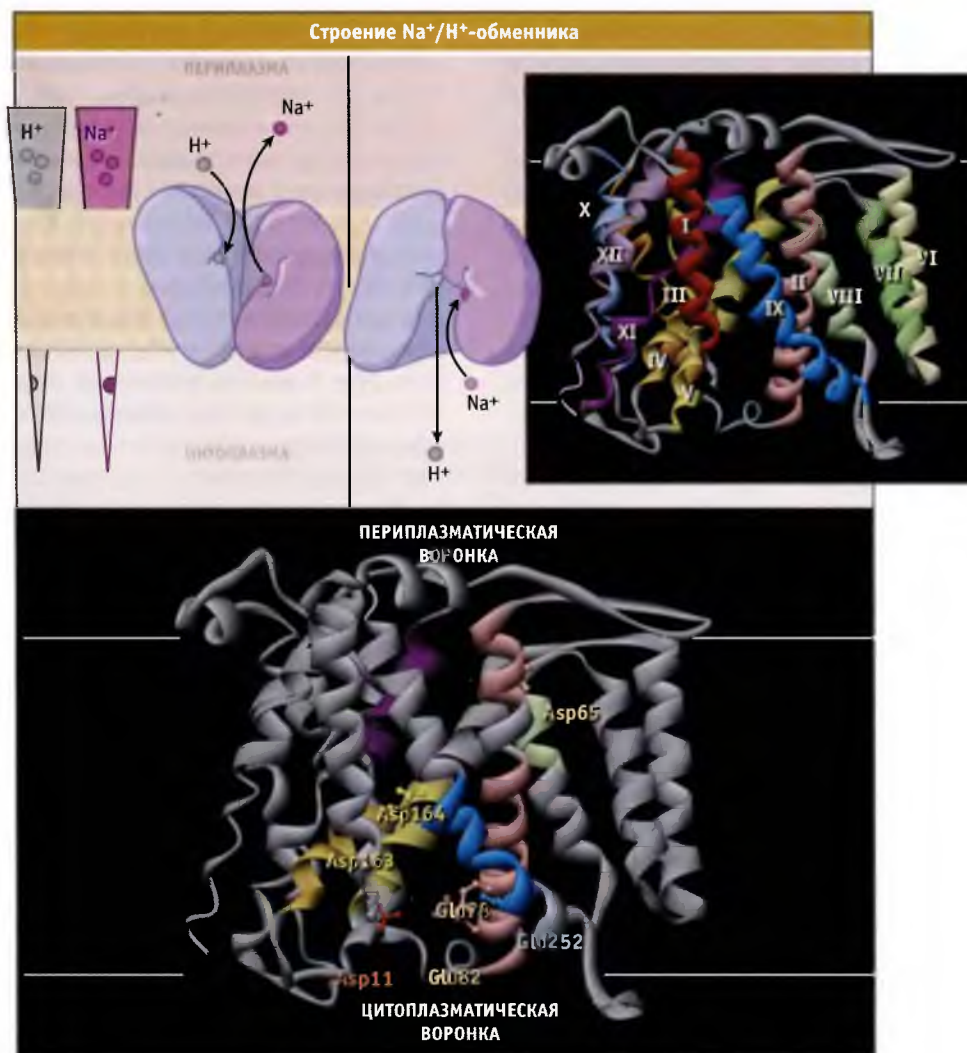


РИС. 2.47 Схематическое строение и модель рентген-анализа структуры бактериального Na⁺/H⁺-обменника, NhaA, объясняющие транслокацию Na⁺/H⁺ и механизм регуляции pH. Кристаллическая структура представлена белками. Остатки, изменения в которых влияют на регуляцию pH и транспорт катионов, показаны вместе с боковыми цепями. Схематическая модель транслокации, функционирующая по принципу попеременного доступа, построена на основании структурных данных. Показаны градиенты Na⁺ и H⁺ по сторонам мембраны. Модель построена на основании данных Protein Data Bank file 1ZCD

ях pH только Asp164 оказывается на пути потока ионов, и транспорт в цитоплазму блокируется спиралью XIp.

Вероятно, что транспорт Na^+ и H^+ с участием NhaA происходит по механизму попеременного доступа (см. 2.15 *Сопряженный транспорт осуществляется за счет процессов симпорта и антипорта*). Согласно предложенной модели, изменение pH цитоплазмы в щелочную сторону индуцирует изменения конформации спирали IX, что, в свою очередь, вызывает реориентацию спиралей XIp и IVc. При этом открываются сайты связывания Na^+ и снимается цитоплазматический барьер. Связывание Na^+ с цитоплазматической стороны приводит к небольшим дополнительным изменениям конформации спиралей XIp и IVc, закрытию обменника со стороны цитоплазмы, и к выходу Na^+ в периплазму. После высвобождения Na^+ с периплазматической (внеклеточной) стороны должно произойти протонирование Asp163 и Asp164, что приводит к конформационным изменениям, в результате которых сайт связывания Na^+ открывается со стороны цитоплазмы, где должно происходить депротонирование остатков аспартата.

Изменение активности Na^+/H^+ -обменника в клетках человека является причиной развития некоторых заболеваний, таких как гипертония, диарея, диабет, а также тканевых повреждений, вызванных ишемией (за счет прекращения или замедления кровотока). Развитие ишемии мозга или миокарда приводит к увеличению интенсивности Na^+/H^+ -обмена. Это вызывает повышение концентрации внутриклеточного Na^+ и вторичное увеличение содержания внутриклеточного Ca^{2+} , что обусловлено активацией $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника в обратном режиме (см. 2.16 *Для функционирования многих переносчиков необходимо существование трансмембранного градиента ионов Na^+*). Перегрузка клетки Ca^{2+} вызывает каскад процессов, которые приводят к сердечной аритмии, или к изменениям нервной ткани после инсульта. Ингибирование активности Na^+/H^+ -обменника препаратами может оказаться благоприятным при ишемии или после нее и широко исследуется в качестве подхода к лечению некоторых заболеваний.

2.18 Ca^{2+} -АТФаза закачивает Ca^{2+} во внутриклеточные депо

Основные положения

- Подобно Na^+/K^+ -АТФазам, реакционный цикл для Ca^{2+} -АТФазы включает две основные конформации
- Фосфорилирование субъединиц Ca^{2+} -АТФазы приводит к изменениям конформации и к транслокации ионов Ca^{2+} через мембрану

Стимуляция клеток, происходящая под действием гормонов или электрического импульса, приложенного к плазматической мембране, проявляется во временном увеличении концентрации в цитозоле ионов Ca^{2+} , которые регулируют множество внутриклеточных процессов. Под действием Ca^{2+} активируются многие клеточные

функции, от транскрипции генов и синтеза белка до регулируемой секреции гормонов, активации иммунного ответа, клеточной подвижности, возбуждения нейронов и сокращения клеток. Почти все клетки для быстрого увеличения концентрации в цитозоле ионов Ca^{2+} способны высвобождать их из внутриклеточных депо (см., например, 2.13 *Сердечная и скелетные мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения*). Увеличение содержания Ca^{2+} в цитозоле зависит от его высвобождения из эндоплазматического ретикула (ЭПР). Наряду с функционированием в качестве части секреторного механизма (см. 3 *Мембранное адресование белков* и 4 *Перемещение белка между мембранами*), ЭПР функционирует как депо внутриклеточного Ca^{2+} . В эндоплазматическом ретикулуме концентрация Ca^{2+} составляет порядка 10^{-3} М, и между ним и цитозолем, содержащим 10^{-7} М Ca^{2+} , существует крутой электрохимический градиент концентрации. После прохождения кальциевого сигнала в клетке снова устанавливается концентрация Ca^{2+} , характерная для состояния покоя. Основным Ca^{2+} -транспортным белком, который обеспечивает выход из цитозоля ионов Ca^{2+} , является Ca^{2+} -АТФаза, различные изоформы которой присутствуют в ЭПР и в плазматической мембране.

В настоящем разделе мы рассмотрим одну из основных Ca^{2+} -АТФаз, которая находится в мышечных клетках и нейронах. Клетки скелетных мышц обладают специальной структурой больших внутриклеточных депо Ca^{2+} , которые называются саркоплазматическим ретикулумом (СР). Эта структура способна эффективно контролировать внутриклеточный захват Ca^{2+} и его выброс в цитозоль. Выход ионов Ca^{2+} из цитозоля мышечных клеток в основном обеспечивается Ca^{2+} -АТФазой (SERCA) саркоплазматического ретикула. Клетки мышц являются одними из крупнейших клеток организма, и для эффективной активации и расслабления сократительных белков по всему объему клетки необходима разветвленная сеть структур, обеспечивающих внутриклеточное высвобождение Ca^{2+} и его реабсорбцию в депо (подробнее о мышечном сокращении см. 2.13 *Сердечная и скелетные мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения* и 8 *Актин*).

SERCA-насос представляет собой Ca^{2+} -активируемую АТФазу, которая является представителем большого семейства АТФ-зависимых клеточных насосов, известных под названием АТФазы Р-типа. Эти АТФазы используют механизм, посредством которого энергия, высвобождающаяся при гидролизе АТФ, расходуется на транспорт ионов H^+ , Na^+ или Ca^{2+} против градиента концентрации. Характерная особенность АТФаз Р-типа состоит в том, что в присутствии соответствующего катиона они используют АТФ для фосфорилирования остатка аспарагиновой кислоты, находящегося в структуре этих ферментов. Фосфорилирование приводит к появлению промежуточного макроэргического белка, который попеременно осуществляет связывание Ca^{2+} и перенос фосфата в цикле работы насоса. Таким образом, SERCA-насос использует химическую энергию гидролиза АТФ

для быстрого снижения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , за счет его реабсорбции в депо СР.

На рис. 2.48 представлены предполагаемые этапы цикла SERCA-насоса. Этот цикл характеризуется двумя основными конформациями фермента:

- конформация E_1 , в которой Ca^{2+} с высоким сродством связывается с цитоплазматической стороны, и
- конформация E_2 , в которой связывание Ca^{2+} происходит со значительно меньшим сродством, и поэтому он выходит из мест связывания в люмен СР.

В течение каждого ферментативного цикла два иона Ca^{2+} транспортируются в люмен СР, и предполагается, что протоны переносятся в противоположном направлении. При высокоафинном связывании двух атомов Ca^{2+} , находящихся в цитозоле, конформация меняется на E_1 (2Ca^{2+}). В этой конформации белок подвергается аутофосфорилированию с образованием промежуточного макроэргического белка $E_1\sim\text{P}$ (2Ca^{2+}). Энергия этого фосфопротеина расходуется на переход в конформацию $E_2\sim\text{P}$ (2H^+), которая обладает меньшим сродством к ионам Ca^{2+} . В этой конформации закрывается вход ионов из цитозоля, снижается сродство к ионам Ca^{2+} -транспортных сайтов, и открывается выход ионов в люмен СР. В обмен на связывание H^+ , ионы Ca^{2+} поступают в депо СР.

Затем происходит гидролиз фосфатной группы, и цикл завершается. Суммируя, можно отметить, что рабочий цикл SERCA-насоса состоит из последовательных событий фосфорилирования-дефосфорилирования, в результате которых два иона Ca^{2+} транспортируются в СР против градиента концентрации в обмен на два иона H^+ . При этом происходит гидролиз одной молекулы АТФ.

SERCA-насос характеризуется асимметричным расположением трансмембранных и цитозольных доменов, которые значительно перемещаются при транспорте ионов Ca^{2+} . Как следует из [1], АТФаза состоит из 10 трансмембранных α -спиралей ($M1-M10$) и двух больших цитоплазматических петель, расположенных между трансмембранными спиралями, причем одна петля находится между $M2$ и $M3$, а другая между $M4$ и $M5$. Трансмембранные α -спирали образуют сайты связывания Ca^{2+} , которые в конформации E_1 кооперативно связывают два атома Ca^{2+} из цитозоля. Две цитоплазматические петли образуют три отдельных домена. Петля между спиралями $M4$ и $M5$ образует нуклеотид-связывающий домен (N), который связывает АТФ, и Р-домен, содержащий сайт фосфорилирования. Петля между $M2$ и $M3$ содержит домен (A), который необходим для передачи конформационных изменений между трансмембранным и цитозольным доменами.

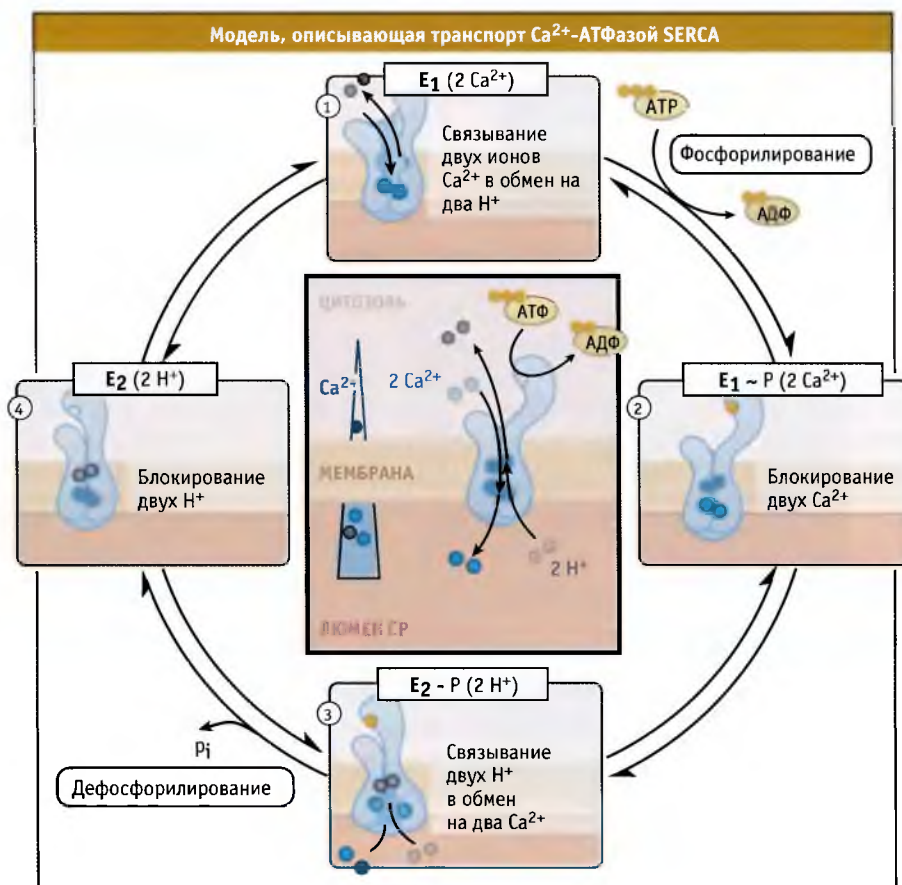
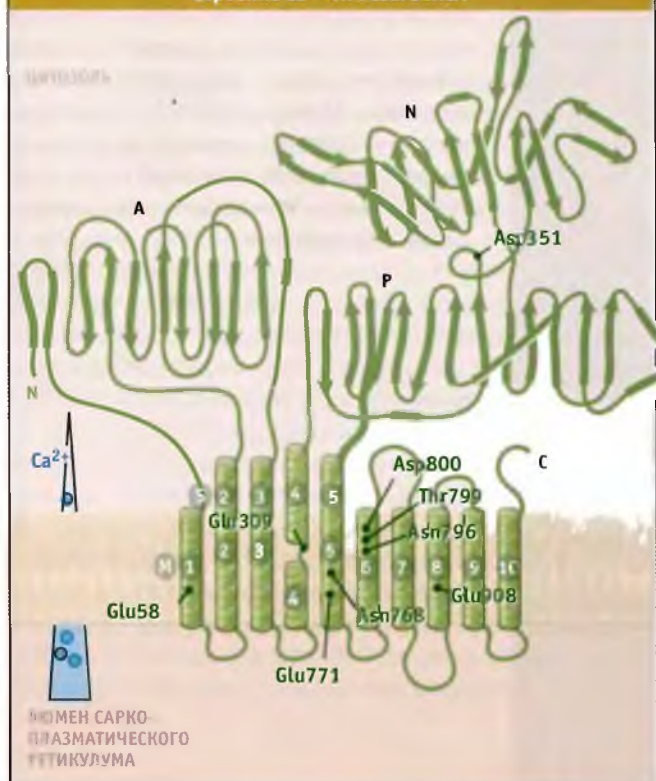


Рис. 2.48. Цикл транспорта Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум (СР) SERCA-насосом. Ионы Ca^{2+} связываются с высоким сродством с переносчиком, который находится в E_1 -конформации. Конформация E_2 обладает низким сродством к Ca^{2+} . Макроэргическая фосфатная связь обозначена как $E_1\sim\text{P}$



Расположение сайта фосфорилирования (Asp351) и ключевых остатков аминокислот, участвующих в связывании Ca^{2+} в изоформе SERCA1. Показан градиент Ca^{2+} по сторонам мембраны саркоплазматического ретикулума

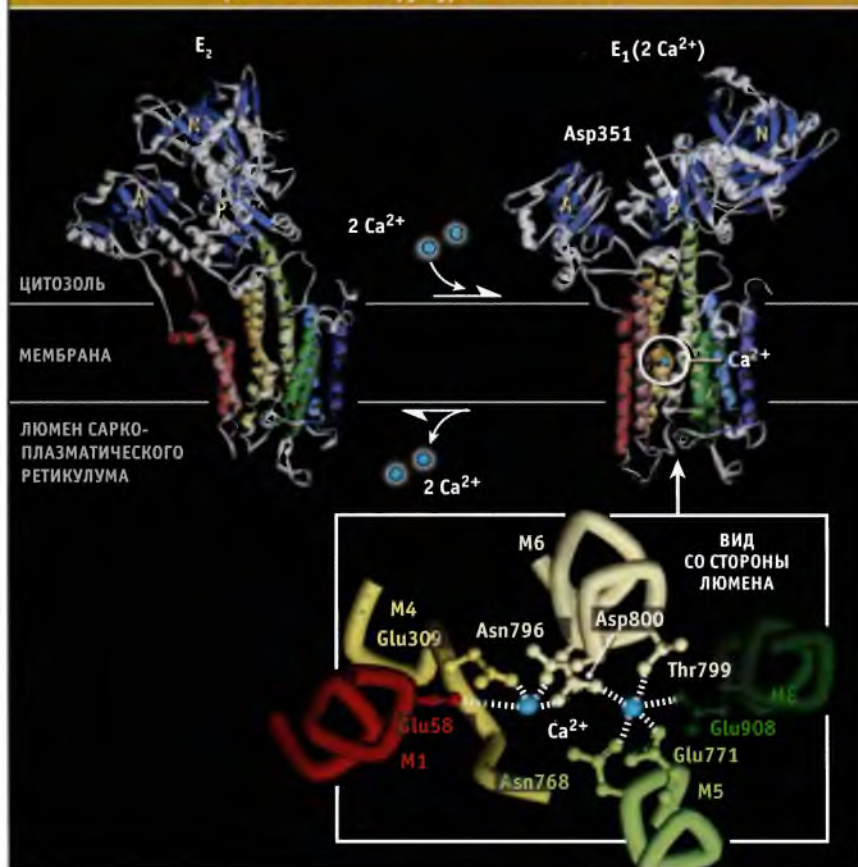
На представленные две кристаллические структуры, соответствующие SERCA-наосу, находящемуся в конформации E_2 (2H^+) и E_1 (2Ca^{2+}). Трансмембранные сегменты содержат гидрофильные остатки, которые образуют транспортный путь для ионов Ca^{2+} (на рис. 2.50 представлен вид со стороны люмена). Открытие и закрытие транспортного пути, по-видимому, сопряжены с конформационными перестройками цитоплазматических доменов с участием S4 и S5 удлиннений M4 и M5 трансмембранных сегментов. (см. рис. 2.49). Для структуры, способной с высоким сродством связывать Ca^{2+} , характерно наличие широкого промежутка между цитозольными доменами. За счет этого промежутка АТФ связывается с N-доменом. Предполагается, что после того, как ионы Ca^{2+} связались с трансмембранными доменами и возникла конформация E_1 (2Ca^{2+}), связывание АТФ приводит к фосфорилированию критического остатка аспарагиновой кислоты, Asp351 в P-домене. Это фосфорилирование индуцирует переход в конформацию E_2 с низким сродством к Ca^{2+} . В этой конформации при перегруппировке трансмембранных доменов разрушаются Ca^{2+} связывающие сайты, открываются ворота SERCA-насоса на стороне люмена, и ионы Ca^{2+} высвобождаются в просвет саркоплазматического ретикулума. При обратном переходе от E_2 (2H^+) в E_1 (2Ca^{2+}) конформацию

приобретает значительное перемещение доменов цитозоля, при этом из компактной структуры образуется открытая. Молекулы воды входят в открытую структуру и обеспечивают процесс дефосфорилирования, который является важным этапом на пути возвращения SERCA-насоса в конформационное состояние, при котором он способен связывать ионы Ca^{2+} . Сайты связывания Ca^{2+} доступны для цитоплазматического Ca^{2+} , но не для ионов, содержащихся в люмене, поскольку в течение цикла работы изменяется сродство насоса к кальцию.

Поскольку для прекращения процесса сокращения мышцы и начала ее расслабления требуется снижение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , необходимо, чтобы поток Ca^{2+} через SERCA направлялся только от цитозоля к депо CP, а не наоборот. Направление потока ионов через Ca^{2+} -АТФазы определяется последовательным сопряжением событий гидролиза АТФ и направленного транспорта Ca^{2+} . Конформационные изменения в доменах A, N и P, наступающие при связывании АТФ и фосфорилировании, вызывают растяжение трансмембранных спиралей, перекрывающее путь ионом Ca^{2+} со стороны цитоплазмы. При переносе фосфатной группы ворота для кальция закрываются. Таким образом, в физиологических условиях не существует обратного потока ионов Ca^{2+} от CP в цитозоль.

Для экспорта ионов Ca^{2+} из цитозоля и поддержания в нем необходимого в покое уровня этих ионов, SERCA-насос работает совместно с Ca^{2+} -АТФазой плазматической мембраны (PCMA). Оба фермента отличаются высоким сродством к ионам Ca^{2+} , которое значительно превышает сродство к этому катиону других кальций-связывающих белков и буферных систем цитозоля. PCMA и SERCA насосы имеют близкое строение и сходный механизм действия. Они содержат десять трансмембранных последовательностей и три больших домена в цитозоле. Наряду с различной локализацией в клетке, PCMA-насос отличается от SERCA тем, что в расчете на одну молекулу АТФ переносит один, а не два иона Ca^{2+} . Высокая транспортная эффективность и высокая плотность насоса SERCA в мембранах CP возбудимых клеток объясняют его преимущественное участие в выведении Ca^{2+} из цитозоля.

Na^+/K^+ -АТФаза и H^+ -АТФаза, которые также относятся к семейству АТФаз P-типа, имеют ряд общих структурных особенностей с группой SERCA (см. 2.19 Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану и 2.21 H^+ -АТФазы переносят протоны из цитозоля). Гомологическое сходство между Na^+/K^+ -АТФазой и Ca^{2+} -АТФазами выражено в большей степени, чем для других АТФаз, и сравнение их структурных особенностей поддерживает точку зрения о том, что эти ферменты обладают общими механизмами сопряжения процессов гидролиза АТФ и транспорта катионов через мембрану. Все три катионных насоса используют одинаковый каталитический цикл, который включает связывание АТФ, конформационные перестройки, приводящие к захвату транспортируемых катионов, их высвобождение с другой стороны мембраны, и дефосфорилирование для возвращения фермента в исходную конформацию, способную к связыванию ионов.



Структура E_2 не содержит ионов Ca^{2+} , а структура E_1 содержит два связанных иона. Трансмембранные спирали обозначены различными цветами, от красной M1 до темно-синей M10. Структура SERCA E_2 и кристаллическая структура E_1 построены на основании данных Protein Data Bank files 1EUL и 1IWO соответственно. Показано предполагаемое положение мембраны

2.19 Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент концентрации Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану

Основные положения

- Na^+/K^+ -АТФаза относится к АТФазам Р-типа, близким к Ca^{2+} -АТФазе и H^+ -АТФазе
- Na^+/K^+ -АТФаза поддерживает градиент Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану
- Na^+/K^+ -АТФаза плазматической мембраны является генератором электрического заряда: она транспортирует из клетки три иона Na^+ на каждые два иона K^+ , которые она закачивает в клетку
- Рабочий цикл Na^+/K^+ -АТФазы описывается схемой Поста-Альберса, согласно которой фермент совершает оборот между двумя основными конформациями

По отношению к окружающей среде все клетки заряжены отрицательно. Это обусловлено присутствием небольшого избытка положительно заряженных молекул во внеклеточном пространстве и противоположной ситуацией в цитозоле. Для нормального функционирования клетки по сторонам плазматической мембраны необходимо наличие электрохимического градиента. В этом отношении клетка напоминает электрическую батарею с разделенными зарядами, которую можно использовать для выполнения работы. В клетках млекопитающих градиенты концентрации Na^+ и K^+ представ-

ляют собой два основных компонента трансмембранного электрохимического градиента. Внутри клетки, по сравнению с внеклеточной средой, поддерживается более низкая концентрация ионов Na^+ и более высокая ионов K^+ . Образование и поддержание электрохимического градиента ионов Na^+ и K^+ в клетках животных происходят с участием Na^+/K^+ -АТФазы, которая представляет собой ионный насос, использующий энергию гидролиза АТФ для транспорта катионов. С помощью этого фермента в клетке устанавливается отрицательный мембранный потенциал покоя, с помощью которого контролируется необходимый уровень осмотического давления, который не позволяет клетке лизироваться или сжиматься и который также обеспечивает Na^+ -зависимый вторичный транспорт молекул (см. 2.7 Потенциал-зависимые Na^+ -каналы активируются при деполяризации мембраны и транслируют электрические сигналы; 2.8 Эпителиальные Na^+ -каналы регулируют гомеостаз Na^+ ; 2.16 Для функционирования многих переносчиков необходимо существование трансмембранного градиента ионов Na^+ ; 2.17 Некоторые переносчики Na^+ регулируют pH в цитозоле и во внеклеточной среде).

Na^+/K^+ -АТФаза относится к группе АТФаз Р-типа, включающей также Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикулума, которая рассматривалась в предыдущем разделе (см. 2.18 Ca^{2+} -АТФаза закачивает Ca^{2+} во внут-

рикеточные депо). АТФазы Р-типа представляют собой ферменты, которые при аутофосфорилировании остатка аспарагиновой кислоты в процессе ионного транспорта образуют фосфорилированный промежуточный продукт. В процессе аутофосфорилирования АТФаз Р-типа γ -фосфатная группа АТФ переносится на активный центр фермента. На каждую гидролизованную молекулу АТФ обмениваются три иона Na^+ из цитозоля и два иона K^+ из внеклеточной среды. Na^+/K^+ -АТФаза функционирует со скоростью 100 оборотов в 1 с. По сравнению с потоком ионов через поры каналов такая скорость транспорта представляется низкой. Транспорт через каналы происходит со скоростью 10^7 – 10^8 ионов в 1 с, т. е. близкой к скорости диффузии ионов в воде.

Были охарактеризованы основные этапы цикла ферментативного транспорта ионов, происходящего с участием Na^+/K^+ -АТФазы. Они представлены на схеме Поста–Альберса (Post, 1961, 1962). Первоначально эта схема была предложена для Na^+/K^+ -АТФазы, а затем использовалась для идентификации специфических состояний молекулы всех АТФаз Р-типа. Согласно схеме Поста–Альберса, АТФазы Р-типа могут принимать две различные конформации, которые обозначаются как фермент 1 (E_1) и

фермент 2 (E_2). Находясь в этих конформациях, они способны связывать, захватывать и транспортировать ионы. Эти конформационные изменения происходят за счет реакции фосфорилирования-дефосфорилирования:

- В конформации E_1 внутриклеточный АТФ и ионы Na^+ с высоким сродством связываются с АТФазой. При этом фермент переходит в состояние $\text{E}_1\text{ATP}(3\text{Na}^+)$, происходит АТФ-зависимое фосфорилирование остатка аспарагиновой кислоты и захват трех ионов Na^+ в конформации $\text{E}_1\sim\text{P}(3\text{Na}^+)$.
- Дальнейшее изменение конформации приводит к образованию состояния $\text{E}_2\sim\text{P}$, снижению сродства к ионам натрия, и к выходу их во внеклеточное пространство. Сродство фермента к ионам K^+ повышается.
- Связывание с АТФазой ионов K^+ , находящихся во внеклеточном пространстве, приводит к дефосфорилированию $\text{E}_2\sim\text{P}(2\text{K}^+)$ и к захвату двух ионов K^+ с переходом в состояние $\text{E}_2(2\text{K}^+)$.
- При связывании внутриклеточного АТФ конформация изменяется и ионы K^+ отщепляются. При этом возникает состояние E_1ATP , а связывание внутриклеточного натрия приводит к конформации $\text{E}_1\text{ATP}(3\text{Na}^+)$.

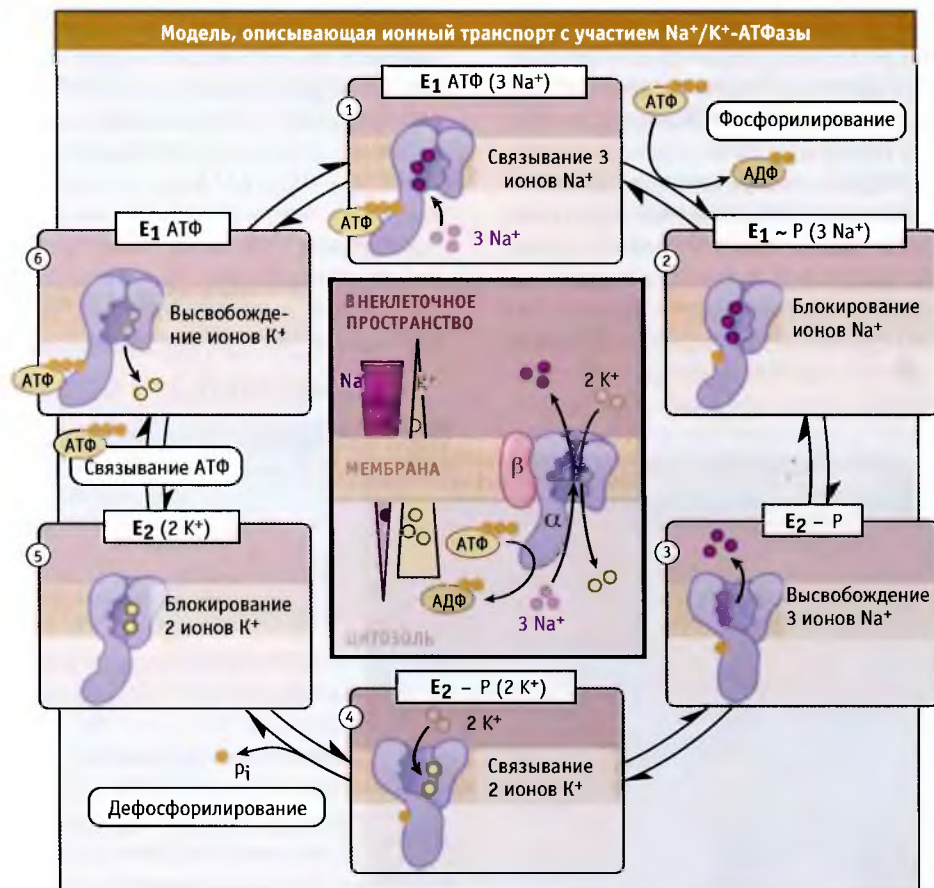


РИС. 2.51. Схема Поста–Альберса для рабочего цикла Na^+/K^+ -АТФазы. Макроэргическая фосфатная связь обозначена как $\text{E}_1\sim\text{P}$. На рисунке в центре представлен весь цикл работы фермента. Показаны градиенты ионов Na^+ и K^+ по сторонам плазматической мембраны покоейшей животной клетки

Анализ первичной структуры белков позволяет высказать предположение, что все АТФазы Р-типа обладают одинаковой пространственной структурой и транспортным механизмом. Na^+/K^+ -АТФаза состоит из двух субъединиц, каталитической α , одинаковой для всех АТФаз Р-типа, и регуляторной субъединицы, β , которая специфична для каждой АТФазы (рис. 2.51). Более мелкая субъединица β имеет один трансмембранный домен, который стабилизирует α -субъединицу и определяет ориентацию АТФазы в мембране. В клетках некоторых тканей активность Na^+/K^+ -АТФазы, вероятно, регулируется еще одним белком, субъединицей γ . Каталитическая субъединица α содержит сайты связывания для АТФ, а также для ионов Na^+ и K^+ . Эта субъединица в изолированном виде способна осуществлять транспорт ионов, как показано в экспериментах по гетерологичной экспрессии и в электрофизиологических исследованиях.

Структура α субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, построенная по данным криоэлектронной микроскопии, напоминает строение Ca^{2+} -АТФазы SERCA (рис. 2.52). Подобно насосу SERCA, эта субъединица состоит из 10 трансмембранных α спиралей (см. рис. 2.49). Внутриклеточный Р-домен, расположенный между трансмембранными сегментами 4 и 5, содержит сайт фосфорилирования, который обладает общей структурой для всех АТФаз Р-типа. Этот сайт представлен остатком Asp376 в характерной последовательности Asp-Lys-Thr-Gly-Thr-Leu-Thr. Связывание АТФ и ионов Na^+ индуцирует существенные изменения конформации петли, соединяющей N- и Р-домены. Эти изменения приводят к сближению сайта связывания АТФ на N-домене и сайта фосфорилирования на Р-домене.

Na^+/K^+ -АТФаза является ионным насосом-генератором. В обычных физиологических условиях свободная энергия гидролиза АТФ ($\Delta G_{\text{АТФ}}$) расходуется на транспорт из клетки трех ионов Na^+ в обмен на два иона калия, причем ионы переносятся против градиента их концентраций. Таким образом, клетка теряет суммарный

положительный заряд. Это способствует росту отрицательного заряда цитозоля по сравнению с внеклеточной средой. В результате по сторонам клеточной мембраны возникает разность потенциалов и осмотический ионный градиент (подробнее о мембранном потенциале см. 2.4 Электрохимический градиент по обеим сторонам мембраны создает мембранный потенциал).

АТФазы Р-типа представляют собой ионные насосы, использующие энергию гидролиза АТФ для поддержания трансмембранного ионного градиента. Поскольку каждый этап ферментативного цикла носит обратимый характер, АТФазы Р-типа в принципе могут продуцировать АТФ, используя энергию трансмембранного потенциала. Таким образом, Na^+/K^+ -АТФаза обладает определенной возможностью функционировать в противоположном направлении. При этом ионы Na^+ будут поступать в клетку, а ионы K^+ выходить оттуда, что приведет к тому, что поток ионов будет преимущественно направлен в клетку. Обычный транспорт ионов Na^+ из клетки и ионов K^+ в клетку происходит, пока величина $\Delta G_{\text{АТФ}}$ превышает электрохимическую энергию соответствующего ионного градиента. Когда энергия, необходимая для активного транспорта ионов Na^+ и K^+ , становится равной $\Delta G_{\text{АТФ}}$, поток ионов прекращается. Эта величина представляет собой потенциал обращения функционирования Na^+/K^+ -АТФазы, т. е. значение мембранного потенциала, ниже которого фермент начинает работать в обратном направлении. Значение потенциала обращения составляет порядка -180 мВ, т. е. он представляет собой гораздо более отрицательную величину, чем мембранный потенциал любой клетки в физиологических условиях. Поэтому маловероятно, что в клетку может поступать поток ионов Na^+ , имеющий для нее опасные последствия. Однако все может измениться при снижении кровоснабжения, например при инфаркте миокарда или при интоксикациях, приводящих к недостатку АТФ или к увеличению крутизны ионных градиентов.

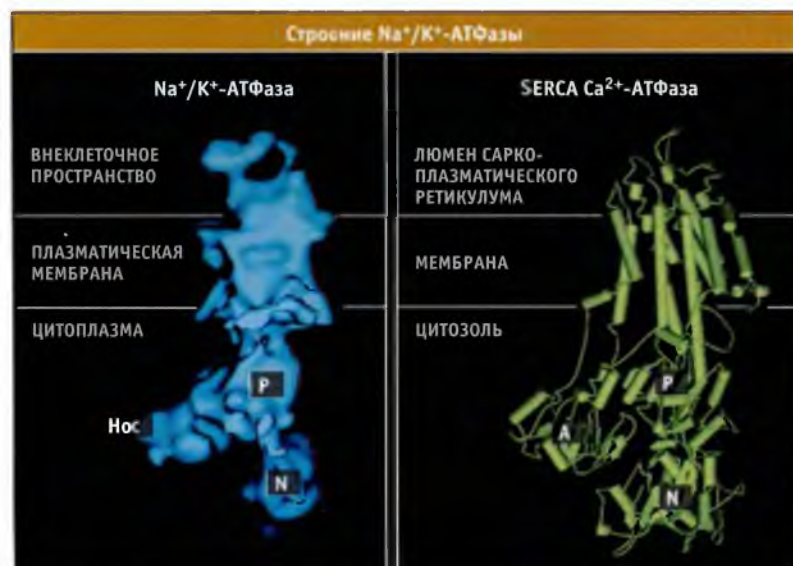


РИС. 2.52. Строение α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы напоминает Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикула (SERCA). Структура субъединицы установлена на основании данных крио-электронномикроскопического исследования. Изображение кристаллической структуры SERCA в конформации E2 получено на основании данных Protein Data Bank file 1IW0. По Rice, W.J., et al. *Biophys. J.* 2001. 80: 2187–2197. Copyright © 2001 by the Biophysical Society

В конце концов это может вызвать перемену направления транспорта ионов Na^+/K^+ -АТФазой и гибель клетки.

Na^+/K^+ -АТФаза является мишенью для многих токсинов и лекарственных препаратов. Например, растительные стероиды, называемые сердечными гликозидами, такие как убаин и дигиталис, являются специфическими ингибиторами ионного транспорта, осуществляемого Na^+/K^+ -АТФазой. К числу специфических ингибиторов относятся также другие токсины, например палитоксин из некоторых морских кораллов и сангвинарин из растений. В отличие от сердечных гликозидов, которые подавляют поток ионов через Na^+/K^+ -АТФазу, палитоксин и сангвинарин блокируют АТФазу в открытой конфигурации. Тем самым ионы получают возможность транспортироваться в направлении их концентрационных градиентов, что приводит к нарушению электрохимических градиентов. Сердечные гликозиды обратимо связываются с сайтами Na^+/K^+ -АТФазы, расположенными вне клетки, при этом ингибируется гидролиз АТФ и транспорт ионов. Тщательно контролируемое ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы клеток миокарда сердечными гликозидами, например дигиталисом, применяется при лечении сердечной недостаточности. Частичное ингибирование субпопуляции Na^+/K^+ -АТФаз сердечными гликозидами несколько увеличивает внутриклеточную концентрацию ионов Na^+ , что приводит к повышению концентрации ионов Ca^{2+} , благодаря транспорту через $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипортер. Известно, что небольшое увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция усиливает сократимость сердечной мышцы (см. 2.13 *Сердечная и скелетные мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения*).

2.20 F_1F_0 -синтаза вызывает сопряжение движения H^+ с синтезом или гидролизом АТФ

Основные положения

- F_1F_0 -АТФ-синтаза является ключевым ферментом окислительного фосфорилирования
- F_1F_0 -АТФ-синтаза представляет собой мультисубъединичный молекулярный мотор, который для синтеза АТФ использует энергию, высвобождающуюся при движении протонов в направлении электрохимического градиента

Основная масса энергии в клетках эукариот и почти всех прокариот запасается в процессе окислительного фосфорилирования в форме АТФ. Этот многоступенчатый процесс происходит в мембранах. В организме человека весом около 70 кг за 75 лет при сидячем образе жизни нарабатывается 2 млн кг АТФ. В клетках эукариот синтез АТФ, который является одним из наиболее распространенных ферментативных биологических процессов, происходит в специальных органеллах, называемых митохондриями. Образование АТФ в клетке катализируется ферментом F_1F_0 -АТФ-синтазой, который представляет собой необычный молекулярный мотор, использующий энергию элек-

трохимического градиента протонов (**трансмембранный протонный градиент**) для синтеза АТФ. Электрохимический градиент протонов создается комплексами, переносящими электроны в ходе окислительного фосфорилирования. Он определяется двумя показателями: мембранным потенциалом и разностью концентраций протонов по сторонам мембраны митохондрий.

Общая структура F_1F_0 -АТФ-синтазы во всех клетках одинакова, хотя состав субъединиц может различаться. Простейшая форма F_1F_0 -АТФ синтазы цитоплазматической мембраны бактериальной клетки состоит из восьми типов субъединиц и обладает молекулярной массой ~530 кДа. Состав ее может быть выражен стехиометрической формулой $\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon a b_2 c_{10-14}$. В митохондриях фермент содержит 7–9 дополнительных регуляторных субъединиц, которые немного увеличивают его молекулярную массу. АТФ-синтаза состоит из двух доменов (рис. 2.53):

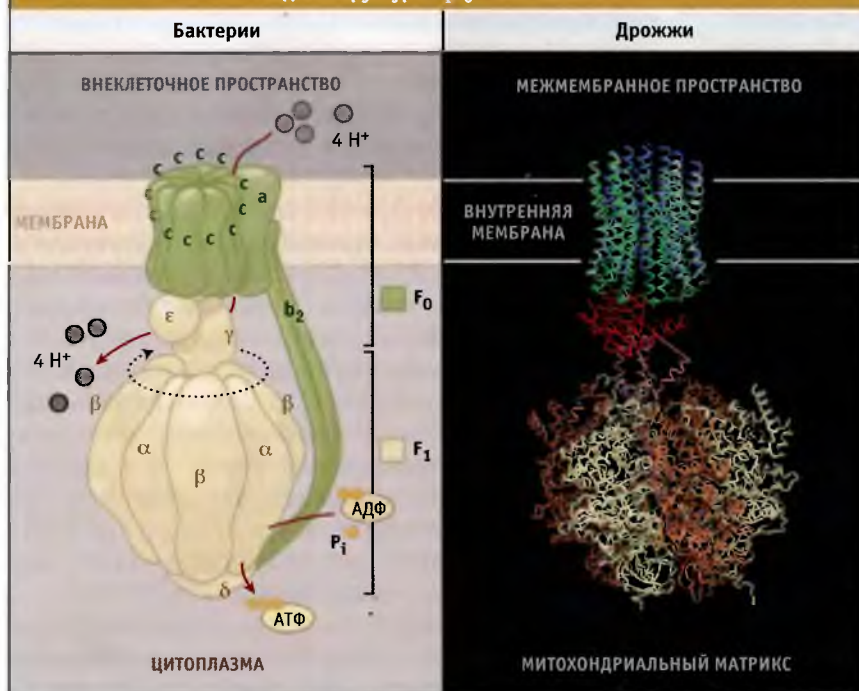
- связанный с мембраной домен F_0 ($a b_2 c_{10-14}$ у бактерий), который участвует в транслокации протонов в направлении электрохимического градиента, и
- глобулярный домен F_1 ($\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \epsilon$ у бактерий), содержащий каталитические сайты, ответственные за синтез АТФ. (Изолированный F_1 домен обладает способностью к гидролизу АТФ.)

Субъединицы **c** домена F_0 образуют кольцо, которое взаимодействует с субъединицей **a**. Субъединица γ формирует центральный выступ ротора, который связан с основанием кольца **c** и входит в каталитический домен F_1 . Этот домен состоит из трех α и трех β субъединиц, которые расположены попеременно и образуют структуру гексагонального цилиндра вокруг субъединицы γ . Выступающая ножка статора состоит из субъединиц $b_2 \delta$, причем субъединица δ связана с доменом F_1 , а b_2 с доменом F_0 митохондриальной мембраны и с субъединицей **a**.

Каким образом F_1F_0 -АТФ-синтаза использует энергию трансмембранного протонного градиента для синтеза АТФ? Предложенная модель постулирует существование следующих основных этапов:

- субъединицы **a** и **c** контролируют транспорт протонов таким образом, что **c**-кольцо вращается по отношению к субъединице **a** (см. рис. 2.53). Иными словами, энергия электрохимического градиента протонов расходуется на механическое вращение субъединиц **c**;
- γ -субъединица центрального выступа вращается вместе с **c**-кольцом, при этом трансмембранная движущая сила протонов передается на расстояние 100 Å домен F_1 ; и
- механическая энергия вращения используется для высвобождения АТФ, синтез которого катализируется β -субъединицами домена F_1 .

Поэтому вращение **c**-кольца и центральной γ -субъединицы относительно субдомена $\alpha_3 \beta_3$ играет существенную роль в сопряжении трансмембранной движущей силы протонов с образованием и выходом АТФ. Поскольку каждая **c**-субъединица несет один протон, то при полном обороте **c**-кольца (в зависимости от типа АТФазы) транспортируются 10–14 протонов, и на одну молекулу образующегося АТФ транспортируются около четырех протонов. F_1F_0 -



Схематическое изображение комплекса F_1F_0 -АТФ-синтазы *E. coli* и часть кристаллической структуры дрожжевого фермента. Изображение кристаллической структуры дрожжевого фермента построено на основании Protein Data Bank file 1Q01. Показано предполагаемое положение мембраны

АТФ-синтаза превращает электрохимическую энергию в механическую и снова в химическую, почти со 100%-ной эффективностью. Синтез АТФ может проходить с максимальной скоростью порядка 100 с^{-1} , и уровень АТФ в клетке может достигать миллимолярных концентраций.

У некоторых бактерий F_1F_0 -АТФ-синтаза работает в обратном направлении, и энергия, высвобождающаяся за счет гидролиза АТФ, расходуется на выход протонов из клетки и на создание их градиента по сторонам цитоплазматической мембраны. Затем энергия протонного градиента используется для транспорта в клетку метаболитов, например лактозы (см. рис. 2.37 и 2.15 *Сопряженный транспорт осуществляется за счет процессов симпорта и антипорта*).

леточных процессов. Благодаря метаболизму среда в цитозоле постоянно закисляется и для поддержания постоянного значения pH протоны должны все время удаляться. Поэтому белки, осуществляющие транспорт протонов, необходимы в регуляции pH. Например, pH цитозоля, который играет важную роль в контроле роста клетки и всех матаболических процессов, регулируется такими мембранными переносчиками, как Na^+/H^+ -обменник (см. 2.17 *Некоторые переносчики Na^+ регулируют pH в цитозоле и во внеклеточной среде*). Наряду с этим митохондрии представляют собой некий «резервуар» протонов, образующихся в цитозоле, и F_1F_0 -АТФ-синтаза внутренней мембраны митохондрий использует движущую силу протонов для синтеза АТФ (см. 2.20 *F_1F_0 -АТФ-синтаза вызывает сопряжение движения H^+ с синтезом или гидролизом АТФ*).

В отличие от цитозоля, в котором поддерживается слабощелочное значение pH, в некоторых клеточных органеллах должна быть кислая среда. К числу таких компартментов относятся органеллы, принимающие участие в процессах эндоцитоза (клатриновые везикулы, эндосомы, лизосомы) и экзоцитоза (секреторные гранулы). В этих органеллах оптимальные значения pH (4,5–6,8) поддерживаются с помощью протонных насосов вакуолярного типа (V-АТФазы), представляющих собой H^+ -АТФазы. Эти АТФазы относятся к группе насосов, которые транспортируют протоны из цитозоля в люмен органелл, используя энергию АТФ. Они играют важную роль в процессах эндоцитоза и внутриклеточного позиционирования (). Для таких процессов, как диссоциация комплексов лиганд–рецептор и возвращение клеточных мембранных рецепторов в плазматическую мембрану, происходящих в ранних эндосомах,

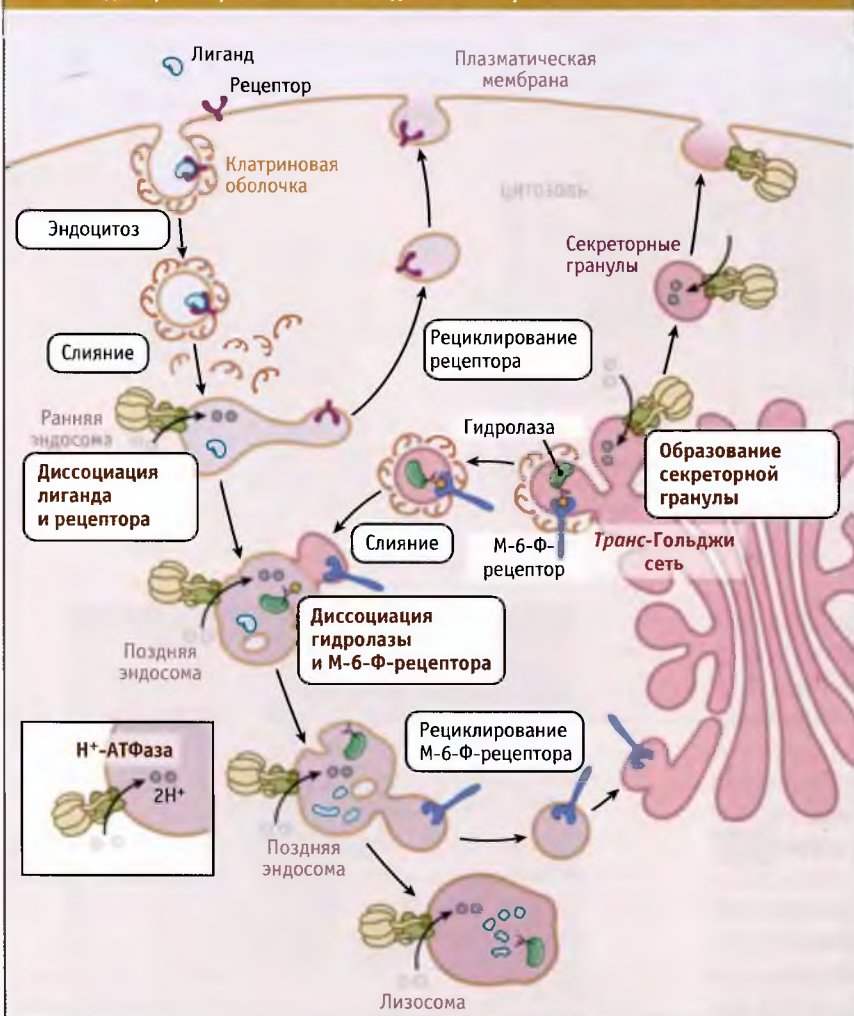
2.21 H^+ -АТФазы переносят протоны из цитозоля

Основные положения

- Концентрация протонов влияет на многие клеточные функции
- За счет V-АТФаз происходит закисление внутриклеточных компартментов
- V-АТФазы плазматической мембраны выполняют специфические функции, вызывая закисление внеклеточных жидкостей, и регулируют pH цитозоля
- V-АТФазы являются протонными насосами, которые состоят из нескольких субъединиц и обладают структурой, близкой к F_1F_0 -АТФ-синтазам

Поскольку функционирование белков зависит от величины pH, этот показатель служит важным параметром, влияющим на протекание многочисленных внутрик-

Некоторые V-АТФазы участвуют в везикулярном транспорте. Закисление среды в эндосомальных компартментах необходимо для диссоциации комплексов белок-рецептор и рециклирования рецепторов. Наряду с этим, H^+ -АТФазы необходимы для образования секреторных гранул

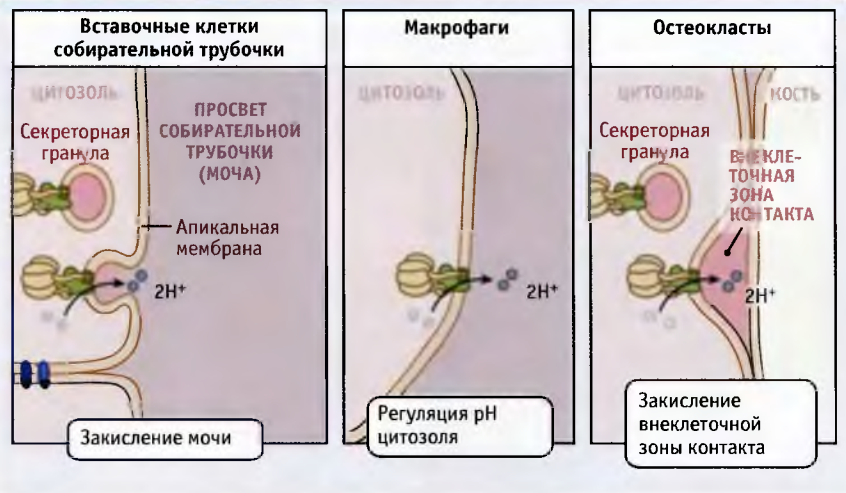


необходима кислая среда. H^+ -АТФазы также участвуют в подкислении поздних лизосом, которое необходимо для доставки из *транс*-Гольджи сети лизосомальных ферментов, например содержащих метку манноза-6-фосфата (М-6-Ф). В секреторных гранулах, например в синаптических пузырьках и хромаффинных гранулах, протонный градиент и/или мембранный потенциал, создающийся при действии H^+ -АТФаз, обеспечивает движущую силу сопряженного транспорта, а также создание внутри гранул запасы небольших молекул и ионов. Например, захват норадреналина синаптическими пузырьками зависит от протонного градиента, а захват глутамата определяется мембранным потенциалом. Некоторые вирусы, обладающие внешней оболочкой, например вирусы гриппа, используют кислое значение pH в эндосомальных компартментах для доступа в клетку. Вирусный гемагглютинин при низких значениях pH активируется, что облегчает слияние вируса с эндосомой. (Подробнее об эндоцитозе и экзоцитозе см. 4.3 Обзор путей эндоцитоза и 4.2 Обзор путей экзоцитоза.)

Некоторые H^+ -АТФазы находятся в плазматической мембране ряда специализированных клеток, например

почек, нейтрофилов и остеокластов. Там они играют важную роль в процессах закисления мочи, поддержания pH цитоплазмы и резорбции костной ткани соответственно. В апикальной мембране эпителиальных вставочных клеток почек находятся в большом количестве H^+ -АТФазы, которые активно транспортируют в мочу протоны (рис. 2.44). Мутации в генах, кодирующих белки этих АТФаз, вызывают нарушения функционирования транспортного механизма, что приводит к пониженной способности почек контролировать pH крови и к развитию почечного и метаболического ацидоза. Нейтрофилы и макрофаги иммунной системы, несмотря на значительное образование кислот в процессе работы, поддерживают нейтральные значения pH цитозоля при участии H^+ -АТФаз плазматической мембраны. В процессе перестройки кости остеокласты присоединяются к костному матриксу, и H^+ -АТФазы оказываются в области активной контактной зоны. Закисление этой зоны помогает растворить костный матрикс и активирует гидролазы, участвующие в резорбции кости.

H^+ -АТФазы представляют собой белковые комплексы, состоящие из субъединиц и содержащие два функ-



циональных домена V_1 и V_0 (РИС. 2.56). Расположенный в цитозоле домен V_1 связывает и гидролизует АТФ. Свободная энергия гидролиза АТФ используется для трансмембранного транспорта протонов, который происходит через мембранный домен V_0 . Предполагаемая структура фермента построена на основании данных электронной микроскопии, использования метода белковых шпиков и сайт-специфического мутагенеза. Хотя идентифицированы еще не все компоненты насоса, можно предполагать, что цитоплазматический АТФ-связывающий V_1 -домен с массой 640 кДа состоит из субъединиц А-Н и может быть изображен следующей стехиометрической формулой: $A_3B_3C_1D_1E_1F_1G_2H_1$, а домен V_0 массой 260 кДа состоит из пяти типов субъединиц: $a_1d_1c''1c'1c4$.

H^+ -АТФазы близки к F_1F_0 -АТФ-синтазам, которые функционируют в обратном направлении и образуют АТФ в митохондриях, хлоропластах и бактериях (см. 2.20 F_1F_0 -синтаза вызывает сопряжение движения H^+ с синтезом или гидролизом АТФ). Оба типа ферментов имеют два аналогичных домена, F_0 или V_0 , и F_1 или V_1 (см. рис. 2.53 для F_1F_0 -АТФ-синтазы). Субъединица В домена V_1 содержит некаталитический сайт связывания нуклеотида, а субъединица А — каталитический сайт связывания АТФ. Эти сведения были получены на основании экспериментов по сайт-зависимому мутагенезу и по использованию блокаторов сульфгидрильных групп. Поскольку оба фермента близки друг к другу по строению, механизм функционирования H^+ -АТФаз, вероятно, аналогичен хорошо изученному механизму действия F_1F_0 -синтаз.

По-видимому, F_1F_0 -синтазы функционируют как роторные двигатели, в которых протонный градиент приводит во вращение кольцо c -субъединиц. Вращение происходит относительно субъединицы a домена F_0 . Энергия вращения через центральный выступ γ и субъединицу ϵ передается на кольцевую структуру F_1 и используется субъединицами α и β для синтеза АТФ и высвобождения. Субъединицы c содержат остатки ас-

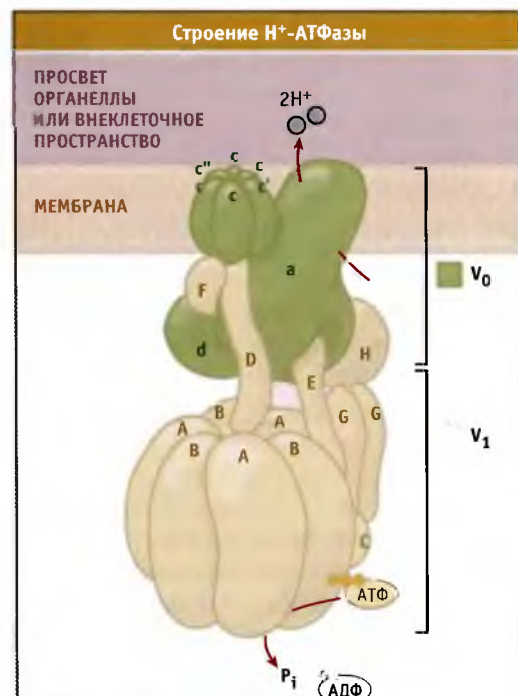
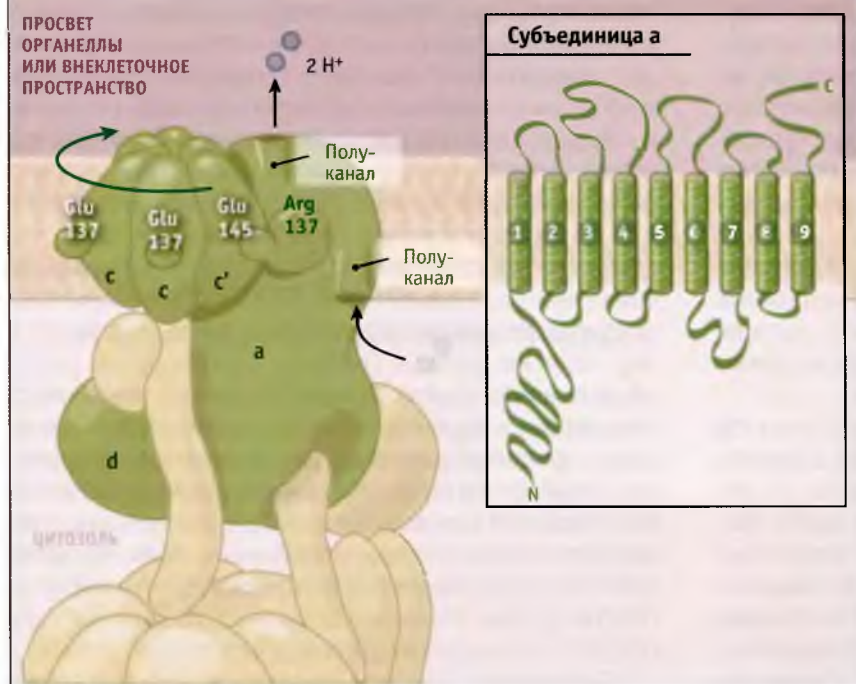


РИС. 2.56. Модель, описывающая строение H^+ -АТФаз. Эти ферменты транспортируют протоны из цитозоля в просвет везикул или во внеклеточное пространство посредством интегрированного в мембрану V_0 домена. Цитоплазматический V_1 домен расходует энергию гидролиза АТФ на транспорт протонов

парагиновой кислоты, которые играют важную роль в транспорте протонов, а субъединица a обеспечивает протонам доступ к кольцу c -субъединиц.

Аналогичная модель, описывающая функционирование H^+ -АТФаз, представлена на рис. 2.56. Согласно этой модели, энергия, которая высвобождается при гидролизе АТФ доменом V_1 , обеспечивает вращение c -кольца и перенос протонов. Субъединица a , входящая в состав

Рис. 2.57. Модель, описывающая вращение с-кольца и движение протонов через V_0 -домен (гидролиз АТФ в V_1 -домене, обеспечивающий это движение, не показан). В рамке показана схема предположительного строения субъединицы а домена V_0 , построенная на основании данных по мутагенезу и при использовании химических модификаторов



домена V_0 , переносит протоны через девять предполагаемых трансмембранных сегментов, расположенных в ее С-концевой области. Положительно заряженный остаток аргинина в субъединице **а** стабилизирует отрицательно заряженный остаток глутамата в одной из субъединиц **с** до момента ее протонизации. В субъединице **а** для транспорта протона и обратимого протонирования остатка глутамата, который высвобождает его при взаимодействии с остатком аргинина субъединицы **с**, используются две полуканальные структуры. Электростатическое притяжение аргининового остатка к непротонированному глутамату следующей **с**-субъединицы позволяет **с**-кольцу вращаться, что приводит каждую субъединицу **с** в контакт с субъединицей **а**. Этот механизм обеспечивает односторонний транспорт протонов за счет энергии гидролиза АТФ.

Активность H^+ -АТФаз регулируется по нескольким механизмам. Один механизм включает регулируемое позиционирование и слияние внутриклеточных везикул, содержащих протонные насосы, с плазматической мембраной. Например, во вставочных клетках почек секреторные везикулы, содержащие H^+ -АТФазы, в ответ на снижение внутриклеточного pH, обратимо сливаются с апикальной мембраной. Согласно второму механизму, образование дисульфидных связей между консервативными остатками цистеина, расположенными неподалеку от каталитического центра субъединицы **а**, приводит к обратимому ингибированию активности АТФазы. Третий механизм постулирует, что в определенных условиях обратимая диссоциация комплекса на домены V_1 и V_0 служит важным механизмом регуляции активности H^+ -АТФазы.

2.22 Что дальше?

Возможность наблюдать ионные каналы при атомном разрешении ознаменовала собой крупнейший прорыв в исследовании процессов мембранного транспорта. Например, данные рентгеноструктурного анализа совершили переворот в нашем понимании основных принципов селективности и проницаемости для новых типов ионных и аквапориновых каналов. Однако данные рентгеноструктурного анализа получены для относительно небольшого количества мембранных транспортных белков, и во многих случаях мы располагаем результатами, полученными для бактериальных белков, которые можно выделить в достаточных количествах. Анализ кристаллической структуры других транспортных белков позволяет выяснить более общие принципы их функционирования. Наряду с этим, анализ кристаллической структуры транспортных белков эукариот дает возможность проникнуть вглубь более сложных процессов, таких, например, как функционирование нейронов.

Установление кристаллической структуры оказалось необходимой предпосылкой для разработки моделей, описывающих работу мембранных транспортных белков. Возможность наблюдать за транспортными белками в реальном времени, используя методы ядерного магнитного резонанса (ЯМР) или другие спектроскопические методы, дополняет данные кристаллической структуры. С помощью этих методов можно получить информацию о переходе белков из одной конформации в другую, о регуляции воротного механизма ионного канала и о конформаци-

онных изменениях, происходящих с белками-носителями в процессе переноса ими различных метаболитов.

На генетическом и функциональном уровнях обнаружено множество мембранных переносчиков, ионных каналов и насосов. Современные методы молекулярной генетики позволяют идентифицировать все новые транспортные белки. Более того, выяснилось, что наряду с порообразующими субъединицами для функционирования некоторых транспортных белков необходима субъединичная структура. Для более полного понимания регуляции активности транспортных белков была бы важна идентификация других подобных субъединиц. Микроаррей-технология и протеомный анализ также позволяют сравнить уровень экспрессии транспортных белков и их регуляторов в нормальных клетках и при различных патологиях.

В качестве перспективной задачи представляется крайне необходимым связать информацию, полученную на основании данных анализа структуры, с физиологическими свойствами клеток и организмов. Нам необходимо изучать транспортные белки в окружении клеточных структур и липидов и исследовать механизмы транспорта и его регуляции. Многие заболевания связаны с мутациями в генах, кодирующих синтез мембранных транспортных белков. Однако для понимания роли определенного ионного канала в развитии заболевания важно оценить функцию этого канала в масштабе всей клетки и, наконец, на уровне органа и организма в целом. Известно, например, что мутации в белке хлорных каналов — регуляторе трансмембранного переноса при кистозном фиброзе (CFTR) являются причиной аномальной реабсорбции Na^+ в легких и желудочно-кишечном тракте больных. Это приводит к образованию густой слизи, которая накапливается в органах, зависящих от такого типа транспортной функции клеток эпителия. Подобные исследования требуют разработки новых биологических тестов, позволяющих оценивать специфические функции. Понимание молекулярных механизмов работы различных ионных каналов дает возможность понять детали функционирования клеток нервной системы и выяснить причины развития аномалий, приводящих к аритмиям и внезапной смерти.

2.23 Резюме

Были рассмотрены три основных класса мембранных транспортных белков: каналы, переносчики и насосы. Эти белки расположены в плазматической мембране и в мембранах внутриклеточных органелл, таких как эндоплазматический ретикулум, эндосомы, лизосомы и митохондрии. Они принимают участие в многочисленных клеточных процессах, начиная с усвоения питательных компонентов, например глюкозы, и заканчивая более сложными физиологическими задачами, такими как реабсорбция метаболитов клетками почек и распространение потенциала действия.

Каналы обладают порами, которые обеспечивают быструю пассивную диффузию ионов или других метаболитов через биологические мембраны. Они различаются по селективности: некоторые каналы высокоселективны по отношению к K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- или к молекулам воды, в то время как другие селективны по отношению только к определенным анионам или катионам. Селективность определяется особой областью ионного канала, называемой селективный фильтр. Фильтр обеспечивает частичную дегидратацию ионов, проходящих через канал, что делает их транспорт энергетически более выгодным по сравнению с другими ионами одинаковой величины. Процесс открытия и закрытия ионных каналов называется воротным механизмом (гейтинг) и регулируется разнообразными факторами. Например, ионный канал может открываться и закрываться под действием электрического заряда, механических усилий или температуры. Направление потока ионов через канал зависит от электрохимического градиента того или иного иона, а его транспорт связан с прохождением электрического тока через мембрану. Выяснено строение некоторых канальных белков, и предложены модели, объясняющие их селективность, быструю скорость транспорта и контроль воротного механизма.

Переносчики и насосы представляют собой селективные белки, которые отличаются от каналов механизмами переноса. Транспортные белки способны попеременно принимать две основные конформации: в одной конформации они способны связывать переносимый метаболит на одной стороне мембраны, а находясь в другой, высвобождать его с противоположной стороны. Для осуществления процесса транспорта переносчики и насосы используют различные источники энергии. Переносчики расходуют энергию электрохимического градиента по обеим сторонам мембраны. Напротив, насосы используют энергию АТФ или внешние источники (например, свет).

Трансмембранный электрохимический градиент устанавливается за счет взаимодействия различных транспортных белков. Большая часть энергии клетки расходуется на установление ионного градиента по сторонам или плазматической мембраны или внутренних мембран клетки. Например, за счет насоса Na^+/K^+ -АТФазы создается трансмембранный градиент ионов Na^+ и K^+ . Энергия электрохимических трансмембранных градиентов используется каналами и переносчиками для выполнения работы. Эти градиенты, например, используются потенциал-зависимыми ионными каналами для генерации электрических зарядов, или другими типами ионных каналов для активации внутриклеточных систем передачи сигнала, а также для контроля клеточного объема или управления транспортом жидкостей и электролитов. Вместе с тем, переносчики используют энергию электрохимического градиента одного метаболита для транспорта другого метаболита против градиента его концентрации.

Мутации в генах, кодирующих белки ионного канала, переносчика или насоса, вызывают различные функциональные дефекты. Нарушения функции ионных каналов часто проявляются в нейронах и мышечных клетках и служат причиной развития таких заболеваний, как эпилепсия,

атаксия, миотонии и сердечные аритмии. К числу болезней при нарушении ионных каналов, затрагивающих другие органы, относятся кистозный фиброз, синдром Бартера, расстройства секреции инсулина, образование почечных камней и остеопетроз. Исследования характера нарушений ионных каналов при мутациях позволяют понять особенности их функционирования и физиологическую роль.

2.24 Приложение: Вывод и применение уравнения Нернста

Равновесие между химическими и электрическими движущими силами определяет величину мембранного потенциала покоя (см. 2.4. *Электрохимический градиент по обеим сторонам мембраны создает мембранный потенциал*). Состояние равновесия достигается, когда различие в свободной энергии этих сил равно нулю (другими словами, когда общий поток = 0):

$$\Delta G_{\text{conc}} + \Delta G_{\text{elec}} = 0$$

Изменение свободной энергии, происходящее при движении через мембрану компонента X, можно выразить уравнением:

$$\Delta G_{\text{conc}} = -RT \ln \left(\frac{[X]_o}{[X]_i} \right)$$

- R — газовая постоянная (2 кал моль⁻¹ K⁻¹)
- T — абсолютная температура (K; 37 °C = 307,5 K)
- [X]_o — концентрация X вне клетки
- [X]_i — концентрация X внутри клетки

и изменение свободной энергии, обусловленное транспортом через мембрану заряда, связанного с растворенным компонентом X составляет:

$$\Delta G_{\text{elec}} = zFE_m$$

- E_m — равновесный потенциал (в вольтах)
- z — валентность иона (электрический заряд)
- F — число Фарадея (2,3 × 10⁴ кал вольт⁻¹ моль⁻¹)

$$zFE_m = RT \ln \left(\frac{[X]_o}{[X]_i} \right)$$

В состоянии равновесия

$$E_m = \left(\frac{RT}{zF} \right) \ln \left(\frac{[X]_o}{[X]_i} \right)$$

и после преобразования получаем

Таким образом, значение равновесного потенциала или потенциала Нернста для одновалентного иона X при 37 °C определяется уравнением:

$$E_m = 61,5 \log_{10} \left(\frac{[X]_o}{[X]_i} \right) \text{ милливольт (мВ)}$$

Если концентрация ионов известна, то уравнение Нернста можно использовать для расчета равновесного мембранного потенциала для каждого иона в отдельности. На рис. 2.58 показаны результаты таких расчетов для плазматической мембраны мышечных клеток. Так, для [K⁺]_o = 4 мМ и [K⁺]_i = 155 мМ значение мембранного потенциала E_m = -98 мВ, если учитывать только поток ионов K⁺, т. е. E_m = E_K.

Почти во всех покоящихся клетках млекопитающих плазматическая мембрана проницаема для ионов K⁺. Na⁺/K⁺-АТФаза поддерживает трансмембранный ионный градиент и создает внутри клетки относительно высокую концентрацию ионов K⁺ ([K⁺]_i). При открытии некоторых K⁺-каналов ионы K⁺ начинают транспортироваться в направлении градиента концентрации, что приводит к появлению положительного заряда с внешней стороны мембраны и отрицательного с внутренней ее стороны. Этот отрицательный мембранный потенциал, E_m, представляет собой электродвижущую силу, которая препятствует дальнейшему выходу K⁺ из клетки в направлении градиента (химическая движущая сила). Таким образом, открытие в покоящейся клетке специ-

Концентрация ионов и равновесные потенциалы				
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻
Внеклеточная концентрация (мМ)	145	4	1,5	123
Равновесный потенциал (мВ)	+67	-98	+129	-90
Внутриклеточная концентрация (мМ)	12	155	10 ⁻⁴	4,2

Рис. 2.58 Концентрация свободных ионов и равновесные потенциалы клеток скелетных мышц млекопитающих. Значения равновесных потенциалов рассчитаны для 37 °C, принимая величину потенциала покоя мембраны мышечной клетки равной -90 мВ. Сверху обозначены относительные радиусы негидратированных ионов

альных селективных K^+ -каналов определяет значение отрицательного потенциала покоя, при котором не происходит транспорта K^+ через мембрану и величина E_m остается постоянной.

Аналогично потенциал Нернста можно рассчитать и для других ионов. Если мембрана становится более проницаемой для определенных ионов, то мембранный потенциал E_m будет меняться, приближаясь к значению потенциала Нернста для этих ионов (обычно становясь более положительным при деполяризации мембраны).

Например, если плазматическая мембрана становится более проницаемой для ионов Na^+ , то они будут транспортироваться в направлении своего градиента концентрации. При этом мембрана будет приобретать отрицательный заряд с внешней стороны и положительный заряд с внутренней. В физиологических условиях, в покоящейся клетке, открытие нескольких Na^+ -каналов, наряду с постоянным притоком зарядов за счет протечки, приведет к поступлению Na^+ в клетку, и значение мембранного потенциала покоя сдвинется в более положительную сторону (например, -82 мВ). Напротив, аналогичный расчет в случае ионов K^+ показывает, что значение мембранного потенциала покоя составит -89 мВ. В клетках, обладающих меньшей проницаемостью для ионов K^+ в результате фоновой утечки ионов Na^+ и деполяризующих ионных потоков, величина мембранного потенциала покоя E_m смещается в сторону более положительных значений (например, становится равной -50 мВ). При возбуждении клетки электрическим зарядом и открытии Na^+ каналов, в состоянии теоретического равновесия между потоком Na^+ , направленным в клетку, и потоком K^+ , направленным в противоположную сторону, уровень мембранного потенциала оказывается ближе к E_{Na} , а не к E_K . Согласно уравнению Нернста, равновесный потенциал для Na^+ при $37^\circ C$ составляет:

$$E_{Na^+} = 61,5 \log_{10} \left(\frac{[Na^+]_o}{[Na^+]_i} \right)$$

Если $[Na^+]_o = 145$ мМ и $[Na^+]_i = 12$ мМ (как для клеток мышц на рис. 2.58), то значение мембранного потенциала составляет $E_m = +67$ мВ, принимая во внимание транспорт только ионов Na^+ . Таким образом, суммарный эффект открытия Na^+ каналов выражается в установлении потока ионов натрия, направленного в клетку, что приводит к сдвигу отрицательного потенциала покоя E_m до значения $+67$ мВ.

Аналогичным образом, когда плазматическая мембрана становится более проницаемой для Ca^{2+} , ионы транспортируются в направлении градиента концентрации. При этом мембрана на внешней стороне приобретает более отрицательный заряд, а на внутренней — более положительный. Когда под действием электрического заряда клетка возбуждается и открываются Ca^{2+} -каналы, теоретическое равновесие между потоком Ca^{2+} в клетку и потоком K^+ из клетки определяет уровень мембранно-

го потенциала ближе к значению E_{Ca} . Согласно уравнению Нернста,

$$E_{Ca^{2+}} = \left(\frac{RT}{2F} \right) \ln \left(\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i} \right) = 30,75 \log_{10} \left(\frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i} \right)$$

Если $[Ca^{2+}]_o = 1,5$ мМ и $[Ca^{2+}]_i = 0,1$ мкМ, как для мышечной клетки на рис. 2.58, то мембранный потенциал составляет $E_m = +129$ мВ. Таким образом, суммарный эффект открытия Ca^{2+} каналов выражается в установлении потока Ca^{2+} в клетку, который приводит к сдвигу отрицательного потенциала покоя E_m к $+129$ мВ. $[Ca^{2+}]$ -каналы открываются при более положительном значении потенциала действия, чем натриевые каналы. Это означает, что они открываются на более поздней фазе потенциала действия (см. 2.12 *Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов*).

Для ионов Cl^- по уравнению Нернста получаем

$$E_{Cl^-} = - \left(\frac{RT}{F} \right) \ln \left(\frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i} \right) = -61,5 \log_{10} \left(\frac{[Cl^-]_o}{[Cl^-]_i} \right)$$

Если $[Cl^-]_o = 123$ мМ и $[Cl^-]_i = 4,2$ мМ, то мембранный потенциал только для Cl^- составляет $E_m = -90$ мВ. Таким образом, суммарный эффект открытия хлоридного канала приводит к выходу ионов Cl^- , что стабилизирует отрицательное значение потенциала покоя E_m .

2.25 Приложение: Большинство K^+ -каналов способны обеспечивать входящее выпрямление

Основное положение

- При потенциал-зависимом блокировании поры происходит входящее выпрямление

Каким образом различные K^+ -каналы обеспечивают изменения мембранного потенциала и участвуют в окончании процесса деполяризации мембраны? Большинство ионных каналов обладают способностью к **выпрямлению**, которое представляет собой изменение ионной проводимости в ответ на изменение заряда мембраны. Термин **входящее** (аномальное) **выпрямление** означает, что ионный канал проводит входящий ток лучше, чем исходящий. В качестве примера приведем семейство K^+ -каналов входящего выпрямления (K_{ir}), которые эволюционно близки друг к другу. Входящее выпрямление определяется снижением проводимости мембраны для ионов K^+ при ее деполяризации и увеличением проводимости при реполяризации ее до более отрицательного мембранного потенциала. Без входящего выпрямления проводимость канала для K^+ была бы постоянной. Однако при недостаточном входящем выпрямлении выходящий поток K^+ снижается при

более положительном значении мембранного потенциала по сравнению с равновесным потенциалом для K^+ . При сильно выраженном входящем выпрямлении выходящий поток K^+ может полностью блокироваться при более положительном значении мембранного потенциала. В качестве двух примеров, иллюстрирующих функцию входящего выпрямления, можно привести поддержание отрицательных значений мембранного потенциала покоя и дезактивацию выходящих потоков K^+ , с целью сохранения внутриклеточной концентрации катиона в течение длительной плато фазы потенциала действия в сердечной мышце. K_{ir} каналы пропускают ионы K^+ из покоейшей клетки, но блокируются при деполяризации. Это имеет физиологический смысл, поскольку деполяризация мембраны обусловлена транспортом в клетку ионов Na^+ , а одновременный выход положительно заряженных ионов K^+ прекратил бы или замедлил деполяризацию мембраны.

Каналы подразделяются в соответствии с их способностью к выпрямлению. Проводимость каналов, обладающих сильной способностью к входящему выпрямлению, резко снижается при достижении значения мембранного потенциала выше определенного уровня. В то же время каналы с недостаточным входящим выпрямлением при этом продолжают транспор-

тировать ионы, хотя и с замедленной скоростью. Каналы входящего выпрямления относятся к классу 2ТМ/1Р или 6ТМ/1Р. Каналы с сильной способностью к входящему выпрямлению, например K_{ir} , относятся к классу 2ТМ/1Р классу K^+ -каналов (рис. 2.59). Различные K_{ir} каналы регулируются различными лигандами, например ионами Mg^{2+} , полиаминами, АТФ или тримерными G белками. Пониженный транспорт K^+ через эти каналы при положительном значении потенциала обусловлен блокированием поры со стороны цитоплазмы катионами, например Mg^{2+} , или такими лигандами, как полиамины. В отличие от каналов входящего выпрямления, выходящие каналы, или каналы задержанного выпрямления, относятся к типу 6ТМ/1Р и представляют собой потенциал-зависимые K_v -каналы. Проводимость этих каналов увеличивается по мере деполяризации мембраны при более положительном значении потенциала из-за открытия большего количества каналов. Однако отдельные каналы не обнаруживают способности к выпрямлению. В этом случае говорят об исходящем или задержанном выпрямлении, поскольку активация канала происходит в относительно слабой степени.

Важная роль каналов выпрямления иллюстрируется примером АТФ-чувствительных K^+ -каналов входящего выпрямления (K_{ATP} -каналы). Эти каналы являются связу-

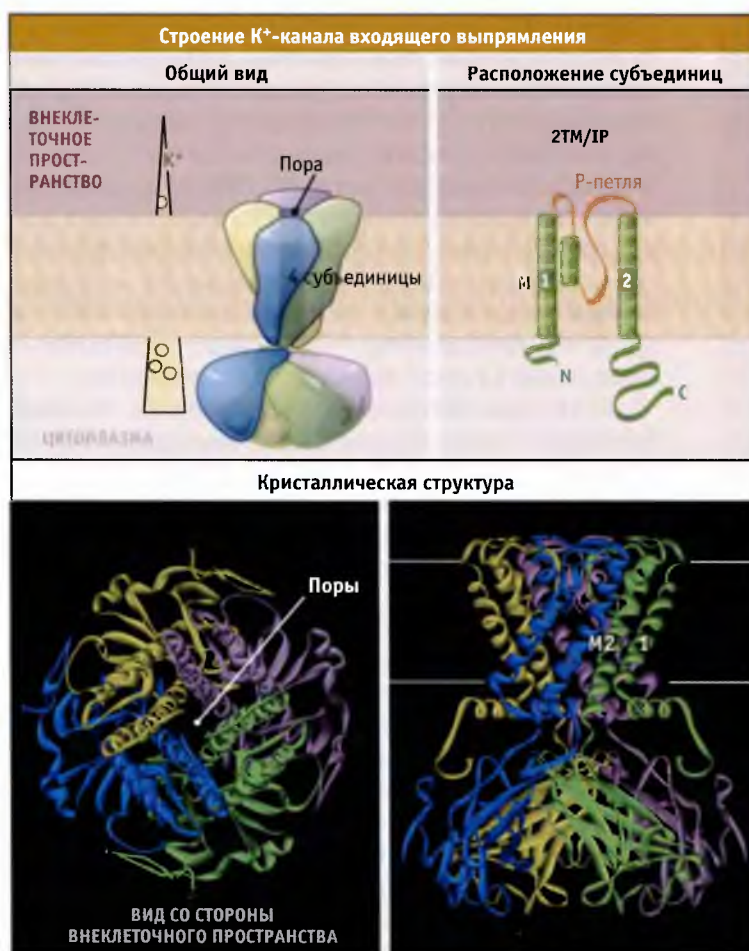


РИС. 2.59. Схематическое строение и кристаллическая структура K^+ -канала входящего выпрямления (K_{ir}). Поро- вый домен по строению близок к домену других K^+ каналов. Кристаллическая структура построена на основании Protein Data Bank file 1P7B. Вид со стороны внеклеточ- ного пространства по масштабу меньше, чем вид сбоку. Обозначено предполагаемое положение мембраны. Слева показан градиент K^+ , существующий в покоейших клет- ках животных

ющим звеном между обменными процессами и электрической активностью клетки. В β -клетках поджелудочной железы, при увеличении концентрации глюкозы и АТФ, K_{ATP} -каналы закрываются, и наступает деполяризация мембраны. При этом запускается процесс секреции инсулина. K_{ATP} -каналы состоят из порообразующих Kir6,2 α -субъединиц и регуляторных субъединиц, функционирующих как метаболический сенсор, контролирующей активность K^+ -канала. Мутации в генах, кодирующих белки субъединиц, нарушают функции K_{ATP} -канала и приводят к постоянной деполяризации мембраны, что сопровождается непрерывной секрецией инсулина, независимо от уровня глюкозы в крови. Такая неконтролируемая секреция инсулина приводит к патологически низкому уровню глюкозы в крови в детском возрасте и к неврологическим расстройствам.

2.26 Приложение: Мутации в генах белков анионного канала вызывают кистозный фиброз

Основные положения

- Кистозный фиброз вызван мутациями в гене, кодирующем каналный белок CFTR
- CFTR представляет собой анионный канал, транспортирующий Cl^- или HCO_3^-
- Нарушение секреторной функции при кистозном фиброзе затрагивает многие органы

Ионные каналы, переносчики и насосы выполняют в клетке много различных функций, нарушение которых служит причиной развития ряда заболеваний. Болезни, развивающиеся при нарушении функционирования ионных каналов, называются *каналопатиями*. Мутации в генах, кодирующих белки ионных каналов, вызывают различные дефекты, которые служат причиной патофизиологических нарушений, наблюдающихся при том или ином заболевании. В предыдущих разделах мы рассматривали различные каналопатии, которые сопровождалась нарушениями транспортной функции почек или секреторной функции различных органов, приводящими к заболеваниям костной, нервной или мышечной ткани, а также к развитию аритмий и к внезапной смерти (см., например, 2.8 *Эпителиальные Na^+ -каналы регулируют гомеостаз Na^+* ; 2.12 *Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов*; 2.13 *Сердечная и скелетные мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения*). В данном разделе мы рассмотрим **кистозный фиброз** (муковисцидоз), который является типичным заболеванием ионных каналов и патогенез которого становится более понятным по мере выяснения причин нарушений транспортных процессов в мембране эпителиальных клеток.

Кистозный фиброз представляет собой одно из наиболее распространенных генетических заболеваний, сопровождающихся смертельным исходом, которое связано с рецессивными мутациями в гене, кодирующем белок анионного канала. Этот канал называется регулятором трансмембранного переноса при кистозном фиброзе (CFTR). Канал функционирует как АТФ-зависимый анионный канал. Белок экспрессируется в апикальной мембране эпителиальных клеток и может фосфорилироваться при участии протеинкиназы А. CFTR является представителем большой группы переносчиков, которые содержат АТФ-связывающую кассету (ABC). ABC-переносчики представляют собой АТФ-зависимые насосы, способные транспортировать через мембрану различные субстраты, например аминокислоты, пептиды, ионы, сахара, токсины, липиды, а также лекарственные препараты. Наряду с кистозным фиброзом, мутации в гене ABC-переносчиков вызывают развитие ряда других заболеваний, например болезни иммунной системы, развитие устойчивости к антибиотикам и противораковым препаратам.

CFTR переносит через мембрану Cl^- или HCO_3^- (рис. 2.26). Транспорт каналами ионов Cl^- продемонстрирован в экспериментах с выделенными и реконструированными каналными белками, заключенными в липосомы. Функционирование CFTR регулируется циклическим АМФ (цАМФ), который представляет собой внутриклеточный вторичный мессенджер. При повышении уровня цАМФ происходит активация протеинкиназы А и фосфорилирование CFTR. При этом активируется транспорт анионов через CFTR. Трансэпителиальный транспорт ионов Cl^- через CFTR-каналы происходит за счет Na^+ -градиента, который поддерживается Na^+/K^+ -АТФазой и эпителиальными Na^+ -каналами (ENaCs), расположенными в апикальной мембране. CFTR-каналы создают входящий ток ионов Cl^- , который вместе с ENaCs обеспечивает электронейтральный транспорт ионов Na^+ и Cl^- через мембрану. Находящийся в базолатеральной мембране $Na^+/K^+/Cl^-$ -котранспортер обеспечивает транспорт в клетку ионов Cl^- после гормональной стимуляции.

CFTR экспрессируются в апикальной мембране различных эпителиальных клеток, включая клетки кишечника, легких, поджелудочной и потовых желез. Для функционирования этих органов необходима секреция жидкости. В легком, например, тонкий слой жидкости, увлажняющей эпителиальные клетки, выстилающие воздухоносные пути, необходим для нормального функционирования ресничек. Последние очищают слизь, которая захватывает из воздуха посторонние частицы и бактерии. Эта жидкость образуется при участии CFTR, и они также контролируют ее состав. У больных кистозным фиброзом слизь отличается повышенной вязкостью, что препятствует ее очистке от патогенов, и поэтому бронхи более подвержены инфекции. В результате накопление вязкой слизи приводит к расстройству дыхания. Блокада вязкой слизи желудочно-кишечного тракта, поджелудочной железы и печени служит причиной расстройства пищеварения и плохого усвоения питательных веществ.

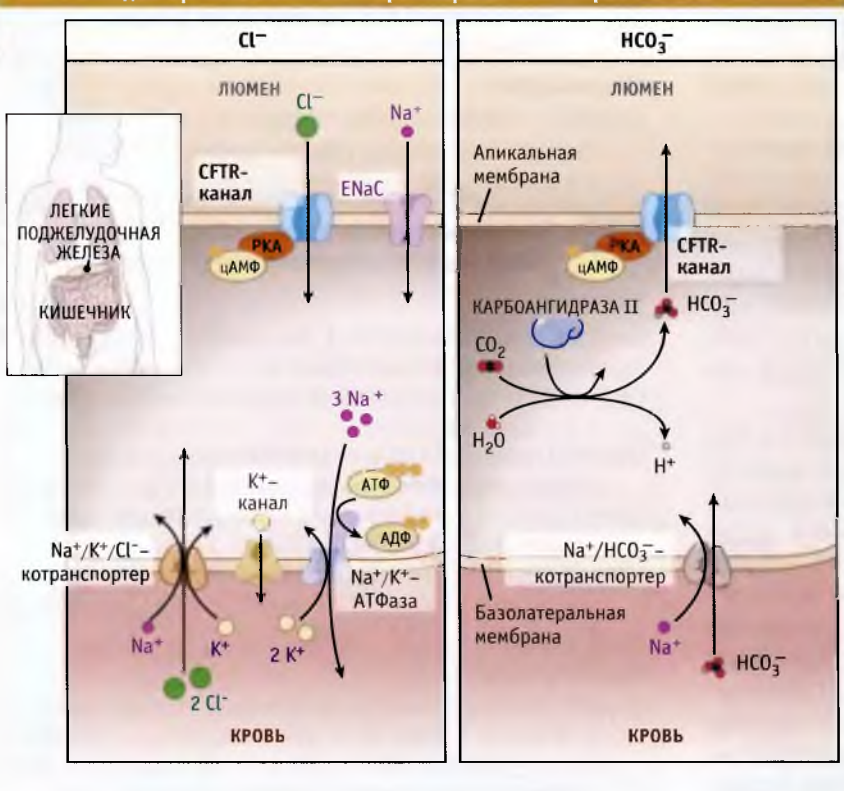


Рис. 2.60. Трансэпителиальный транспорт хлорид и бикарбонат ионов через CFTR-каналы. CFTR функционируют поблизости от эпителиальных Na^+ -каналов (ENaCs) апикальной мембраны и являются их ингибиторами. Снижение функции GFTR приводит к увеличению реабсорбции Na^+ и воды через эпителиальные клетки

Функционирование CFTR при секреции жидкости из апикальной мембраны предполагает, что этот регулятор работает вместе с другими транспортными белками апикальной и базолатеральной мембран эпителиальных клеток (см. рис. 2.60). Функционирование CFTR играет важную роль в секреции жидкости, поскольку транспорт солей (в виде ионов Na^+ и Cl^-) создает осмотическую движущую силу для переноса воды через мембраны.

CFTR-белок содержит две нуклеотид-связывающих складки (NBFs) и уникальный регуляторный домен (R), который находится в цитоплазме, а также два трансмембранных домена (TMDs). Каждый из трансмембранных доменов состоит из шести трансмембранных сегментов, и два домена вместе с доменом, связывающим нуклеотид, образуют тандемную повторяющуюся структуру. Каждый из нуклеотид-связывающих доменов содержит сайт взаимодействия с АТФ, состоящий из фосфат-связывающей петли, образованной мотивом Уолкера А, одинаковым для многих АТФ-связывающих белков, включая F_1F_0 -АТФ-синтазы. С возникновением кистозного фиброза связаны сотни различных мутаций в CFTR гене, но наиболее распространенной является делеция, приводящая к дефектному белку, в котором отсутствует Phe508, обычно расположенный в N-терминальном участке NBF. Из-за дефекта перемещения белок $\text{CFTR}\Delta\text{Phe508}$ не транспортируется к плазматической мембране и остается в эндоплазматическом ретикулуме.

Поскольку CFTR является каналом, ионы транспортируются в направлении электрохимического градиента без

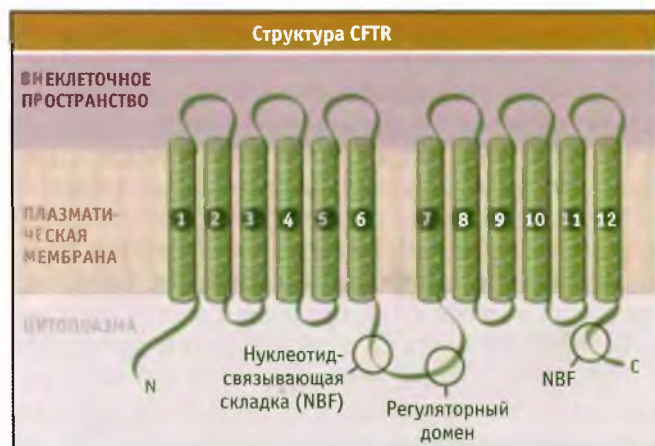


Рис. 2.61. Предполагаемая структура анионного канала, регулятора трансмембранного переноса при кистозном фиброзе (CFTR)

энергетических затрат. Зачем CFTR связывает АТФ? NBC некоторых ABC-переносчиков гидролизует АТФ, и эти переносчики используют энергию гидролиза для транспорта метаболитов через мембрану. Напротив, воротный механизм CFTR, вероятно, регулируется аденилаткиназной активностью, которой обладает C-терминальный участок NBF. Этот фермент катализирует перенос фосфата от АТФ на АМФ с образованием АДФ. Предложен механизм, согласно которому связывание АТФ может вызывать ди-

меризацию NBS и открывать канал, а АДФ, образующийся при действии аденилаткиназы, вызывает диссоциацию NBS и закрытие канала. Мутация CFTR Δ Phe508 нарушает работу канала на участке NBF и препятствует экспрессии его функционально полноценной формы.

Активность CFTR может регулироваться с участием других механизмов. Например, может происходить фосфорилирование регуляторного домена. Наряду с этим, при активации глутаматом может меняться селективность CFTR по отношению к разным анионам. Например, канал может начать пропускать хлорид-ионы и не пропускать HCO_3^- . Таким образом, CFTR, вероятно, функционирует как лиганд-зависимый анионный канал, а не как АТФ-зависимый ионный насос.

При кистозном фиброзе генетический дефект CFTR каналов приводит к нарушению трансэпителиального транспорта, что отражается на процессах секреции анионов и жидкостей в ряде органов. Согласно одной из гипотез, CFTR в основном работают как Cl^- -каналы, которые транспортируют хлорид в клетки, обеспечивая образование низкосолевого жидкости, увлажняющей воздухоносные пути, и ингибирование реабсорбции Na^+ эпителиальными натриевыми каналами. Нарушение секреции через CFTR ионов Cl^- при кистозном фиброзе приводит к поглощению натрия и воды эпителиальными клетками, что снижает объем жидкости, смачивающей воздухоносные пути, увеличивает вязкость и создает препятствия для ее очистки. В зависимости от места мутации в гене CFTR, транспорт анионов может нарушаться в различной степени. Наряду с инфекциями воздухоносных путей, описанными выше, у больных может наблюдаться недостаточная секреция пищеварительных ферментов поджелудочной железы, непроходимость кишечника, бесплодие и усиленная потеря солей через потовые железы. Большинство больных рождаются с недостаточностью поджелудочной железы, приводящей к расстройствам пищеварения и к диарее. Нарушение секреции бикарбоната и жидкости, вызванное мутациями в канале CFTR, приводит к потере функции поджелудочной железы и к прогрессивной деструкции ее ткани. Исследования, проводящиеся в настоящее время, направлены на возможность применения адресных препаратов для лечения дефектных функций CFTR или ENaC и на коррекцию процессов эпителиального транспорта у больных кистозным фиброзом.

Список литературы

2.1 Введение

Обзор

- Hille, B., 2001. *Ion channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Hille, B., Armstrong, C. M., and MacKinnon, R., 1999. Ion channels: from idea to reality. *Nat. Med.* v. 5 p. 1105–1109.

2.2

Основными типами транспортных мембранных белков являются каналы и переносчики

Исследования

- Jentsch, T. J., Hübner, C. A., and Fuhrmann, J. C., 2004. Ion channels: Function unravelled by dysfunction. *Nat. Cell Biol.* v. 6 p. 1039–1047.

2.5

K⁺-каналы обеспечивают избирательный и быстрый транспорт ионов

Обзор

- Berneche, S., and Roux, B., 2001. Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* v. 414 p. 73–77.
- Choe, S., 2002. Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* v. 3 p. 115–121.
- Hille, B., Armstrong, C. M., and MacKinnon, R., 1999. Ion channels: from idea to reality. *Nat. Med.* v. 5 p. 1105–1109.
- Miller, C., 2000. An overview of the potassium channel family. *Genome Biol.* v. 1 p. R0004–R0004.
- Morais-Cabral, J. H., Zhou, Y., and MacKinnon, R., 2001. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* v. 414 p. 37–42.

Исследования

- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R., 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* v. 280 p. 69–77.
- Gutman, G. A., et al., 2003. International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol. Rev.* v. 55 p. 583–586.
- Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R., 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* v. 414 p. 43–48.

2.6

Различные K⁺-каналы используют похожие ворота, которые открываются и закрываются по разным механизмам

Обзор

- Choe, S., 2002. Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* v. 3 p. 115–121.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R., 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* v. 417 p. 523–526.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., and MacKinnon, R., 2003. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* v. 423 p. 42–48.
- Kullmann, D. M., Rea, R., Spauschus, A., and Jouvenceau, A., 2001. The inherited episodic ataxias: how well do we understand the disease mechanisms? *Neuroscientist* v. 7 p. 80–88.
- Tristani-Firouzi, M., and Sanguinetti, M. C., 2003. Structural determinants and biophysical properties of HERG and KCNQ1 channel gating. *J. Mol. Cell. Cardiol.* v. 35 p. 27–35.

Исследования

- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R., 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* v. 417 p. 515–522.
- Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R., 2005. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* v. 309 p. 903–908.

Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R., 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^+ channel. *Science* v. 309 p. 897–903.

Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A., and MacKinnon, R., 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* v. 414 p. 43–48.

2.7 Потенциал-зависимые Na^+ -каналы активируются при деполяризации мембраны и транслируют электрические сигналы

Обзор

Hondeghem, L. M., and Katzung, B. G., 1977. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta* v. 472 p. 373–398.

Vilin, Y. Y., and Ruben, P. C., 2001. Slow inactivation in voltage-gated sodium channels: molecular substrates and contributions to channelopathies. *Cell Biochem. Biophys.* v. 35 p. 171–190.

Yu, F. H., and Catterall, W. A., 2003. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* v. 4 p. 207–207.

Исследования

Chiamvimonvat, N., Pérez-García, M. T., Ranjan, R., Marban, E., and Tomaselli, G. F., 1996. Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na^+ channel revealed by cysteine mutagenesis. *Neuron* v. 16 p. 1037–1047.

Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F., Scheuer, T., and Catterall, W. A., 1995. Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell* v. 83 p. 433–442.

Kellenberger, S., Scheuer, T., and Catterall, W. A., 1996. Movement of the Na^+ channel inactivation gate during inactivation. *J. Biol. Chem.* v. 271 p. 30971–30979.

Mitrovic, N., George, A. L., and Horn, R., 2000. Role of domain 4 in sodium channel slow inactivation. *J. Gen. Physiol.* v. 115 p. 707–718.

Ragsdale, D. S., McPhee, J. C., Scheuer, T., and Catterall, W. A., 1996. Common molecular determinants of local anesthetic, antiarrhythmic, and anticonvulsant block of voltage-gated Na^+ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 93 p. 9270–9275.

Rohl, C. A., Boeckman, F. A., Baker, C., Scheuer, T., Catterall, W. A., and Klevit, R. E., 1999. Solution structure of the sodium channel inactivation gate. *Biochemistry* v. 38 p. 855–861.

Stühmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X. D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., and Numa, S., 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* v. 339 p. 597–603.

2.8 Эпителиальные Na^+ -каналы регулируют гомеостаз Na^+

Обзор

Kellenberger, S., and Schild, L., 2002. Epithelial sodium channel/degnerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol. Rev.* v. 82 p. 735–767.

Исследования

Bruns, J. B., Hu, B., Ahn, Y. J., Sheng, S., Hughey, R. P., and Kleyman, T. R., 2003. Multiple epithelial Na^+ channel domains participate in subunit assembly. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 285 p. F600–F609.

Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D., and Rossier, B. C., 1994. Amiloride-sensitive epithelial Na^+ channel is made of three homologous subunits. *Nature* v. 367 p. 463–467.

Chang, S. S., et al., 1996. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat. Genet.* v. 12 p. 248–253.

Hansson, J. H., Nelson-Williams, C., Suzuki, H., Schild, L., Shimkets, R., Lu, Y., Canessa, C., Iwasaki, T., Rossier, B., and Lifton, R. P., 1995. Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat. Genet.* v. 11 p. 76–82.

Palmer, L. G., and Andersen, O. S., 1989. Interactions of amiloride and small monovalent cations with the epithelial sodium channel. Inferences about the nature of the channel pore. *Biophys. J.* v. 55 p. 779–787.

Reif, M. C., Troutman, S. L., and Schafer, J. A., 1986. Sodium transport by rat cortical collecting tubule. Effects of vasopressin and desoxycorticosterone. *J. Clin. Invest.* v. 77 p. 1291–1298.

2.9 Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны активируют внутриклеточные функции

Обзор

Carafoli, E., 2003. The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 4 p. 326–332.

Sather, W. A., and McCleskey, E. W., 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 65 p. 133–159.

Исследования

Ellinor, P. T., Yang, J., Sather, W. A., Zhang, J. F., and Tsien, R. W., 1995. Ca^{2+} channel selectivity at a single locus for high-affinity Ca^{2+} interactions. *Neuron* v. 15 p. 1121–1132.

Erickson, M. G., Liang, H., Mori, M. X., and Yue, D. T., 2003. FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca^{2+} channel CaM preassociation. *Neuron* v. 39 p. 97–107.

Hess, P., and Tsien, R. W., 1984. Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* v. 309 p. 453–456.

Liang, H., DeMaria, C. D., Erickson, M. G., Mori, M. X., Alseikhan, B. A., and Yue, D. T., 2003. Unified mechanisms of Ca^{2+} regulation across the Ca^{2+} channel family. *Neuron* v. 39 p. 951–960.

Lipkind, G. M., and Fozzard, H. A., 2003. Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca^{2+} channel. *Mol. Pharmacol.* v. 63 p. 499–511.

Serysheva, I. I., Ludtke, S. J., Baker, M. R., Chiu, W., and Hamilton, S. L., 2002. Structure of the voltage-gated L-type Ca^{2+} channel by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 99 p. 10370–10375.

Wu, X. S., Edwards, H. D., and Sather, W. A., 2000. Side chain orientation in the selectivity filter of a voltage-gated Ca^{2+} channel. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 31778–31785.

Yang, J., Ellinor, P. T., Sather, W. A., Zhang, J. F., and Tsien, R. W., 1993. Molecular determinants of Ca^{2+} selectivity and ion permeation in L-type Ca^{2+} channels. *Nature* v. 366 p. 158–161.

2.10 Cl^- -каналы выполняют различные биологические функции

Обзор

Bretag, A. H., 1987. Muscle chloride channels. *Physiol. Rev.* v. 67 p. 618–724.

Ellison, D. H., 2000. Divalent cation transport by the distal nephron: insights from Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 279 p. F616–F625.

Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., and Zdebik, A. A., 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* v. 82 p. 503–568.

Исследования

Accardi, A., and Miller, C., 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl⁻ channels. *Nature* v. 427 p. 803–807.

Birkenhäger, R., et al., 2001. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat. Genet.* v. 29 p. 310–314.

Dutzler, R., Campbell, E. B., and MacKinnon, R., 2003. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* v. 300 p. 108–112.

Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., and MacKinnon, R., 2002. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* v. 415 p. 287–294.

Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H., and Jentsch, T. J., 1992. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* v. 257 p. 797–800.

Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., and Jentsch, T. J., 2001. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* v. 104 p. 205–215.

Lloyd, S. E., et al., 1996. A common molecular basis for three inherited kidney stone diseases. *Nature* v. 379 p. 445–449.

Miller, C., and White, M. M., 1984. Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 81 p. 2772–2775.

Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A., and Jentsch, T. J., 1995. Gating of the voltage-dependent chloride channel ClC-0 by the permeant anion. *Nature* v. 373 p. 527–531.

Simon, D. B., et al., 1997. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* v. 17 p. 171–178.

2.11 Селективный транспорт воды происходит через аквапориновые каналы

Обзор

Lehmann, G. L., Gradilone, S. A., and Marinelli, R. A., 2004. Aquaporin water channels in central nervous system. *Curr. Neurovasc. Res.* v. 1 p. 293–303.

Nielsen, S., Frøkiær, J., Marples, D., Kwon, T. H., Agre, P., and Knepper, M. A., 2002. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol. Rev.* v. 82 p. 205–244.

Valenti, G., Procino, G., Tamma, G., Carmosino, M., and Svelto, M., 2005. MiniОбзор: aquaporin 2 trafficking. *Endocrinology* v. 146 p. 5063–5070.

Verkman, A. S., 2005. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* v. 118 p. 3225–3232.

Исследования

Deen, P. M., Verdijk, M. A., Knoers, N. V., Wieringa, B., Monnens, L. A., van Os, C. H., and van Oost, B. A., 1994. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* v. 264 p. 92–95.

Harries, W. E., Akhavan, D., Miercke, L. J., Khademi, S., and Stroud, R. M., 2004. The channel architecture of aquaporin-0 at a 2.2 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 101 p. 14045–14050.

Jung, J. S., Preston, G. M., Smith, B. L., Guggino, W. B., and Agre, P., 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J. Biol. Chem.* v. 269 p. 14648–14654.

King, L. S., Choi, M., Fernandez, P. C., Cartron, J. P., and Agre, P., 2001. Defective urinary-concentrating ability due to a complete deficiency of aquaporin-1. *N. Engl. J. Med.* v. 345 p. 175–179.

Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., and Fujiyoshi, Y., 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* v. 407 p. 599–605.

Smith, B. L., and Agre, P., 1991. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *J. Biol. Chem.* v. 266 p. 6407–6415.

Sui, H., Han, B. G., Lee, J. K., Walian, P., and Jap, B. K., 2001. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* v. 414 p. 872–878.

Zeidel, M. L., Ambudkar, S. V., Smith, B. L., and Agre, P., 1992. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* v. 31 p. 7436–7440.

2.12 Потенциал действия представляет собой электрический сигнал, который зависит от нескольких типов ионных каналов

Обзор

Carmeliet, E., 2004. Intracellular Ca(2+) concentration and rate adaptation of the cardiac action potential. *Cell Calcium* v. 35 p. 557–573.

Keating, M. T., and Sanguinetti, M. C., 2001. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* v. 104 p. 569–580.

Nichols, C. G., and Lopatin, A. N., 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 59 p. 171–191.

Sah, R., Ramirez, R. J., Oudit, G. Y., Gidrewicz, D., Trivieri, M. G., Zobel, C., and Backx, P. H., 2003. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling by action potential repolarization: role of the transient outward potassium current (Ito). *J. Physiol.* v. 546 p. 5–18.

Исследования

Bennett, P. B., Yazawa, K., Makita, N., and George, A. L., 1995. Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* v. 376 p. 683–685.

Chen, Q., et al., 1998. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* v. 392 p. 293–296.

Curran, M. E., Splawski, I., Timothy, K. W., Vincent, G. M., Green, E. D., and Keating, M. T., 1995. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* v. 80 p. 795–803.

Hodgkin, A. L., and Huxley, A. F., 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* v. 117 p. 500–544.

Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., 1952. Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. *Proc. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 140 p. 177–183.

- Hodgkin, A. L. and Huxley, A. F., 1952. Movement of sodium and potassium ions during nervous activity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* v. 17 p. 43–52.
- Lossin, C., Wang, D. W., Rhodes, T. H., Vanoye, C. G., and George, A. L., 2002. Molecular basis of an inherited epilepsy. *Neuron* v. 34 p. 877–884.
- Schott, J. J., Alshinawi, C., Kyndt, F., Probst, V., Hoorntje, T. M., Hulsbeek, M., Wilde, A. A., Escande, D., Mannens, M. M., and Le Marec, H., 1999. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat. Genet.* v. 23 p. 20–21.
- Splawski, I., et al., 2004. Ca(V)_{1.2} calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* v. 119 p. 19–31.
- Wang, Q., Shen, J., Splawski, I., Atkinson, D., Li, Z., Robinson, J. L., Moss, A. J., Towbin, J. A., and Keating, M. T., 1995. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* v. 80 p. 805–811.
- 2.13 Сердечная и скелетная мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения**
- Обзор**
- Berchtold, M. W., Brinkmeier, H., and Müntener, M., 2000. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol. Rev.* v. 80 p. 1215–1265.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 4 p. 517–529.
- Bers, D. M., 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* v. 415 p. 198–205.
- da Fonseca, P. C., Morris, S. A., Nerou, E. P., Taylor, C. W., and Morris, E. P., 2003. Domain organization of the type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor as revealed by single-particle analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 100 p. 3936–3941.
- Rizzuto, R., and Pozzan, T., 2006. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* v. 86 p. 369–408.
- Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., and Marks, A. R., 2005. Intracellular calcium release and cardiac disease. *Annu. Rev. Physiol.* v. 67 p. 69–98.
- Исследования**
- Campbell, K. P., Knudson, C. M., Imagawa, T., Leung, A. T., Suiko, J. L., Kahl, S. D., Raab, C. R., and Madson, L., 1987. Identification and characterization of the high affinity [3H]ryanodine receptor of the junctional sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel. *J. Biol. Chem.* v. 262 p. 6460–6463.
- Lehnart, S. E., Wehrens, X. H., Reiken, S., Warriar, S., Belevych, A. E., Harvey, R. D., Richter, W., Jin, S. L., Conti, M., and Marks, A. R., 2005. Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* v. 123 p. 25–35.
- Marx, S. O., Reiken, S., Hisamatsu, Y., Jayaraman, T., Burkhoff, D., Rosemblyt, N., and Marks, A. R., 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* v. 101 p. 365–376.
- Sharma, M. R., Penczek, P., Grassucci, R., Xin, H. B., Fleischer, S., and Wagenknecht, T., 1998. Cryoelectron microscopy and image analysis of the cardiac ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* v. 273 p. 18429–18434.
- Tanabe, T., Beam, K. G., Adams, B. A., Niidome, T., and Numa, S., 1990. Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* v. 346 p. 567–569.
- Wehrens, X. H., Lehnart, S. E., Reiken, S. R., Deng, S. X., Vest, J. A., Cervantes, D., Coromilas, J., Landry, D. W., and Marks, A. R., 2004. Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science* v. 304 p. 292–296.
- Wehrens, X. H. et al., 2003. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell* v. 113 p. 829–840.
- 2.14 Некоторые белки осуществляют перенос глюкозы за счет унипортного транспорта**
- Обзор**
- Devaskar, S. U., and Mueckler, M. M., 1992. The mammalian glucose transporters. *Pediatr. Res.* v. 31 p. 1–13.
- Kahn, B. B., 1992. Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J. Clin. Invest.* v. 89 p. 1367–1374.
- Saier, M. H., 2000. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* v. 35 p. 699–710.
- Vannucci, S. J., Maher, F., and Simpson, I. A., 1997. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* v. 21 p. 2–21.
- Исследования**
- Heilig, C. W., Saunders, T., Brosius, F. C., Moley, K., Heilig, K., Baggs, R., Guo, L., and Conner, D., 2003. Glucose transporter-1-deficient mice exhibit impaired development and deformities that are similar to diabetic embryopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 100 p. 15613–15618.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., and Lodish, H. F., 1985. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* v. 229 p. 941–945.
- Mueckler, M., and Makepeace, C., 2004. Analysis of transmembrane segment 8 of the GLUT1 glucose transporter by cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility. *J. Biol. Chem.* v. 279 p. 10494–10499.
- Seidner, G., Alvarez, M. G., Yeh, J. I., O'Driscoll, K. R., Klepper, J., Stump, T. S., Wang, D., Spinner, N. B., Birnbaum, M. J., and De Vivo, D. C., 1998. GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat. Genet.* v. 18 p. 188–191.
- Shigematsu, S., Watson, R. T., Khan, A. H., and Pessin, J. E., 2003. The adipocyte plasma membrane caveolin functional/structural organization is necessary for the efficient endocytosis of GLUT4. *J. Biol. Chem.* v. 278 p. 10683–10690.
- 2.15 Сопряженный транспорт осуществляется за счет процессов симпорта и антипорта**
- Обзор**
- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Iwata, S., and Kaback, H. R., 2003. The lactose permease of *Escherichia coli*: overall structure, the sugar-binding site and the alternating access model for transport. *FEBS Lett.* v. 555 p. 96–101.
- Kaback, H. R., Sahin-Tóth, M., and Weinglass, A. B., 2001. The kamikaze approach to membrane transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 610–620.

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H. R., and Iwata, S., 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* v. 301 p. 610–615.
- Huang, Y., Lemieux, M. J., Song, J., Auer, M., and Wang, D. N., 2003. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* v. 301 p. 616–620.
- Jardetzky, O., 1966. Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature* v. 211 p. 969–970.

2.16 Для функционирования многих переносчиков необходимо существование трансмембранного градиента ионов Na^+

Обзор

- Blaustein, M. P., and Lederer, W. J., 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* v. 79 p. 763–854.
- Ellison, D. H., 2000. Divalent cation transport by the distal nephron: insights from Bartter's and Gitelman's syndromes. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 279 p. F616–F625.
- Kaplan, M. R., Mount, D. B., and Delpire, E., 1996. Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu. Rev. Physiol.* v. 58 p. 649–668.
- Rasgado-Flores, H., and Gonzalez-Serratos, H., 2000. Plasmalemmal transport of magnesium in excitable cells. *Front. Biosci.* v. 5 p. D866–D879.
- Webel, R., Haug-Collet, K., Pearson, B., Szerencsei, R. T., Winkfein, R. J., Schnetkamp, P. P., and Colley, N. J., 2002. Potassium-dependent sodium-calcium exchange through the eye of the fly. *Ann. NY Acad. Sci.* v. 976 p. 300–314.

Исследования

- Haug-Collet, K., Pearson, B., Webel, R., Szerencsei, R. T., Winkfein, R. J., Schnetkamp, P. P., and Colley, N. J., 1999. Cloning and characterization of a potassium-dependent sodium/calcium exchanger in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* v. 147 p. 659–670.
- Nicoll, D. A., Ottolia, M., Lu, L., Lu, Y., and Philipson, K. D., 1999. A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchanger. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 910–917.
- Simon, D. B., Karet, F. E., Hamdan, J. M., DiPietro, A., Sanjad, S. A., and Lifton, R. P., 1996. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2 . *Nat. Genet.* v. 13 p. 183–188.
- Simon, D. B., Karet, F. E., Rodriguez-Soriano, J., Hamdan, J. H., DiPietro, A., Trachtman, H., Sanjad, S. A., and Lifton, R. P., 1996. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K^+ channel, ROMK. *Nat. Genet.* v. 14 p. 152–156.
- Simon, D. B., et al., 1997. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB , cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* v. 17 p. 171–178.
- Simon, D. B., et al., 1996. Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat. Genet.* v. 12 p. 24–30.

2.17 Некоторые переносчики Na^+ регулируют pH в цитозоле и во внеклеточной среде

Обзор

- Bobulescu, I. A., Di Sole, F., and Moe, O. W., 2005. Na^+ / H^+ exchangers: physiology and link to hypertension and organ ischemia. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* v. 14 p. 485–494.

- Fliegel, L., and Karmazyn, M., 2004. The cardiac Na-H exchanger: a key downstream mediator for the cellular hypertrophic effects of paracrine, autocrine and hormonal factors. *Biochem. Cell Biol.* v. 82 p. 626–635.
- Gross, E., and Kurtz, I., 2002. Structural determinants and significance of regulation of electrogenic Na^+ - HCO_3^- cotransporter stoichiometry. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* v. 283 p. F876–F887.
- Wakabayashi, S., Shigekawa, M., and Pouyssegur, J., 1997. Molecular physiology of vertebrate Na^+ / H^+ exchangers. *Physiol. Rev.* v. 77 p. 51–74.
- Zachos, N. C., Tse, M., and Donowitz, M., 2005. Molecular physiology of intestinal Na^+ / H^+ exchange. *Annu. Rev. Physiol.* v. 67 p. 411–443.

Исследования

- Akiba, Y., Furukawa, O., Guth, P. H., Engel, E., Nastaskin, I., Sassani, P., Dukkupatis, R., Pushkin, A., Kurtz, I., and Kaunitz, J. D., 2001. Cellular bicarbonate protects rat duodenal mucosa from acid-induced injury. *J. Clin. Invest.* v. 108 p. 1807–1816.
- Hunte, C., Screpanti, E., Venturi, M., Rimon, A., Padan, E., and Michel, H., 2005. Structure of a Na^+ / H^+ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. *Nature* v. 435 p. 1197–1202.
- Orlowski, J., and Grinstein, S., 2004. Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch.* v. 447 p. 549–565.
- Williams, K. A., 2000. Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature* v. 403 p. 112–115.

2.18 Ca^{2+} -АТФаза закачивает Ca^{2+} во внутриклеточные депо

Обзор

- Belke, D. D., and Dillmann, W. H., 2004. Altered cardiac calcium handling in diabetes. *Curr. Hypertens. Rep.* v. 6 p. 424–429.
- Green, N. M., and MacLennan, D. H., 2002. Calcium callisthenics. *Nature* v. 418 p. 598–599.
- Kühlbrandt, W., 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 5 p. 282–295.
- Laporte, R., Hui, A., and Laher, I., 2004. Pharmacological modulation of sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* v. 56 p. 439–513.
- Stokes, D. L., and Green, N. M., 2003. Structure and function of the calcium pump. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v. 32 p. 445–468.
- Strehler, E. E., and Treiman, M., 2004. Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr. Mol. Med.* v. 4 p. 323–335.
- Sweadner, K. J., and Donnet, C., 2001. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA , the Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* v. 356 p. 685–704.
- Verkhatsky, A., 2004. Endoplasmic reticulum calcium signaling in nerve cells. *Biol. Res.* v. 37 p. 693–699.

Исследования

- Sørensen, T. L., Møller, J. V., and Nissen, P., 2004. Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump. *Science* v. 304 p. 1672–1675.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., and Ogawa, H., 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* v. 405 p. 647–655.
- Toyoshima, C., and Nomura, H., 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* v. 418 p. 605–611.

2.19 **Na⁺/K⁺-АТФаза поддерживает градиент концентрации Na⁺ и K⁺ через плазматическую мембрану**

Обзор

- Glitsch, H. G., 2001. Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. *Physiol. Rev.* v. 81 p. 1791–1826.
- Horisberger, J. D., 2004. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiology (Bethesda)* v. 19 p. 377–387.
- Kühlbrandt, W., 2004. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 5 p. 282–295.
- Rakowski, R. F., and Sagar, S., 2003. Found: Na⁺ and K⁺ binding sites of the sodium pump. *News Physiol. Sci.* v. 18 p. 164–168.
- Sweadner, K. J., and Donnet, C., 2001. Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca²⁺-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Biochem. J.* v. 356 p. 685–704.

Исследования

- Hilge, M., Siegal, G., Vuister, G. W., Güntert, P., Gloor, S. M., and Abrahams, J. P., 2003. ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nat. Struct. Biol.* v. 10 p. 468–474.
- Rice, W. J., Young, H. S., Martin, D. W., Sachs, J. R., and Stokes, D. L., 2001. Structure of Na⁺,K⁺-ATPase at 11-Å resolution: comparison with Ca²⁺-ATPase in E1 and E2 states. *Biophys. J.* v. 80 p. 2187–2197.
- Toyoshima, C., and Nomura, H., 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. *Nature* v. 418 p. 605–611.

2.20 **F₁F₀-АТФ-синтаза вызывает сопряжение движения H⁺ с синтезом или гидролизом АТФ**

Обзор

- Senior, A. E., Nadanaciva, S., and Weber, J., 2002. The molecular mechanism of ATP synthesis by F₁F₀-ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1553 p. 188–211.

Исследования

- Bernal, R. A. and Stock, D., 2004. Three-dimensional structure of the intact *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase by electron microscopy. *Structure (Camb)* v. 12 p. 1789–1798.
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinosita, K., 2004. Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase. *Nature* v. 427 p. 465–468.
- Senior, A. E. and Weber, J., 2004. Happy motoring with ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* v. 11 p. 110–112.
- Stock, D., Leslie, A. G., and Walker, J. E., 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* v. 286 p. 1700–1705.

2.21 **H⁺-АТФазы переносят протоны из цитозоля**

Обзор

- Bajjalieh, S., 2005. A new view of an old pore. *Cell* v. 121 p. 496–497.
- Brown, D., and Breton, S., 2000. H(+)V-ATPase-dependent luminal acidification in the kidney collecting duct and the epididymis/vas deferens: vesicle recycling and transcytotic pathways. *J. Exp. Biol.* v. 203 p. 137–145.

- Fillingame, R. H., Jiang, W., and Dmitriev, O. Y., 2000. Coupling H(+) transport to rotary catalysis in F-type ATP synthases: structure and organization of the transmembrane rotary motor. *J. Exp. Biol.* v. 203 Pt 1 p. 9–17.
- Grüber, G., Wiczorek, H., Harvey, W. R., and Müller, V., 2001. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* v. 204 p. 2597–2605.
- Karet, F. E., 2002. Monogenic tubular salt and acid transporter disorders. *J. Nephrol.* v. 15 Suppl 6 p. S57–S68.
- Nishi, T., and Forgac, M., 2002. The vacuolar (H⁺)-ATPases—nature's most versatile proton pumps. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 94–103.
- Stevens, T. H., and Forgac, M., 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 779–808.
- Vik, S. B., Long, J. C., Wada, T., and Zhang, D., 2000. A model for the structure of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase and its role in proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1458 p. 457–466.

Исследования

- Arai, H., Terres, G., Pink, S., and Forgac, M., 1988. Topography and subunit stoichiometry of the coated vesicle proton pump. *J. Biol. Chem.* v. 263 p. 8796–8802.
- Kane, P. M., 1995. Disassembly and reassembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase in vivo. *J. Biol. Chem.* v. 270 p. 17025–17032.
- Smith, A. N., Lovering, R. C., Futai, M., Takeda, J., Brown, D., and Karet, F. E., 2003. Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H⁺-ATPase subunit genes. *Mol. Cell* v. 12 p. 801–803.
- Vasilyeva, E., Liu, Q., MacLeod, K. J., Baleja, J. D., and Forgac, M., 2000. Cysteine scanning mutagenesis of the noncatalytic nucleotide binding site of the yeast V-ATPase. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 255–260.
- Wilkens, S., Vasilyeva, E., and Forgac, M., 1999. Structure of the vacuolar ATPase by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 31804–31810.

2.22 **Что дальше?**

Обзор

- Multiple authors, 2004. The state of ion channel Исследования in 2004. *Nat. Rev. Drug Discov.* v. 3 p. 239–278.

2.25 **Приложение: Большинство K⁺-каналов способны обеспечивать входящее выпрямление**

Обзор

- Ashcroft, F. M., 1988. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu. Rev. Neurosci.* v. 11 p. 97–118.
- Ashcroft, F. M., and Gribble, F. M., 1999. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* v. 42 p. 903–919.
- Bichet, D., Haass, F. A., and Jan, L. Y., 2003. Merging functional studies with structures of inward-rectifier K⁺ channels. *Nat. Rev. Neurosci.* v. 4 p. 957–967.
- Campbell, J. D., Sansom, M. S., and Ashcroft, F. M., 2003. Potassium channel regulation. *EMBO Rep.* v. 4 p. 1038–1042.
- Dhamoon, A. S., and Jalife, J., 2005. The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* v. 2 p. 316–324.

Lu, Z., 2004. Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 66 p. 103–129.

Nichols, C. G., and Lopatin, A. N., 1997. Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 59 p. 171–191.

Исследования

Kuo, A., Gulbis, J. M., Antcliff, J. F., Rahman, T., Lowe, E. D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F. M., Ezaki, T., and Doyle, D. A., 2003. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* v. 300 p. 1922–1926.

Liu, Y., Jurman, M. E., and Yellen, G., 1996. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating. *Neuron* v. 16 p. 859–867.

Reimann, F., Huopio, H., Dabrowski, M., Proks, P., Gribble, F. M., Laakso, M., Otonkoski, T., and Ashcroft, F. M., 2003. Characterisation of new KATP-channel mutations associated with congenital hyperinsulinism in the Finnish population. *Diabetologia* v. 46 p. 241–249.

2.26 Приложение: Мутации в генах белков анионного канала вызывают кистозный фиброз

Обзор

Higgins, C. F., 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Res. Microbiol.* v. 152 p. 205–210.

Riordan, J. R., 2005. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu. Rev. Physiol.* v. 67 p. 701–718.

Sheppard, D. N., and Welsh, M. J., 1999. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* v. 79 p. S23–S45.

Sliker, M. G., Sanders, E. A., Rijkers, G. T., Ruven, H. J., and van der Ent, C. K., 2005. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* v. 4 Suppl 2 p. 7–13.

Steward, M. C., Ishiguro, H., and Case, R. M., 2005. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu. Rev. Physiol.* v. 67 p. 377–409.

Исследования

Bear, C. E., Li, C. H., Kartner, N., Bridges, R. J., Jensen, T. J., Ramjessingh, M., and Riordan, J. R., 1992. Purification

and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* v. 68 p. 809–818.

Bishop, L., Agbayani, R., Ambudkar, S. V., Maloney, P. C., and Ames, G. F., 1989. Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 86 p. 6953–6957.

Chang, G., and Roth, C. B., 2001. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* v. 293 p. 1793–1800.

Knowles, M. R., Stutts, M. J., Spock, A., Fischer, N., Gatzky, J. T., and Boucher, R. C., 1983. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* v. 221 p. 1067–1070.

Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O'Neal, W. K., and Boucher, R. C., 2004. Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat. Med.* v. 10 p. 487–493.

Quinton, P. M., 1983. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* v. 301 p. 421–422.

Randak, C., and Welsh, M. J., 2003. An intrinsic adenylate kinase activity regulates gating of the ABC transporter CFTR. *Cell* v. 115 p. 837–850.

Reddy, M. M., Light, M. J., and Quinton, P. M., 1999. Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl[−] channel function. *Nature* v. 402 p. 301–304.

Reddy, M. M., and Quinton, P. M., 2003. Control of dynamic CFTR selectivity by glutamate and ATP in epithelial cells. *Nature* v. 423 p. 756–760.

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., and Chou, J. L., 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* v. 245 p. 1066–1073.

Wang, X. F., et al., 2003. Involvement of CFTR in uterine bicarbonate secretion and the fertilizing capacity of sperm. *Nat. Cell Biol.* v. 5 p. 902–906.

Мембранное адресование белков

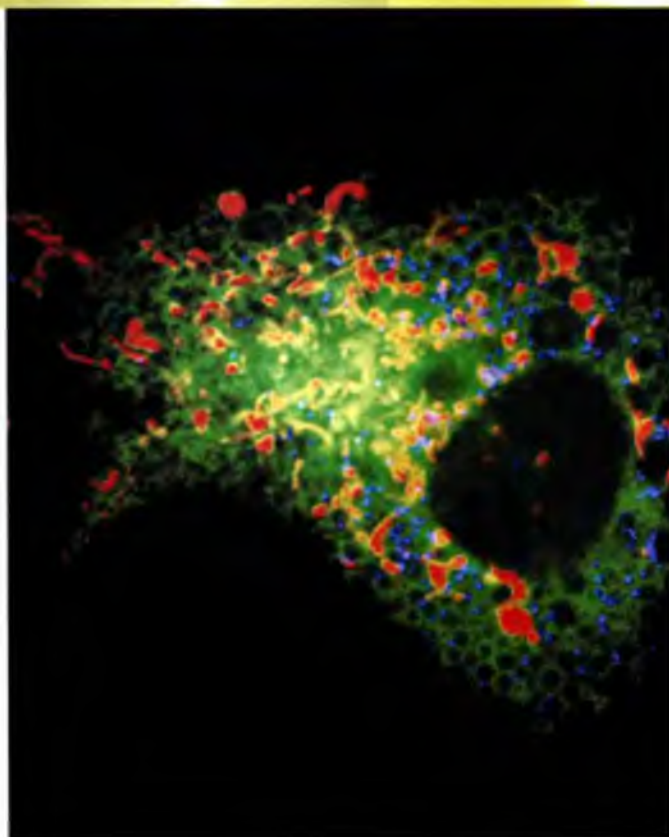
Д. Томас Рутковский

Медицинский институт им. Г. Хьюза,
Медицинский центр Мичиганского университета

Вишванат Р. Лингаппа

Исследовательский институт Калифорнийского
Тихоокеанского медицинского центра

Микрофотография нативного (живого) фибробласта, сделанная с помощью флуоресцентного микроскопа. Показаны ЭПР (зеленым цветом), митохондрии (красным цветом) и пероксисомы (синим цветом). Одновременно в клетке экспрессируются три флуоресцирующих белка, и каждый из них несет свой адресный сигнал, который направляет белок к специфической органелле. С разрешения Холджера Лоренца Лаборатория Липпикот–Шварц Национальный институт здравоохранения



КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛАВЫ

- 3.1 Введение
- 3.2 Белки вступают на путь секреции путем переноса через мембрану ЭПР
- 3.3 Перед переносом белки связываются с ЭПР с помощью сигнальной последовательности
- 3.4 Сигнальные последовательности узнаются частицей, распознающей сигнал (SRP)
- 3.5 Закрепление белков на мембране ЭПР обеспечивается взаимодействием между SRP и ее рецептором
- 3.6 Транслокон представляет собой водный канал, который пропускает белки
- 3.7 Для большинства секреторных и трансмембранных белков эукариот трансляция сопряжена с транслокацией
- 3.8 Для некоторых белков адресование и транслокация происходят после трансляции
- 3.9 Транслокация происходит за счет энергии гидролиза АТФ
- 3.10 Трансмембранные белки выходят из канала транслокации и входят в липидный бислой
- 3.11 Ориентация трансмембранных белков определяется способом их интеграции в мембрану
- 3.12 Сигнальные последовательности удаляются сигнальной пептидазой
- 3.13 К некоторым транслоцированным белкам добавляется гликолипидная группа ГФИ
- 3.14 В процессе переноса ко многим белкам добавляются сахарные остатки
- 3.15 Шапероны способствуют сворачиванию вновь транслоцированных белков
- 3.16 При сворачивании белковой молекулы образование правильно ориентированных дисульфидных связей обеспечивается протеиндисульфидизомеразой
- 3.17 Модифицированные остатки углеводов узнаются системой шаперонов кальнексин/кальретикулин
- 3.18 Сборка белков в комплексы находится под контролем
- 3.19 Неправильно свернутые белки ЭПР поступают в цитозоль, где подвергаются деградации
- 3.20 Взаимодействие между ЭПР и ядром предотвращает накопление в люмене несвернутых белков
- 3.21 В ЭПР образуются основные клеточные фосфолипиды
- 3.22 Липиды должны перемещаться с ЭПР на мембраны других органелл
- 3.23 Два слоя мембраны часто различаются по составу липидов
- 3.24 Морфологически и функционально ЭПР подразделяется на ряд отделов
- 3.25 ЭПР представляет собой динамическую органеллу
- 3.26 Сигнальные последовательности также используются для транспорта белков в другие органеллы
- 3.27 Импорт белков в митохондрии начинается с узнавания сигнальной последовательности на внешней мембране
- 3.28 В транспорте митохондриальных белков совместно участвуют комплексы, расположенные на внутренней и наружной мембранах
- 3.29 Поступающие в хлоропласты белки также должны пройти через две мембраны
- 3.30 Белки сворачиваются перед импортом в пероксисомы
- 3.31 Что дальше?
- 3.32 Резюме
- Список литературы

3.1 Введение

Основные положения

- В клетке белки должны быть локализованы в сигнальных органеллах и мембранах
- Белки непосредственно поступают из цитозоля в несколько типов органелл
- Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) представляет собой исходный компартмент, откуда белки вступают на путь секреции. ЭПР приспособлен к выполнению этой функции
- В некоторые органеллы и в плазматическую мембрану белки поступают по секреторному пути

Способность взаимодействовать с окружающей средой и реагировать на ее изменения имеет критическое значение для выживания и нормального функционирования клетки. В окружающей многоклеточный организм среде находятся питательные вещества, факторы роста, гормоны и другие метаболиты, под действием которых клетка может разделиться, вступить на путь дифференцировки или запрограммированной гибели. Клетка должна чувствовать изменения в составе компонентов окружающей среды и реагировать на них соответствующим образом. В зависимости от своих нужд клетки меняют окружение. Так, они могут секретировать белки, которые используются для построения или разрушения внеклеточного матрикса; могут передавать сиг-

налы соседним клеткам при прямом контакте; а в многоклеточном организме некоторые клетки (например, эндокринные) секретируют гормоны, которые оказывают дистанционный эффект на другие клетки.

Основными посредниками клетки во взаимодействии с окружающей средой являются секреторные и трансмембранные белки. Эти белки синтезируются каждой клеткой, начиная от простейших бактерий до высокодифференцированных и специализированных клеток млекопитающих. Секреторные белки выходят во внеклеточную среду, а трансмембранные белки остаются в плазматической мембране, причем одна их часть контактирует с внешней средой, а другая остается внутри клетки.

Необходимость полного или частичного транспорта некоторых белков через плазматическую мембрану создает для клетки проблему их отбора. В клетке белки образуются на рибосомах, в цитоплазме. Поэтому должен существовать механизм селективного отбора и транспорта к плазматической мембране только секреторных и трансмембранных белков. У бактерий селективный отбор при транспорте происходит только на белки, входящие в состав плазматической мембраны и не входящие в нее. В клетках эукариот проблема носит более сложный характер. В то время, как типичная прокариотическая клетка имеет плазма-

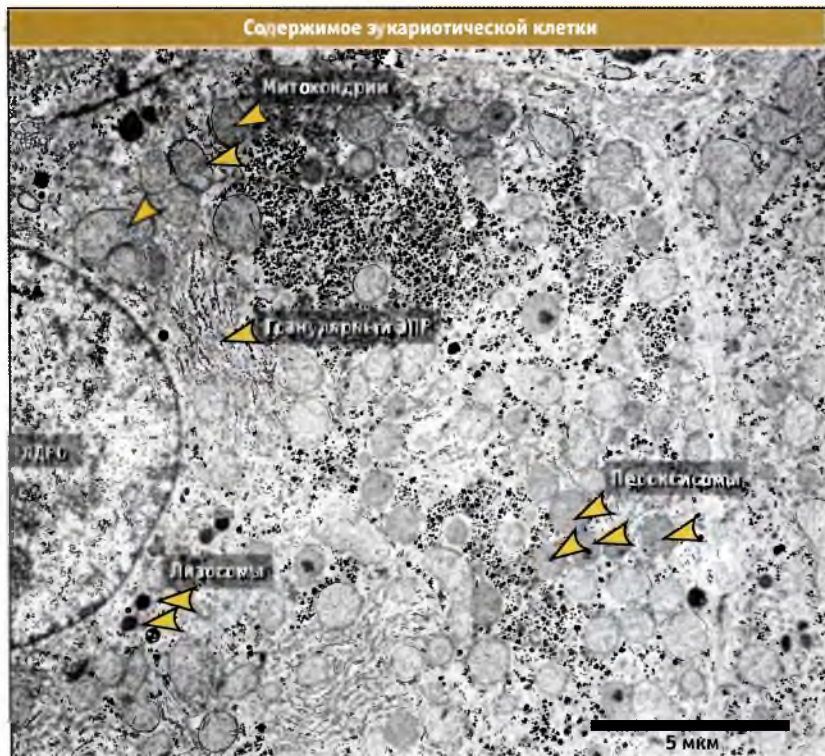


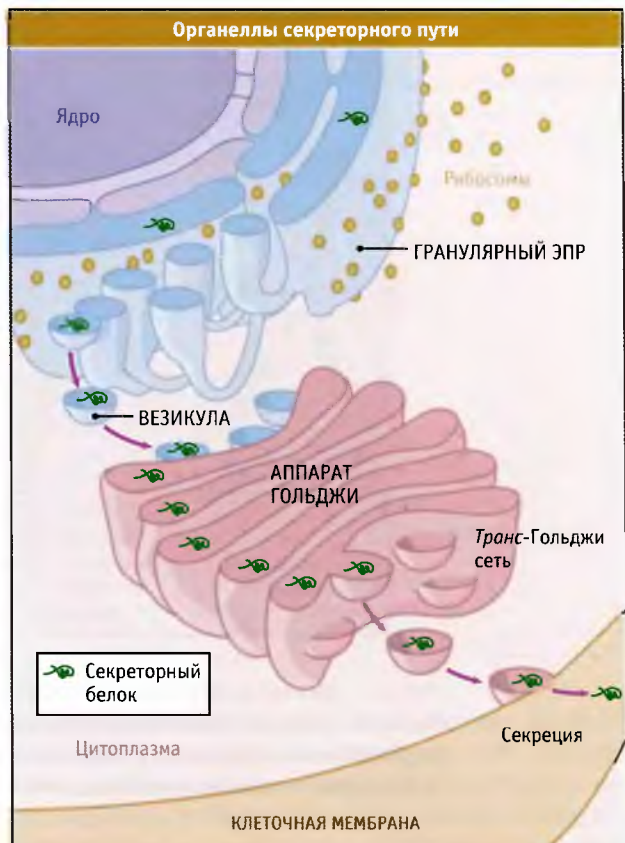
Рис. 3.1. Электронная микрофотография содержимого клетки печени. Показаны характерные для эукариотической клетки органеллы, содержащие мембрану и обладающие различной плотностью. Видны ядро, митохондрии, лизосомы, пероксисомы и гранулярный эндоплазматический ретикулум. Фотография любезно предоставлена Дэниелом С. Френдом

тическую мембрану и не обладает внуклеточными органеллами, клетки эукариот содержат многочисленные структуры, окруженные мембранами, такие как ядра, митохондрии, хлоропласты (у растений), пероксисомы, эндоплазматический ретикулум (ЭПР), аппарат Гольджи и лизосомы (). Для каждой из этих органелл характерен уникальный набор белков. Таким образом, наряду со способностью выделять секреторные и трансмембранные белки, эукариотическая клетка также должна безошибочно узнавать белки органелл. В типичной клетке органеллы занимают примерно половину общего объема. Это означает, что большая часть белков, синтезирующихся в каждый данный момент времени, должна быть селективно локализована в одной из этих органелл.

Каким образом белки локализуются в органеллах? Обычно для направления белка к специфической органелле клетка использует адресные сигналы, которые представляют собой дискретные последовательности аминокислот в составе его первичной структуры. Характер сигнала определяет органеллу, к которой должен быть направлен белок, и эта органелла имеет аппарат специфического распознавания на белке соответствующего сигнала. Если белок синтезировался без адресного сигнала, то он остается в цитозоле.

Белки некоторых органелл (митохондрий, хлоропластов, ядра и пероксисом) транспортируются из цитозоля после окончания синтеза на рибосомах. Однако для других органелл (ЭПР, аппарат Гольджи, лизосомы и плазматическая мембрана) процесс протекает более сложно. Процесс транспорта белка через эти органеллы вместе с самими органеллами называется **секреторный путь**. Непосредственно белки не поступают в аппарат Гольджи, лизосомы и плазматическую мембрану. Вместо этого все белки, подлежащие секреции, или предназначенные для этих содержащих мембраны структур вначале проходят через мембрану ЭПР (). Там они приобретают нативную трехмерную структуру, обычно подвергаются ковалентной модификации, и образуют комплексы с другими белками. Затем эти комплексы попадают в аппарат Гольджи, а оттуда или назад, в ЭПР, или далее, в лизосомы и плазматическую мембрану. Перемещение белков между органеллами секреторного пути происходит с участием мелких везикул, которые отпочковываются от мембраны исходной органеллы и сливаются с мембраной органеллы назначения, высвобождая в нее белковое содержимое.

Важнейшая особенность секреторного пути состоит в том, что **люмен** (внутреннее содержимое) этих органелл по составу напоминает внеклеточное окружение. (Считается, что органеллы возникли в результате инвагинаций плазматической мембраны, специализированной на секреции белка, которые впоследствии превратились в везикулы.) В клетке, секретируемые белки способны принимать нативную структуру, причем это происходит в условиях, близких к тем, в которых они в конце концов должны функционировать ().



Секреция белков начинается с их адресования и транслокации через мембрану гранулярного эндоплазматического ретикулума. После формирования нативной структуры и посттрансляционных модификаций белки выходят из ЭПР в везикулах, связывающихся с аппаратом Гольджи. Большая часть белков переносится из аппарата Гольджи к клеточной поверхности в секреторных везикулах

В настоящей главе рассмотрены начальные процессы, которые обеспечивают позиционирование белков на различных органеллах и мембранах внутри клетки. Поскольку почти все белки синтезируются в цитозоле, эти процессы происходят в мембранах органелл, непосредственно импортирующих белки, а именно в мембранах ЭПР, митохондрий, хлоропластов и пероксисом. К числу таких процессов относится узнавание белков, которые, в отличие от других белков цитозоля, должны быть импортированы в органеллу. В дальнейшем эти белки становятся интегральными белками мембраны или транспортируются через нее. Этот процесс известен как **транслокация (перенос) белка**. В главе также освещается особая роль, которую играет ЭПР в подготовке белков для экспорта по секреторному пути, и другие функции ЭПР. Вопросы, связанные с транспортом белков по секреторному пути и с их сортировкой в аппарате Гольджи перед адресной доставкой, рассматриваются в главе 4 *Перемещение белков между мембранами*.

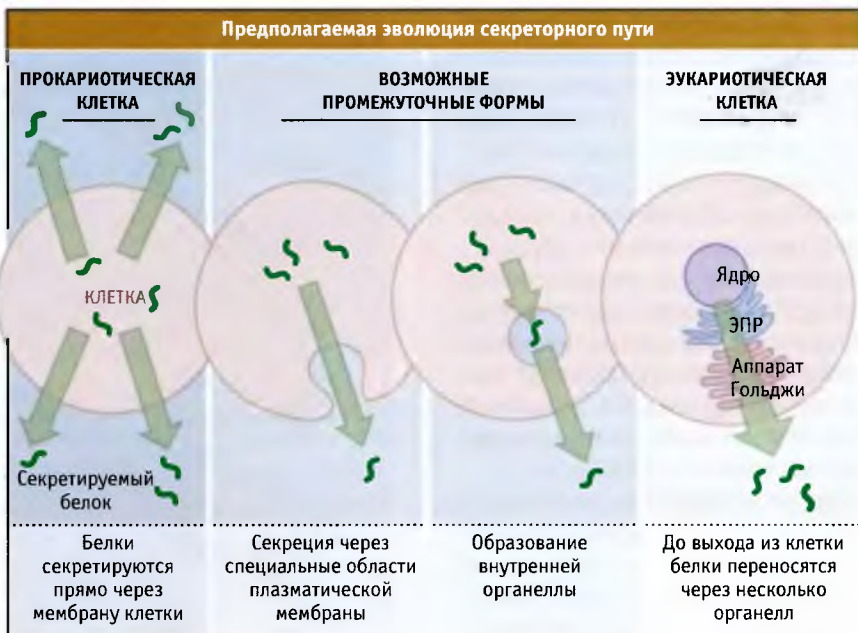


РИС. 3.3. Органеллы секреторного пути могли возникнуть при интернализации участка плазматической мембраны, обладающей функцией секреции белка. В клетках эукариот белки непосредственно не секретируются через плазматическую мембрану, а транспортируются в люмен ЭПР, который по составу напоминает внешнее окружение клетки

3.2 Белки вступают на путь секреции путем переноса через мембрану ЭПР

Основные положения

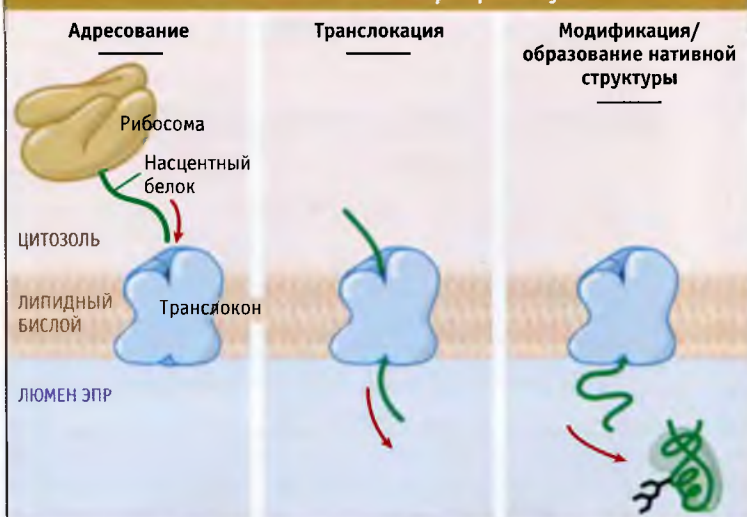
- Сигнальные последовательности адресуют новообразующиеся (синтез которых начался и еще не завершился), секреторные и мембранные белки в ЭПР для последующей транслокации
- Белки транспортируются через мембрану ЭПР по водным каналам, которые могут открываться и закрываться
- Секреторные белки полностью проходят через мембрану ЭПР; трансмембранные белки в нее интегрируются
- Перед выходом из ЭПР белки модифицируются и приобретают нативную конформацию при участии ферментов и шаперонов, содержащихся в люмене

При направлении новообразующихся (**насcentных**) **белков** на секреторный путь в клетке возникают следующие проблемы (рис. 3.4). Во-первых, эти белки должны узнаваться и располагаться в определенных местах транслокации на мембране ЭПР. Этот процесс известен под названием **адресование (таргетинг) белка**. Далее, они должны либо полностью (в случае растворимых белков), либо частично (в случае мембранных белков) проникать через мембрану ЭПР. При этом между люменом ЭПР и цитозолем не должен происходить обмен другими молекулами. Наконец, после транслокации все белки должны приобрести нативную структуру, а во многих случаях они также должны быть модифицированы или объединены в комплексы с другими белками в люмене ЭПР. В настоящем разделе рассматриваются все эти вопросы.

ЭПР представляет собой лишь одну из нескольких мембранных органелл адресной доставки. К числу остальных относятся митохондрии, хлоропласты, пероксисомы и ядро. Белки, которые предназначены для функционирования в составе ЭПР, должны отличаться от белков, поступающих в другие органеллы или остающихся в цитозоле. В клетке все эти белки различаются с помощью **сигнальных последовательностей**. Они представляют собой последовательности аминокислот в составе первичной структуры белка, которые узнаются специальным механизмом, расположенном на органелле-мишени. Как иллюстрирует рис. 3.1, с помощью сигнальных последовательностей белки направляются к определенным органеллам по тому же принципу, как сортируется корреспонденция с использованием почтового кода, и для каждой органеллы используется свой тип сигнальной последовательности.

Механизм, позволяющий идентифицировать сигнальную последовательность для ЭПР, определяет способ переноса белка. Наиболее распространенной формой переноса белка в ЭПР является котрансляционный перенос. Эта транслокация происходит во время синтеза белка на рибосомах, связанных с мембраной ЭПР. Она начинается после того, как сигнальная последовательность узнается в цитозоле особым комплексом, известным под названием **сигнал-распознающая частица**, или **SRP**. SRP соединяется с сигнальной последовательностью и позиционирует белок и синтезирующую его рибосому на ЭПР. Это осуществляется за счет взаимодействия

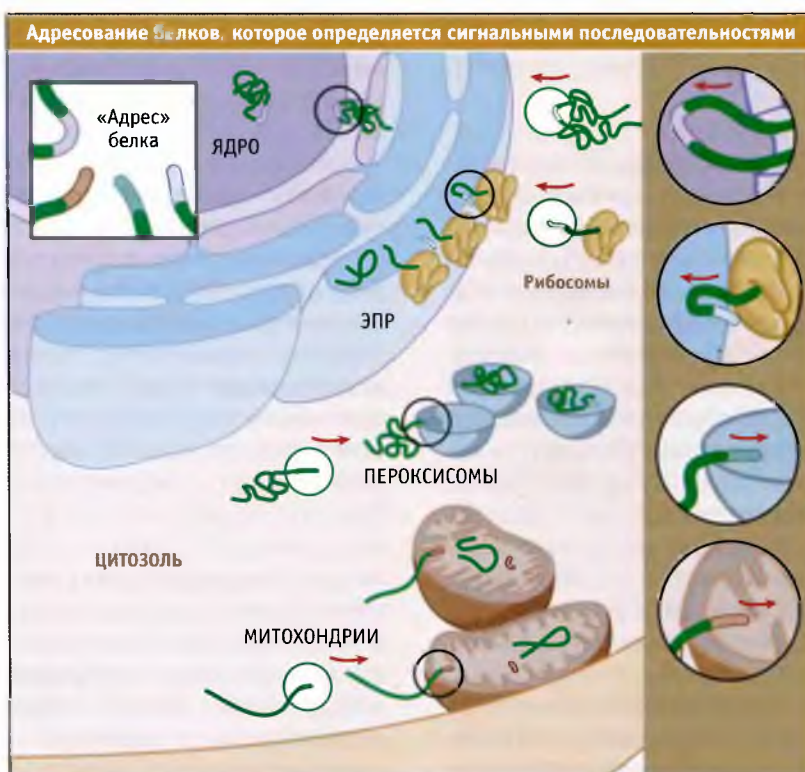
Основные этапы начала секреторного пути



Три основных процесса, затрагивающих ново-образующиеся секреторные и мембранные белки в ЭПР: 1) адресование, 2) транслокация и 3) образование нативной структуры и модификация

с рецептором (белком, который специфически связывается с SRP), расположенным на мембране ЭПР. Однако некоторые сигнальные последовательности ЭПР не взаимодействуют с SRP. Поэтому такие белки транслоцируются **посттрансляционно**, после завершения своего синтеза в цитозоле. Различные

клетки в разной степени используют эти две формы транслокации белков. В клетках млекопитающих, в большинстве случаев происходит котрансляционный перенос, а у более простых эукариот, например у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, используются обе формы.



Сигнальные последовательности, специфические для каждой органеллы, обеспечивают белкам возможность адресно распределяться по клетке. Белки, которые синтезируются без сигнальной последовательности, остаются в цитоплазме

Когда белок позиционируется на ЭПР, он должен пройти через липидный бислой, окружающий органеллу. Это осуществляется по каналу, который представляет собой водный путь через гидрофобную мембрану. Канал, вместе с ассоциированными белками, называется **транслокон**. Такое название подчеркивает сложный, интегральный характер этой транслокационной машины. Функционирование канала обеспечивается воротным механизмом, т. е. он открывается только в момент переноса образующегося (насcentного) белка. Воротный механизм также предотвращает прохождение через канал других метаболитов, например небольших молекул, ионов и других белков. и обеспечивает возможность для цитозоля и внутренней части ЭПР существовать как отдельные компартменты.

Каким образом осуществляется воротный механизм? Сигнальная последовательность цепи новообразующегося белка взаимодействует с белками канала. Это вызывает конформационные изменения и открытие канала, причем белковая цепь начинает проникать вглубь поры. Канал открывается только после позиционирования транспортируемого белка и не реагирует на цитозольный белок, случайно оказавшийся на мембране ЭПР (рис. 3.6). Важно также, что он открывается настолько, чтобы пропустить белковую цепь в развернутом состоянии и при этом не дать возможность другим молекулам одновременно пройти через канал. Поскольку канал контролируется самой новообразующейся полипептидной цепью, то в ее отсутствие он остается закрытым. Тем самым постоянно поддерживается барьер, создаваемый мембраной ЭПР.

К началу транслокации насcentные трансмембранные белки должны быть отсортированы от белков, которым необходимо пройти через канал полностью. Подобно узнаванию сигнальной последовательности, эта сортировка осуществляется самим каналом. Транспорт через липидный бислой прекращается, когда **трансмембранный домен**, который должен представлять собой гидрофобный сегмент, интегрированный в липидный бислой, узнается транслоконом и перемещается из канала в липидный бислой в латеральном направлении. Для одного полипептида этот процесс может повторяться много раз, и благодаря ему возникает сложная топология мембранных белков многократно пронизывающих мембрану (*топология* относится к ориентации белка по отношению к мембране) (см. 3.10 *Трансмембранные белки выходят из канала транслокации и входят в липидный бислой*).

Для секреторных и трансмембранных белков перенос сопровождается модификацией полипептидной цепи. Например, большая часть сигнальных последовательностей удаляется на ранних этапах транслокации. Ко многим белкам после переноса присоединяются углеводные остатки. Часть белков расщепляется перед окончанием транслокации, и

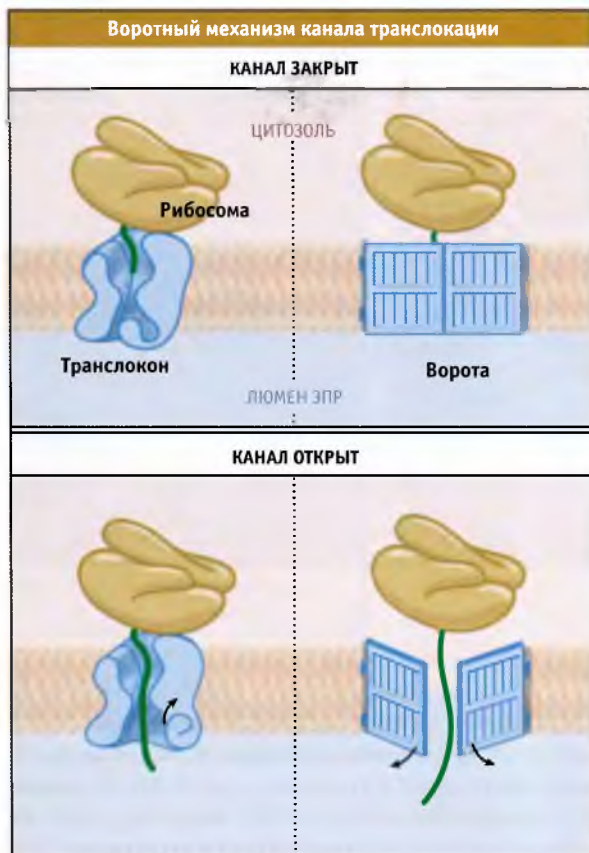


Рис. 3.6. Канал транслокона функционирует как ворота, которые обычно закрыты, но открываются в присутствии субстрата транслокации. Ворота открываются лишь настолько, чтобы дать возможность проникнуть белковой цепи

продукты расщепления ковалентно связывается с фосфолипидами.

Наконец, после транслокации, каждый белок должен приобрести нативную структуру. Это обеспечивается несколькими белками, содержащимися в ЭПР. Некоторые из них, называемые молекулярными **шаперонами**, связываются с новообразующимися белками и предупреждают образование неправильной структуры или их агрегацию. Другие способствуют образованию дисульфидных связей, обеспечивающих нативную структуру, или облегчают сборку мультимерных комплексов. Вместе все они образуют систему **контроля качества**, которая обеспечивает образование правильной нативной структуры белков и их сборку в ЭПР. С системой контроля качества тесно связана система **ретроградной транслокации**, которая узнает белки с неправильной структурой и возвращает их в цитозоль для деградации. Только после прохождения всех стадий контроля качества секреторные и мембранные белки могут покинуть ЭПР и транспортироваться дальше по секреторному пути к местам конечной локализации (см. 4 *Перемещение белков между мембранами*).

Основные положения

- Адресование белка на ЭПР обеспечивается сигнальной последовательностью, представляющей собой короткую цепочку остатков аминокислот, расположенную обычно с N-концевой стороны
- Единственной особенностью, общей для всех сигнальных последовательностей, является наличие центрального гидрофобного внутреннего участка. Обычно этого участка оказывается достаточно для транслокации любого белка

Все белки, структура которых закодирована в ядре, начинают свой биогенез в цитозоле. Первым этапом транслокации белков через мембрану ЭПР, который необходимо преодолеть, является адресование. Он заключается в том, чтобы доставить секреторные и мембранные белки, но не белки цитозоля, к местам их транслокации на ЭПР. В клетке эти белки узнаются по последовательности, присутствующей во вновь синтезированном белке. Эта последовательность направляет белок к мембране ЭПР и обычно удаляется после того, как он позиционировался.

Представление о том, что белок может позиционироваться на ЭПР за счет последовательности аминокислот, получило название сигнальной гипотезы. Эта гипотеза была предложена в середине 1970-х гг. в результате проведения классических экспериментов, которые впервые продемонстрировали, как клетки направляют белки к специфическим компартментам. Было показано, что синтез секреторного белка начинается в цитозоле с наращивания аминокислот на N-конце. Отщепление этого участка от белка происходит только после того, как белок связался с ЭПР, но до окончания его синтеза. Эти аминокислоты удаляются при транспорте белка через мембрану, поскольку не содержащий их белок обнаруживается только внутри ЭПР и не присутствует в цитозоле. Напротив, как показывают результаты другого эксперимента (), если секретируемый белок синтезируется *in vitro*, в отсутствие ЭПР, то такие аминокислоты не удаляются. Таким образом, согласно представлениям сигнальной гипотезы, наращивание аминокислот позволяет насцентным белкам позиционироваться на ЭПР, а после начала транслокации эти аминокислоты удаляются. Гипотеза также предполагала, что дополнительные аминокислоты находятся в структуре всех секреторных и мембранных белков, но отсутствуют в белках цитозоля. В дальнейшем все эти предположения подтвердились. Дополнительные аминокислоты, находящиеся в составе первичной структуры белка, сейчас называются сигнальными последовательностями, и их существование, действительно, представляет собой универсальный механизм адресования новообразующихся секреторных и мембранных белков. В большинстве случаев сигнальные последовательности



Сигнальные последовательности были обнаружены в экспериментах по синтезу секреторных белков в бесклеточной системе *in vitro*. При этом образовывались более крупные белки, которые при гель-электрофорезе мигрировали с меньшей скоростью (дорожка 1). В клетке синтезировались белки меньшего размера (дорожка 2). Если белки синтезировались в присутствии очищенных препаратов ЭПР *in vitro*, то они обладали меньшими размерами (дорожка 3) и были способны к переносу через очищенные препараты ЭПР

отщепляются от **пребелков**, давая **зрелые белки**, которые транспортируются по секреторному пути.

К числу наиболее удивительных особенностей сигнальных последовательностей относится их разнообразие. Единственный для них общий элемент представляет собой центральный участок, состоящий из 6–20 гидрофобных аминокислот, состав которого для разных белков различен. Большинство сигнальных последовательностей на N-конце также содержат несколько полярных аминокислот. Обычно за гидрофобным доменом расположена C-терминальная область полярных аминокислот, где отщепляется сигнальная последовательность. Однако, строго говоря, ни один из этих полярных доменов не является абсолютно необходимым в адресовании.

В качестве сигнальных могут выступать различные последовательности аминокислот, удовлетворяющие вышеприведенным характеристикам (рис. 1.1). Тем не менее, несмотря на разнообразие, по способности позиционировать белки на ЭПР и обеспечивать их транлокацию, сигнальные последовательности более или менее взаимозаменяемы. Так, сигнальная последовательность одного белка обычно может быть заменена последовательностью другого, причем это не сказывается на способности белка к адресованию и переносу.

Сигнальные последовательности некоторых белков ЭПР		
СИГНАЛ	Сайт расщепления ▼	БЕЛОК
	M ⁺ DIWIFLILSGTAG	тяжелая цепь пре-IgG мыши
Гидрофобные	MKCLLYLAFLFIGVNC	пре-G-белок вируса везикулярного стоматита
Кислые	MLPGLALLLLAAWTARA	белок-предшественник амилоида человека
Основные	MKAFTSLLCGLGLSTTLAKA	дрожжевая прекарбоксипептидаза Y
	MDPPRPALLALPALLLLLAGARA	аполипопротеин В человека
	M ⁺ AA ⁺ SQT ⁺ WLLT ⁺ SLLC ⁺ LLW ⁺ QEAGA	предшественник гормона роста крысы
	MDSKGSSQKGSRL ⁺ LLLVSN ⁺ LLLCQGVVS	предшественник бычьего пролактина
	MFFNRLSAGKLLVPLSVVLYALFVVILPLQNSFHSSNVLVRG	дрожжевой пре-Kar2p

РИС. 3.8. Сигнальные последовательности, направляющие белки в ЭПР, различаются по длине и составу аминокислот. Общая черта, присущая всем сигнальным последовательностям, – наличие протяженного центрального региона, который, преимущественно, содержит остатки гидрофобных аминокислот, и часто фланкирован заряженными аминокислотами

су. Аналогичным образом, присоединение к обычно цитозольному белку сигнальной последовательности вызывает его транслокацию. Удивительно, что такая кажущаяся неспецифической последовательность аминокислот обеспечивает высокую специфичность процесса адресования.

Для узнавания сигнальной последовательности требуется только одна субъединица SRP. В соответствии со своей молекулярной массой она называется SRP54, и у многих видов ее структура консервативна, что подчеркивает важность механизма узнавания сигнальных последовательностей.

SRP54 содержит три отдельных домена:

- домен G, связывающий гуанозинтрифосфат (ГТФ) и гидролизующий его до гуанозиндифосфата (ГДФ);
- домен N, представляющий собой N-терминальный домен, который взаимодействует с G-доменом, и
- домен M, который является C-терминальным доменом, содержащим много остатков метионина.

Структура M-домена обеспечивает SRP возможность связываться с различными сигнальными последовательностями, которые ответственны за адресование белков. На рис. 3.9 представлен M-домен, содержащий несколько α -спиралей, вместе образующих бороздку, в которой и связывается сигнальная последовательность. Изнутри бороздка выстлана остатками метионина. Поскольку боковые цепи метионина обладают гидрофобностью и гибкостью, они действуют подобно гидрофобным ворсинкам и позволяют SRP54 связываться с различными гидрофобными участками, которые находятся в сигнальных последовательностях.

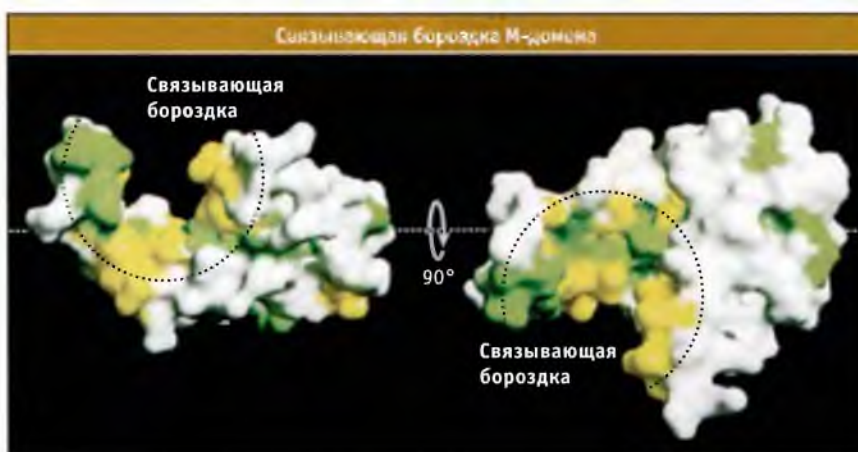
Две другие субъединицы SRP, SRP9 и SRP14, а также 7SPHK присоединяются к рибосоме, снижая скорость элонгации белковой цепи, вероятно, за счет непосредственного вмешательства в процесс связывания трансляционного фактора элонгации. Степень подавления элонгации варьирует от субстрата к субстрату, но во всех случаях подавление снимается только тогда, когда рибосома связывается с ЭПР, и происходит высвобождение SRP. Снижая скорость роста белковой цепи или при-

3.4 Сигнальные последовательности узнаются частицей, распознающей сигнал (SRP)

Основные положения

- SRP связываются с сигнальными последовательностями
- Связывание SRP с сигнальной последовательностью замедляет трансляцию. Поэтому новообразующийся белок переносится на ЭПР в состоянии незавершенного синтеза и не обладая нативной структурой
- Структурная подвижность M домена SRP54 позволяет SRP узнавать различные сигнальные последовательности

Каким образом сигнальная последовательность направляет белок на ЭПР для последующей транслокации? Открытие SRP показало, что сигнальные последовательности узнаются при специфическом белок-белковом взаимодействии. SRP представляет собой маленькую рибонуклеопротеидную частицу, локализованную в цитозоле, которая содержит шесть полипептидов и небольшую молекулу РНК. Она связывается с сигнальной последовательностью новообразующегося белка, высвобождающегося из рибосомы, и тем самым дает возможность комплексу полипептид-рибосома осуществить взаимодействие с мембраной ЭПР.



Строение М-домена бактериального гомолога SRP54. Остатки гидрофобных аминокислот обозначены зеленым и желтым цветом. Эти остатки образуют поверхность глубокой бороздки, с которой, как предполагают, связываются сигнальные последовательности. Слева представлен вид сбоку; справа — вид сверху. По данным работы, опубликованной в *Cell*, v. 94, Keenan, R.J., et al., *Crystal Structure...*, pp. 181–191. Copyright 1998 с разрешения Elsevier

останавливая ее синтез, SRP тем самым обеспечивают доставку новообразующегося полипептида к мембране до того момента, как с рибосомы сойдет большая часть белка. Это делает маловероятным образование нативной структуры до момента поступления белковой цепи в канал и облегчает процесс переноса. Важность задержки трансляции также подтверждается данными о том, что *in vitro* белки обычно теряют способность к транлокации, если их узнавание SRP произошло уже после того, как синтезировалась значительная часть полипептидной цепи. Неясно, происходит ли остановка трансляции у всех организмов и даже характерна ли она для всех транслируемых белков одного организма. В некоторых случаях доставка новообразующегося белка к мембране происходит достаточно быстро, и тогда остановки трансляции не требуется.

бране ЭПР и транспортироваться к транслокационному каналу. В качестве промежуточного участника этого процесса выступает белковый комплекс, известный под названием **SRP-рецептор (SR)**, который локализован на мембране ЭПР со стороны цитозоля.

SR представляет собой димер, состоящий из двух близких по строению субъединиц. Субъединица «альфа» ориентирована в сторону цитозоля (SR α), она взаимодействует с SRP, а «бета» (SR β) встроена в мембрану. Она взаимодействует с SR α и фиксирует ее на мембране ЭПР (рис. 3.10). Подобно SRP54, каждая из субъединиц, SR α и SR β , содержит домен, ответственный за связывание и гидролиз ГТФ, и три этих белка образуют подсемейство ГТФ-аз. Ферментативная активность этих белков в отношении ГТФ играет критическую роль в адресовании белка на ЭПР и в его переносе в канал транслокации, а также в рециклировании SRP после прохождения адресования.

Как иллюстрирует рис. 3.11, для прохождения адресования необходимо, чтобы SRP и SR осуществляли скоординированное связывание и гидролиз ГТФ. Пока не выяснено, связывают ли SRP и SR α ГТФ до их ассоциации друг с другом или их взаимодействие приводит к связыванию ГТФ. В любом случае связанная с сигнальной последовательностью SRP и рибосома объединяются с SR. SR связывается с транслоконом, и объединение ГТФ с SR β , вероятно, облегчается субъединицей канала транслокации. Более того, происходит связывание транслокона с комплексом «рибосома–растущая цепь». Таким образом, возникает продукт скоординированной ассоциации нескольких компонентов. В этом продукте SRP и обе субъединицы SR содержат связанный ГТФ. Повидимому, конформационные изменения, приводящие к гидролизу ГТФ под действием SRP и SR, возникают лишь в случае успешного образования комплекса, и как SRP, так и SR α способны взаимно активировать этот процесс, в результате чего их структура существенно меняется.

3.5 Закрепление белков на мембране ЭПР обеспечивается взаимодействием между SRP и ее рецептором

Основные положения

- Причаливание (докинг) SRP к ее рецептору локализует рибосому и новообразующуюся цепь белка поблизости от транслокона
- Для причаливания необходимо связывание ГТФ и наличие гидролитической активности у SRP и ее рецептора

Узнавание новообразующейся цепи секреторного или мембранного белка при помощи SRP завершает только первую половину процесса адресования. Связавшись с SRP, белковая цепь должна позиционироваться на мем-

Роль SRP

При трансляции открывается сигнальная последовательность

SRP связывается с ней и вызывает остановку трансляции

SRP связывает комплекс новообразующаяся цепь-рибосома с ЭПР

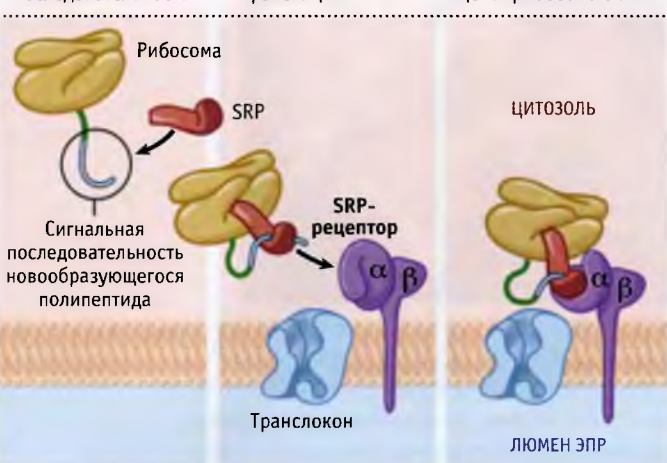
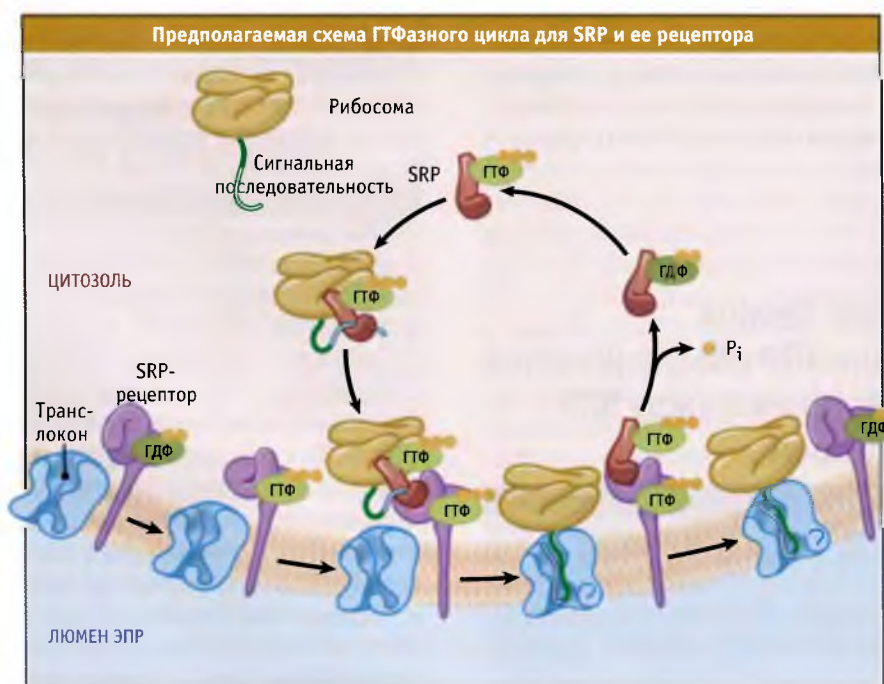


Рис. 3.10 Сразу после выхода сигнальной последовательности с рибосом с ней связывается SRP, происходит остановка трансляции, и комплекс рибосома-новообразующаяся цепь белка связывается с мембраной ЭПР посредством взаимодействия с рецептором SRP

Рибосома также может ускорять гидролиз ГТФ в SRP и SR α . Изменения конформации приводят к высвобождению комплекса «рибосома-растущая цепь» из SRP и SR. В то же время за счет взаимодействия между рибосомой, каналом и белковой цепью последняя удерживается на месте и готова к транслокации.

Многочисленные взаимодействия белков и гидролиз нуклеотидов при адресовании, вероятно, обеспечивают необходимую скорость и степень точности этого про-

цесса. Если при синтезе белка цитозоля рибосома располагается на мембране ЭПР поблизости от транслокона, то отсутствие ассоциации между SRP-SR свидетельствует о том, что белок находится здесь временно и не будет транслоцироваться. Аналогичным образом, если рибосома позиционирована на комплексе SR, который не связан с каналом, то взаимодействие не будет усилено из-за отсутствия связи рибосома-транслокон и транслокон-SR, поэтому гидролиз ГТФ происходить не будет.

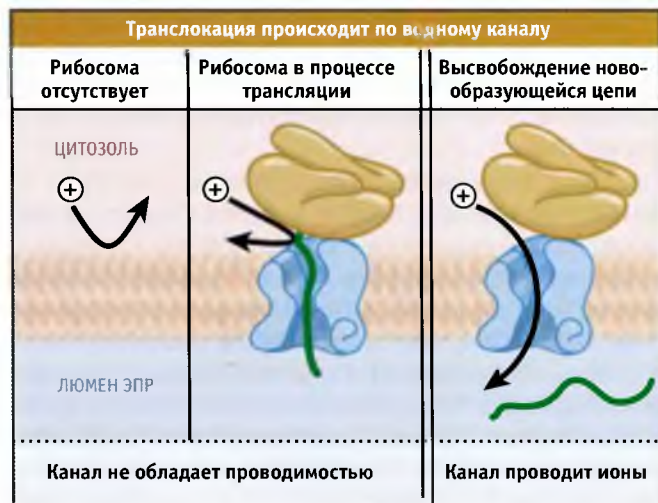


SRP и ее рецептор связывают ГТФ, высвобождая сигнальную последовательность и способствуя ее проникновению в канал транслокации. После этого гидролиз ГТФ приводит к диссоциации SRP и рецептора

Таким образом, в отсутствие транслокона белковая цепь не будет освобождаться.

При высвобождении из SRP рибосома занимает транслокон. Это осуществляется при ее непосредственном взаимодействии с белками канала. При этом рибосома позиционируется непосредственно над входом в канал со стороны цитозоля, и новообразующийся полипептид транспортируется между рибосомой и каналом. Взаимодействие между ними сначала слабое, но может усиливаться, и существует на протяжении всего процесса транслокации.

Остается неясным один аспект адресования и транслокации. Каким образом присутствие нескольких рибосом на одной молекуле иРНК (полисома) влияет на адресование и сборку транслоконов. Если белок синтезировался с участием первой рибосомы на иРНК, позиционированной на ЭПР, то для остальных рибосом SRP должны быть не нужны, поскольку они уже были позиционированы около мембраны ЭПР. Исследования, проведенные методом резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), который позволяет измерить расстояние между двумя молекулами, показали, что, несмотря на незначительные структурные различия между свободным и занятым транслоконом, канал остается собранным и готовым к транслокации, даже если не занят (подробнее о FRET см. **TECH:3-0001**). Таким образом, взаимодействие SRP-SR может оказаться необходимым только для начального этапа адресования. После этого остальные рибосомы довольно быстро ассоциируют с транслоконами, и происходит узнавание сигнальной последовательности, что является как бы сверкой, которая обеспечивает уверенность в том, что каждый полипептид, подлежащий транслокации, действительно представляет собой секреторный или трансмембранный белок (см. 3.7 *Для большинства секреторных и трансмембранных белков эукариот трансляция сопряжена с транслокацией*).



Ионы проходят через мембрану ЭПР, только когда цепи переносимых белков освобождаются от связанных рибосом. Это позволяет предполагать, что новообразующаяся цепь проходит через мембрану по водному каналу. Для того чтобы канал оставался открытым, необходимо присутствие рибосомы, поскольку, если после высвобождения новообразующейся цепи рибосома удаляется, канал теряет проводимость

Оказалось крайне трудным доказать присутствие каналов, обеспечивающих транспорт белков через мембрану ЭПР. Основные положения сигнальной гипотезы предполагали существование каналов, однако в то время высказывались также и другие представления, например о непосредственном транспорте секреторных белков через липидный бислой. Первое убедительное доказательство существования каналов было получено на основании электрофизиологических экспериментов. В них исследовали способность ионов транспортироваться через мембраны везикул (называемых микросомы), образованных из гранулярного ЭПР. Ионы не проходят через липидный бислой, и поэтому если регистрируется проводимость, то это свидетельствует о присутствии в мембране каналов. Микросомы, в которых не наблюдалась транслокация (из-за удаления связанных с ними рибосом), обнаруживали лишь незначительную электропроводимость. Аналогичным образом, ионы не могли пройти через мембрану, занятую рибосомами, находящимися в процессе транслокации. Однако, как иллюстрирует **Рис. 3.12**, можно было зарегистрировать проводимость, если насцентные белки высвобождались из рибосом, которые оставались связанными с мембраной.

Этот эксперимент позволил прийти к следующим двум выводам:

- Ионы способны проходить через водные каналы, которые стабилизируются рибосомами, а при отсутствии рибосом ионы не проходят.
- Новообразованная цепь белка занимает этот канал; причем ионы могут пройти через канал только при высвобождении новообразованной цепи.

3.6 Транслокон представляет собой водный канал, который пропускает белки

Основные положения

- Белки проходят через водный канал, состоящий из комплекса Sec61, расположенного в мембране ЭПР
- С каналом связано много дополнительных белков, участвующих в транслокации, формировании нативной структуры и в различных модификациях

Белки преодолевают мембрану ЭПР по заполненному водой каналу, который проходит через мембрану и специально предназначен для транслокации. Этот канал, вместе со связанными с ним другими белками, называется транслоконом. Транслоконовый комплекс обладает динамичной структурой, и прежде чем рассмотреть транслокацию, целесообразно подробнее ознакомиться с его строением.

В последующих экспериментах с использованием других методов было подтверждено существование канала, т. е. прямо показано, что новообразованные секреторные белки пересекают мембрану, находясь в водном окружении.

Какие белки входят в состав канала транслокации? Кандидаты должны удовлетворять нескольким критериям, включая близость к транслоцируемому белку и взаимодействие с мембрано-связанными рибосомами. Для того чтобы обнаружить белки, удовлетворяющие этим критериям, микросомы обрабатывали детергентом, т. е. переводили мембранные белки в растворимую форму. На рис. 13 показано дальнейшее фракционирование белков с целью найти минимальный набор компонентов, необходимых для транслокации. Индивидуальные белки заключали в липидные везикулы, называемые **протеолипосомами**, которые в экспериментах по транслокации *in vitro* моделировали микросомы. Таким образом, можно было контролировать белковый состав этого искусственного ЭПР и выяснить роль каждого белка в транслокации. Концептуально такой подход напоминает разборку и повторную сборку автомобиля с тем, чтобы найти только такие сочетания деталей, которые необходимы для того, чтобы автомобиль мог передвигаться. Так, двигатель и некоторые другие детали абсолютно необходимы, а

такие регуляторные приспособления, как тормоз, могут отсутствовать.

Этот подход продемонстрировал, что для транслокации некоторых белков необходимы только SRP, SR и комплекс трех трансмембранных белков, обозначаемый Sec61. При этом уже было известно, что SRP и SR участвуют в адресовании, и комплекс Sec61 представляет собой подходящего кандидата на роль каналаобразующего белка, через который осуществляется транслокация.

Sec61 обладает консервативной структурой, что свидетельствует о его критической роли в процессе транслокации. Впервые, белки, соответствующие этому комплексу, были обнаружены в дрожжах, при генетическом скрининге, специально предпринятом для поиска генов, кодирующих компоненты, необходимые для входа секреторных белков в ЭПР. Было обнаружено несколько таких генов, включая SEC61. Этот ген кодирует белок Sec61p, представляющий собой интегральный белок мембраны, который десять раз пронизывает мембрану ЭПР. В клетках млекопитающих присутствует гомолог этого белка, Sec61α. На основании биохимических экспериментов *in vitro* предположили, что Sec61p окружает транслоцируемый белок и очень вероятно, что он образует стенку канала. Генетические и биохимические исследования показали, что Sec61p прочно связывается с двумя другими, более мелкими белками, точные функции которых неизвестны:

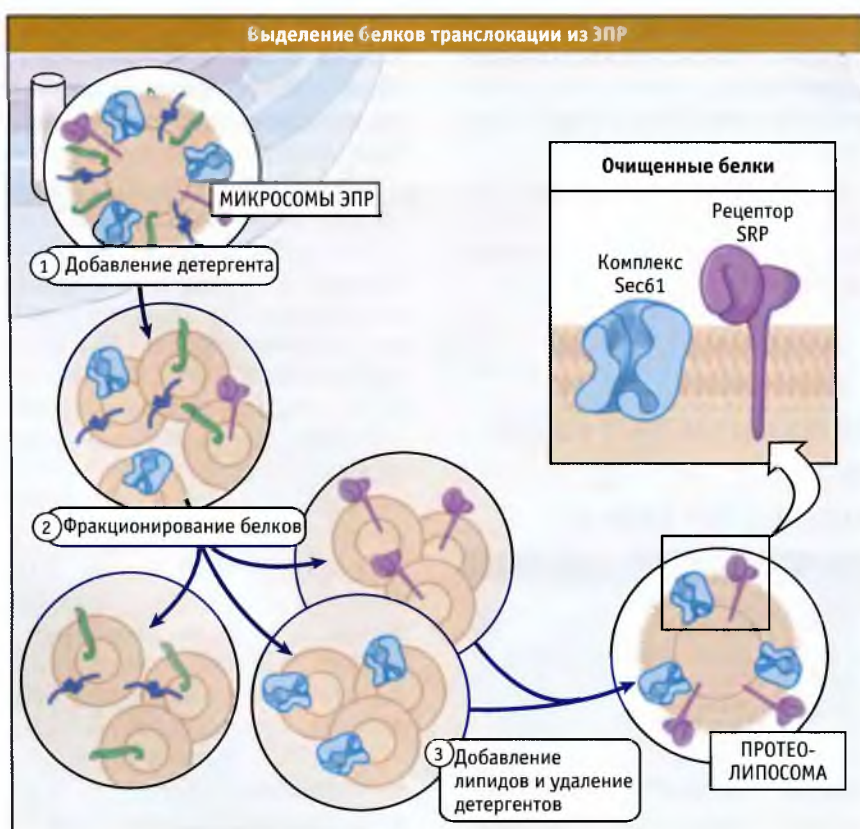


Рис. 13. Для диссоциации микросом ЭПР на небольшие мицеллы белков и липидов можно использовать детергенты. В дальнейшем мицеллы можно подвергнуть фракционированию для выделения необходимых белков. После удаления детергента и добавления новых липидов образуются везикулы, которые содержат только необходимые белки

- Sss1p (Sec61 γ у млекопитающих) и
- Sbh1p (Sec61 β у млекопитающих)

Вместе три этих компонента образуют гетеротримерный комплекс Sec61.

Детальное строение комплекса Sec61 было установлено с использованием данных, полученных для SecY комплекса архебактерий *Methanococcus jannaschii*, структурно и функционально близкого к Sec61 эукариот. Особенности строения комплекса позволяют выделить несколько важных характеристик канала транслокации. Прежде всего, необходимо отметить, что внутренняя часть канала состоит из трансмембранных доменов Sec61 и по форме напоминает часовое стекло. Отверстие, напоминающее пору, закрыто небольшой заглушкой, которая представляет собой часть структуры Sec61 α (рис. 3.14). Со стороны рибосомы (т. е. цитозоля) трансмембранные домены 1–5 Sec61 α образуют половину структуры, по форме напоминающей раковину моллюска, а трансмембранные домены 6–10 образуют другую половину. Между двумя половинами расположен белок Sec61 γ .

Белковая цепь должна пройти через центральную пору канала; для этого отверстие должно быть открыто. Для выяснения механизма открытия поры были проведены биохимические эксперименты, позволившие выявить участки канала, примыкающие друг к другу. Первое событие начала транслокации заключается в узнавании сигнальной последовательности каналными белками (подробнее см. 3.7 Для большинства секреторных и трансмембранных белков эукариот трансляция сопряжена с транслокацией). Вероятно, при этом заглушка канала удаляется. Важно отметить, что узнавание происходит только после того, как белковая цепь уже заняла канал, т. е. когда в поре находится белок, а не заглушка (рис. 3.15). Отметим, что пора канала довольно узкая и окружена гибкими остатками гидрофобных аминокислот. Поэтому проходящая через пору белковая цепь, вероятно, занимает все пространство, и транспорт ионов через канал сильно затруднен.

Еще до выяснения строения комплекса Sec61 определили, что он представляет собой тример или тетрамер, и предполагали, что для формирования канала необхо-

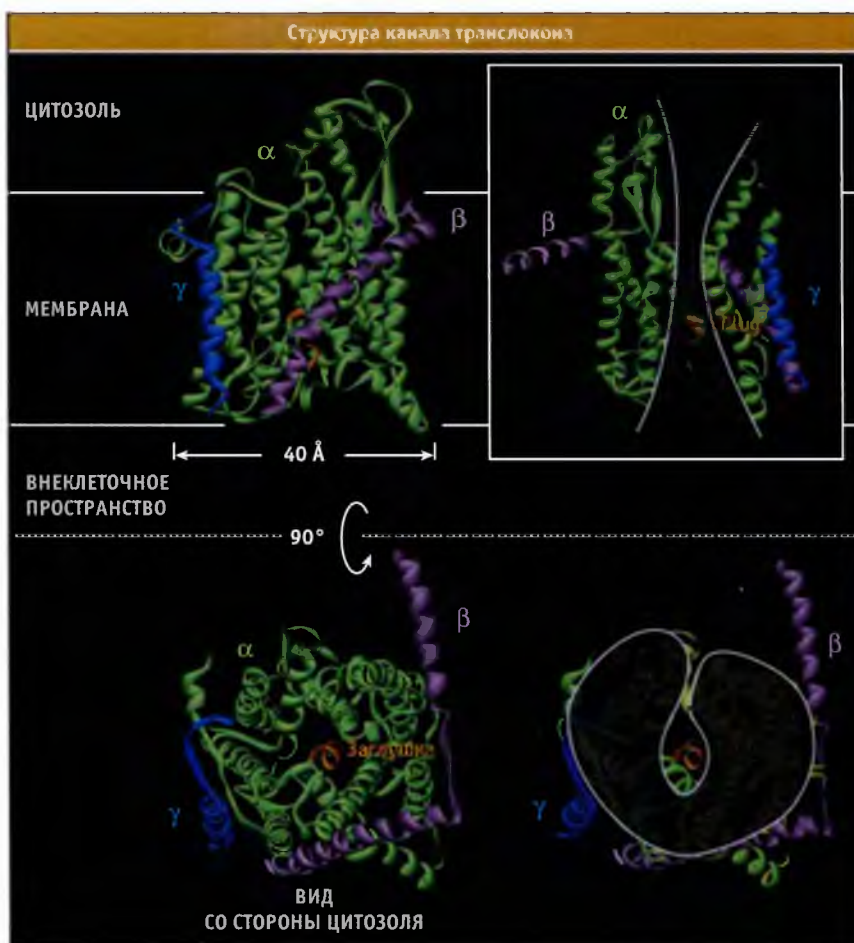


РИС. 3.14. Стенки канала по форме напоминают часовые стекла. Центральное отверстие поры закрыто небольшой заглушкой, которая открывается после связывания сигнальной последовательности с белками канала. В рамке справа удалены некоторые трансмембранные спирали и видна пора, стенки которой напоминают по форме часовые стекла. Со стороны цитозоля видны трансмембранные спирали, расположенные в виде раковины. Модель построена по данным Protein Data Bank file 1RHZ

Связывание сигнальной последовательности с канальными белками, вероятно, вызывает конформационные изменения, которые приводят к открытию канала и позволяют белковой цепи проходить через него



димо несколько копий комплекса. Однако в настоящее время это представляется маловероятным, и скорее всего, канал образует одна копия Sec61 (т. е. по одной молекуле Sec61 α , Sec61 β и Sec61 γ). Причина, по которой для формирования канала необходимо участие трех или четырех копий Sec61, пока остается неясной.

Хотя Sec61 непосредственно образует канал, рядом находятся другие белки, и комплекс Sec61 может рассматриваться как некий каркас, на котором собираются белки ЭПР, принимающие участие в переносе, а также в модификации и формировании нативной структуры белка. Например, в каждом активном транслоконе, наряду с рибосомой и описанным выше SR комплексом, присутствует сигнальная пептидаза, которая отщепляет сигнальную последовательность от переносимого белка. Также в транслоконе находится олигосахарид — трансфераза (ОСТ), представляющая собой комплекс ферментов, которые ковалентной связью присоединяют сахарные остатки к белковым цепям. С растущей цепью взаимодействуют и другие белки, функции которых остаются невыясненными. С сигнальной последовательностью и трансмембранными доменами часто связан т. н. «мембранный белок, ассоциированный с переносимым белком (TRAM)». В отличие от ферментов, деградирующих или модифицирующих участки образующейся цепи, белок TRAM необходим для переноса некоторых белков на нескольких этапах этого процесса. Еще один белковый комплекс, принимающий участие в переносе, называется **белок, ассоциированный с транслоконом (TRAP)**. Он также распространен, как Sec61 α , и облегчает узнавание сигнальной последовательности канальными белками, хотя механизм его действия остается неизвестным. Очевидно, что транспортный канал не функционирует изолированно, а, по-видимому, является частью большого белкового комплекса, который регулирует процесс транслокации. Таким образом, при необходимости, клетка в любой момент времени может изменить процесс транслокации индивидуальных белков.

3.7 Для большинства секреторных и трансмембранных белков эукариот трансляция сопряжена с транслокацией

Основные положения

- Взаимодействие между транслоконом и сигнальной последовательностью приводит к открытию канала и к началу транслокации
- Детали механизма транслокации варьируют для разных белков

После адресования и причаливания растущей цепи белка, связанной с рибосомой, должен начаться транспорт полипептида через мембрану. Большинство данных об этом процессе получено при исследовании сравнительно небольшого количества модельных белков в бесклеточной системе транслокации. Эффективность переноса зависит от скоординированности взаимодействий между белковой цепью, каналом и рибосомой. Эти взаимодействия меняют структуру канала и его связывание с рибосомой и образующейся цепью.

После высвобождения сигнальной последовательности из SRP на мембране ЭПР, единственной силой, удерживающей рибосому на мембране, является ее взаимодействие с каналом. Такого взаимодействия оказывается недостаточно, чтобы начать перенос новообразующейся цепи, минуя этап ее узнавания на мембране ЭПР. Этот этап необходим, поскольку независимо от субстрата трансляции сами по себе рибосомы обладают не очень высоким, но существенным сродством к каналу. Если бы для начала транслокации достаточно было только взаимодействия рибосомы с транслоконом, то также могли бы начать переноситься белки цитозоля. Такая возможность предотвращается следующим за

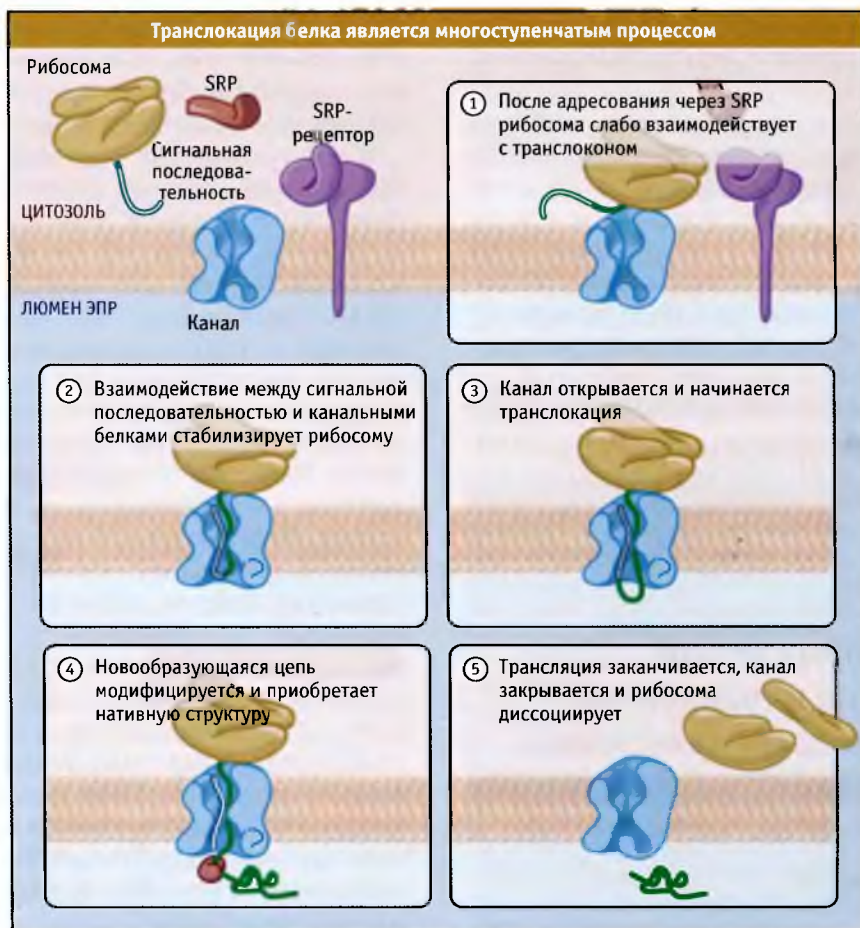
причаливанием этапом, на котором канал должен узнать сигнальную последовательность.

иллюстрирует изменения взаимодействия рибосомы с транслоконом при узнавании сигнальной последовательности. После причаливания и высвобождения SRP рибосома остается связанной с транслоконом лишь слабой связью. При этом сигнальная последовательность и остаток новообразующейся цепи ориентируются по направлению к цитозолю, но находятся в непосредственной близости от конца канала. Вскоре после возобновления элонгации белковой цепи сигнальная последовательность узнается SecE1 α . Предполагается, что для узнавания необходимо, чтобы сигнальная последовательность внедрилась в канал свернутой в виде петли, с N-терминальным концом, ориентированным в сторону цитозоля, а С-терминальным в сторону просвета ЭПР. При такой ориентации высвобождение белка с рибосомы в люмен ЭПР происходит через канал.

Узнавание сигнальной последовательности и начало ее поступления в канал представляют собой начальные этапы транслокации цепи. К ним, вероятно, также

относятся также смещение заглушки, закрывающей отверстие канала, и вставка в пору участка зрелой цепи (т. е. расположенного непосредственно после сигнальной последовательности). Как только это происходит, связь между рибосомой и каналом становится более прочной. После адресования все эти процессы, начиная с проникновения в пору сигнальной последовательности и до открытия канала, проходят очень быстро. Лишь небольшая дополнительная элонгация полипептида требуется, и описанные события завершаются задолго до того, как успеет синтезироваться большая часть белка. Для того чтобы цепь секреторного белка могла начать транслоцироваться, необходимо, чтобы ее длина, расположенная вне рибосомы, составляла лишь около сорока аминокислот.

Если канал открылся, то большая часть секреторных белков переносится в люмен до окончания трансляции. Ранее было широко распространено мнение о том, что сила взаимодействия между рибосомой и транслоконом настолько велика, что эти компоненты прочно сцеплены друг с другом, чем предотвращается выход переносимой цепи в цитозоль. Однако многочисленными



Элонгация новообразующейся цепи в люмен ЭПР не происходит до тех пор, пока канал не узнал сигнальную последовательность и плотно не связал рибосому. Вскоре после начала транслокации происходит модификация белковой молекулы, и она приступает к приобретению нативной структуры

экспериментами было показано, что два компонента разделены промежутком, и, по крайней мере, в некоторых случаях часть цепи способна проходить через него в цитозоль. Поскольку переносимые цепи имеют доступ в цитозоль, неизвестно, что побуждает их к переносу в люмен ЭПР, причем они действительно переносятся, а не просто падают. Одна возможность состоит в том, что взаимодействие с компонентами люмена ЭПР удерживает появившуюся цепь, не давая ей возможность выйти оттуда (см. 3.9 Транслокация происходит за счет энергии гидролиза АТФ). Какой бы ни был этот механизм, считают, что субстрат транслокации предпочтительно мигрирует в люмен. Когда рибосома достигает стоп-кодона, цепь выходит в люмен, и канал закрывается, хотя точная последовательность этих событий пока неизвестна. Особенно непонятно, происходит закрытие канала после полного прохождения цепи или в результате диссоциации рибосомы.

Хотя перечисленные процессы представляют собой основные этапы транслокации, они варьируют от субстрата к субстрату. Например, различные сигнальные последовательности по-разному взаимодействуют с белками каналов и открывают их по разным механизмам. В свою очередь, способ узнавания последовательности влияет на последующий биогенез некоторых белков. Для переноса ряда белков, наряду с Sec61 и TRAM, необходимы факторы ER. У определенных белков транслокация начинается с одних и тех же основных этапов, но позже проходит совсем по-другому. Например, некоторые белки на какое-то время выходят из зазора между рибосомой и транслоконом, при этом большие участки цепи находятся в цитозоле до момента обратного входа в канал. Поэтому, хотя процесс транслокации обладает рядом общих существенных черт, было бы чересчур упрощенным думать, что она является единым механизмом переноса для разных белков через мембрану. Более вероятно, что специфический путь, по которому белок переносится через транслокон, оказывает впоследствии определенное влияние на его биологическую активность; однако меру этого влияния мы пока не можем оценить.

3.8

Для некоторых белков адресование и транслокация происходят после трансляции

Основные положения

- Посттрансляционная транслокация происходит независимо от рибосом и SRP
- Посттрансляционная транслокация широко распространена у дрожжей и в меньшей степени у высших эукариот
- Посттрансляционные транслоконы по составу отличаются от котрансляционных транслоконов, однако они представляют собой одни и те же каналы

При котрансляционной транслокации адресование и инициация транслокации белка происходят на очень

раннем этапе синтеза новообразованной цепи. Это предотвращает формирование в цитозоле нативной структуры белка, не способной к транслокации. Другой путь транслокации включает полный синтез белка в цитозоле, где его молекула не приобретает нативной структуры, и поэтому может быть транслоцирована. Такая посттрансляционная транслокация особенно характерна для одноклеточных эукариот, но может происходить и у высших. Эта форма транслокации не зависит от SRP и рибосом и отличается от котрансляционной транслокации по способу реализации и по механизму.

Первым свидетельством в пользу существования второго пути адресования и транслокации было наблюдение о том, что многие белки дрожжей способны к транслокации *in vitro*, даже после того, как сошли с рибосом. В соответствии с этим наблюдением показано: клетки *S. cerevisiae*, где отсутствует SRP, жизнеспособны, и многие белки сохраняют способность к транслокации в таких клетках. Сейчас стало очевидным, что в нормальных условиях для некоторых дрожжевых белков используется только один из двух путей транслокации, однако во многих случаях эффективно используются оба.

Посттрансляционная транслокация характеризуется отсутствием цитозольного фактора, узнающего сигнальные последовательности. Использование того или иного пути транслокации, по-видимому, определяется степенью гидрофобности сигнальной последовательности, которая предоставляет способность взаимодействовать с SRP. При отсутствии взаимодействия трансляция не задерживается, и белок подвергается адресованию и транслокации уже после окончания синтеза.

Одно из последствий быстрого адресования при котрансляционной транслокации заключается в том, что в цитозоле у субстратов транслокации не образуется нативной структуры. До адресования длина пептида, выходящего из рибосомы, недостаточна для образования нативной структуры, и вместе с тем нативная структура не может образоваться в ограниченном пространстве канала. Напротив, образование нативной структуры в цитозоле у посттрансляционно транслоцируемых субстратов ингибируется при их взаимодействии с шаперонами семейства hsp70 (см. MBIO:3-0001). Эти белки используют энергию гидролиза АТФ для обратимого связывания с посттрансляционно измененными белками, тем самым предотвращая образование их нативной структуры или их агрегацию. При этом белки получают возможность взаимодействовать с каналом.

В посттрансляционной транслокации не участвует такой компонент, как SRP, который узнает сигнальную последовательность до момента ее позиционирования на мембране. Вместо этого белок транспортируется к транслокону с участием мультибелкового комплекса, который является частью посттрансляционного транслокона. Так же как и котрансляционный транслокон, он содержит тримерный комплекс Sec61. Однако в посттрансляционном транслоконе также присутствуют четыре других белка (Sec62p, Sec63p, Sec71p и Sec72p) (рис. 3.11). Эти белки образуют субкомплекс, большие

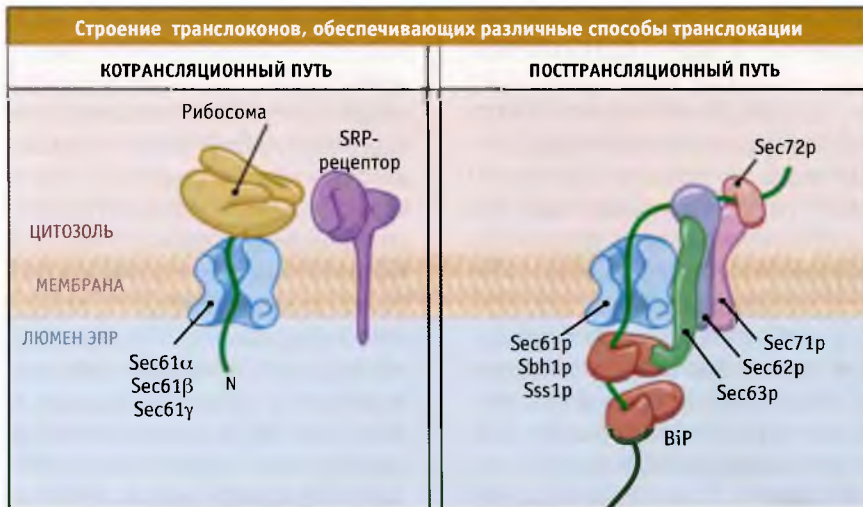


Рис. 3.27. Различные белки взаимодействуют с одним и тем же каналом, обеспечивая котрансляционную или посттрансляционную транслокацию

домены которого открываются в цитозоль и в люмен. Один или несколько этих доменов участвуют в адресовании субстратов, хотя его механизм пока остается невыясненным.

Предполагается, что для транслокации белков через внешнюю мембрану хлоропластов также используется центральный канал, связанный с дополнительными белками (см. 3.29 *Поступающие в хлоропласты белки также должны пройти через две мембраны*). В общем, такой способ переноса белков через мембрану дает возможность гибко регулировать процесс транслокации субстратов и не использовать отдельные каналы для каждого типа белков. Сходным образом регулируется экспрессия генов факторами транскрипции, которые связываются только с промоторами определенных генов, включая и выключая транскрипцию путем взаимодействия с комплексом РНК-полимеразы (см. MBIO:3-0002).

После позиционирования цепи на транслоконе сигнальная последовательность узнается каналными белками, так же как это имеет место при котрансляционной транслокации. Поскольку адресование не зависит от SRP, этот этап приобретает особую важность, так как должен гарантировать отсутствие транслокации белков цитозоля. Так же как и при контрансляционной транслокации, к открытию канала при посттрансляционном переносе приводит узнавание сигнальной последовательности. По-видимому, способность канала, а не SRP узнавать посттрансляционно позиционированную сигнальную последовательность позволяет предполагать, что, хотя связывание последовательности определяется ее гидрофобностью, на ее узнавание оказывают влияние другие, пока еще неизвестные факторы.

Хотя система посттрансляционной транслокации широко представлена в клетках *S. cerevisiae*, данные, свидетельствующие о ее функционировании у высших эукариот, носят менее очевидный характер. Эта форма

транслокации пока продемонстрирована *in vitro* лишь для очень небольших субстратов. В этих случаях образование стабильной нативной структуры в цитозоле маловероятно. Действительно ли эти субстраты *in vivo* позиционируются посттрансляционно, достоверно не установлено. Однако у высших эукариот обнаружены гомологи белков Sec62p и Sec63p. Таким образом, возможно, что либо посттрансляционная транслокация происходит несколько по-другому, либо каналы и набор белков используются для других нужд у высших эукариот.

3.9 Транслокация происходит за счет энергии гидролиза АТФ

Основные положения

- Энергия, необходимая для посттрансляционной транслокации, поставляется при гидролизе АТФ, который происходит в люмене ЭПР при участии белка BiP
- Об источнике энергии, необходимой для котрансляционной транслокации, известно меньше, однако это может быть тот же самый источник, что и для посттрансляционной транслокации
- У бактерий в большинстве случаев транслокация осуществляется посттрансляционно, через канал, эволюционно близкий к комплексу Sec61

За счет чего происходит транслокация в люмен ЭПР? В экспериментах по исследованию переноса флуоресцентных проб через мембрану микросомальных везикул было показано, что рибосома настолько прочно связывается с каналом, что перенос цепи в люмен любым другим путем, исключая канал, становится невозможным. Однако исследование комплекса рибосома-транслокон в электронном микроскопе позволило предположить, что между рибосомой и каналом существует промежуток. В

биохимических экспериментах было показано, что во многих случаях при переносе белковая цепь оказывается в цитозоле, и т. о. транслокация в ЭПР происходит не всегда. Вместе с тем, подобный механизм не объясняет, как при посттрансляционном позиционировании возможно продвижение белка по транслокационному каналу. Хотя определенную роль в «проталкивании» новообразованной цепи в люмен ЭПР может играть рибосома, в настоящее время кажется более вероятным, что движение цепи направляется белками люмена. Это предположение высказано на основании изучения механизма посттрансляционной транслокации. Хотя источник энергии для осуществления котрансляционной транслокации остается пока неизвестным, роль гидролиза АТФ в посттрансляционной транслокации исследована в достаточной степени и обсуждается в настоящем разделе. Не исключено, что аналогичный механизм реализуется и при котрансляционной транслокации.

Источником энергии для посттрансляционной транслокации белков в ЭПР служит АТФ, который гидролизуется белком hsp70 BiP, находящимся в люмене. Этот

белок позиционируется на посттрансляционном канале за счет обратимого связывания с доменом Sec63p, который также локализуется со стороны люмена. Как показано на рис. 3.18, свободный полипептид за счет беспорядочного броуновского движения может двигаться в канале в двух направлениях. Как постулирует механизм транслокации, носящий название **модель броуновского храпового колеса**, функция BiP заключается в связывании с растущей цепью по мере ее выхода из канала. Такое связывание предотвращает ее поступление назад, в цитозоль (белок BiP находится в скрученной форме, так что он не проходит через канал). По мере выхода в люмен очередного участка цепи он связывается с новой молекулой BiP, и таким образом осуществляется процесс транслокации. Следовательно, BiP обеспечивает продвижение белковой цепи в одном направлении. Энергия гидролиза АТФ расходуется на усиление взаимодействия BiP с белком, а в дальнейшем, при обмене АДФ/АТФ, происходит диссоциация BiP и субстрата. В пользу этой модели свидетельствуют эксперименты, в которых было показано, что удаление BiP из люмена ЭПР приводит к

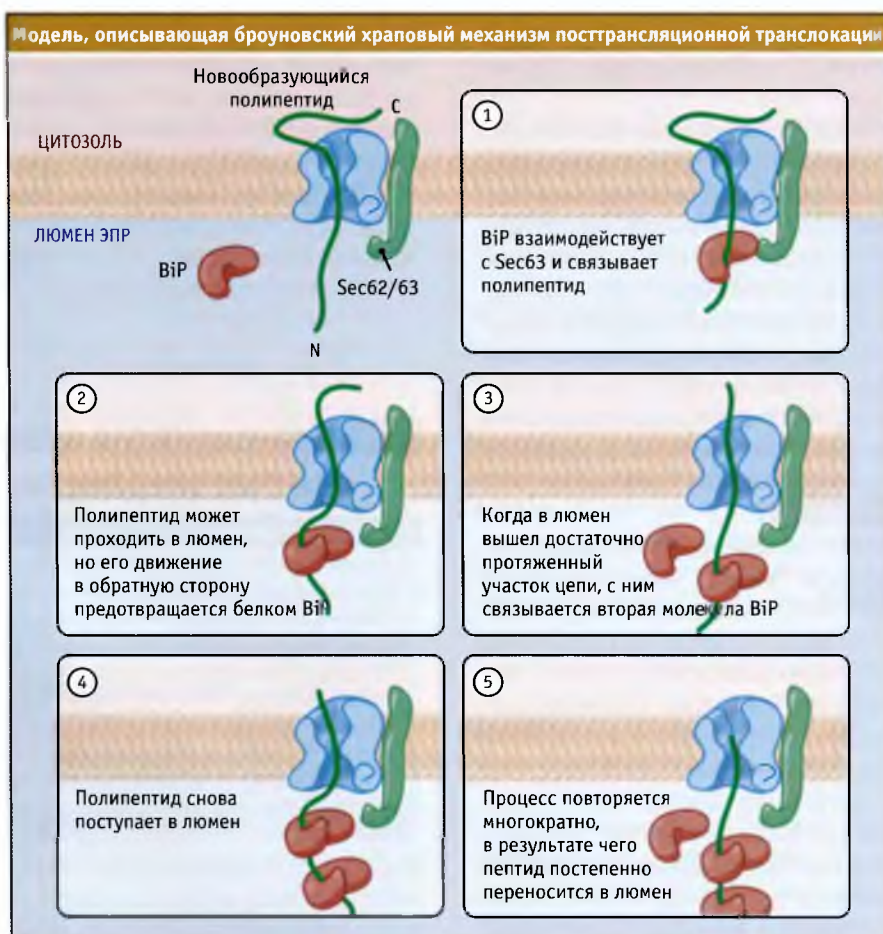


Рис. 3.18. После непродолжительного взаимодействия с Sec62/63 молекулы BiP связывается с новообразующимся полипептидом. Поскольку белок BiP слишком большой для того, чтобы поместиться в канале, он позволяет полипептиду проходить внутрь канала, но ограничивает его продвижение назад, в цитоплазму. Каждая молекула BiP в люмене захватывает новый участок полипептида

нарушению транслокации, однако при добавлении в люмен любых сравнительно больших молекул, способных связывать новообразующуюся цепь, транслокация возобновляется. Возможно даже, что скручивание новообразующейся цепи в люмене может препятствовать ее попаданию назад, в цитозоль. При этом предполагается, что белки, склонные к сворачиванию, переносятся легче, чем белки, которые во время значительного периода транслокации остаются в нескрученном состоянии (хотя это не доказано). Для того чтобы предложенная модель функционировала нормально, необходимо, чтобы при образовании связи цепи с каналом перед началом транслокации разорвалась связь цепи с hsp70 и другими белками цитозоля. В противном случае цепь с одинаковой вероятностью может остаться вне ЭПР или пройти в канал. Однако взаимодействие цепи с белками цитозоля в процессе транслокации пока не исследовано. Стоит заметить, что (см. 3.6 *Транслокон представляет собой водный канал, который пропускает белки*) единственные белки, абсолютно необходимые для транслокации, представлены комплексами Sec61 и SR, но эффектив-

ность переноса для большинства белков очень низкая при таком минимуме белков. По-видимому, это связано с тем, что в люмене отсутствуют белки, способные облегчить продвижение цепей.

В отличие от модели транслокации по принципу броуновского храпового колеса, **модель активного протягивания** предполагает, что гидролиз АТФ вызывает конформационные изменения в белке BiP, которые приводят к активному протягиванию связанной цепи через канал. По такому механизму происходит посттрансляционный импорт белков в митохондрии (см. 3.26 *Сигнальные последовательности также используются для транспорта белков в другие органеллы*). Хотя посттрансляционная транслокация некоторых белков в ЭПР может происходить по броуновскому храповому механизму, цепи определенной структуры или связанные с hsp70 в цитозоле переносятся по механизму активного протягивания. Поскольку протягивание (образование тянущей силы) молекулы по каналу трудно воспроизвести экспериментально, пока сложно оценить роль, которую играют обе модели в посттрансляционной транслокации.

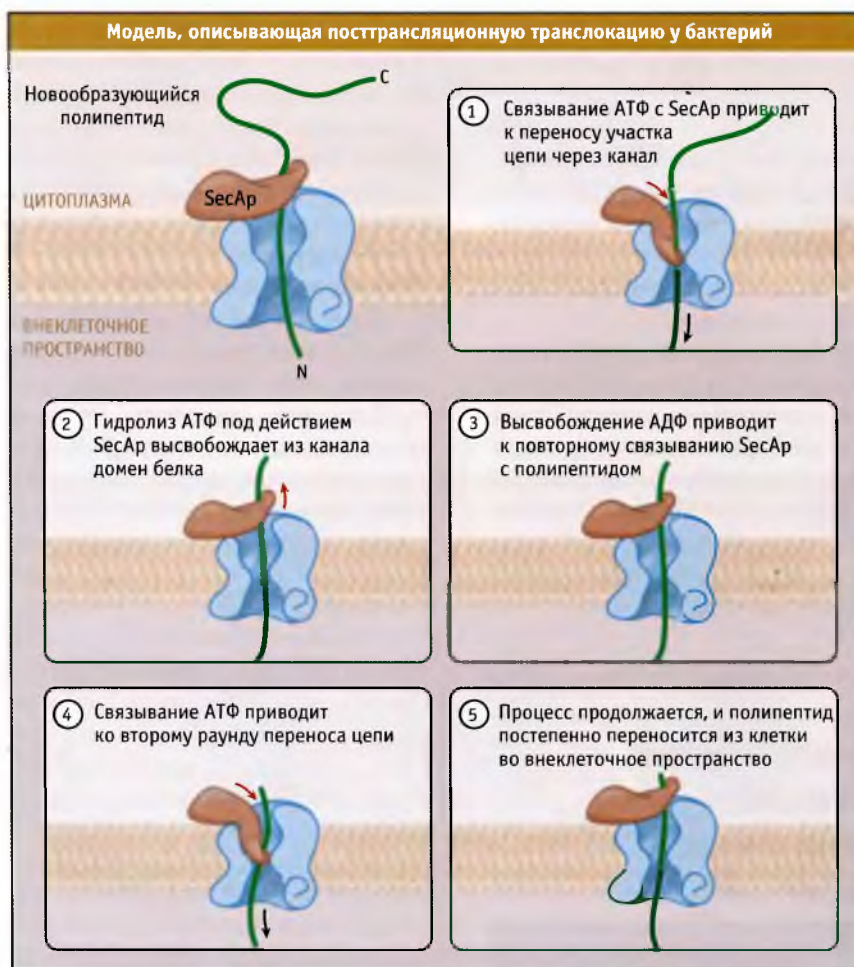


Рис. 3.9. Белок SecAp расположен с цитоплазматической стороны канала. Он многократно связывается с новообразующимся полипептидом и постепенно вставляет его в канал, что в конце концов приводит к транслокации всего белка. При этом один домен белка SecAp периодически проникает в канал и выходит из него

Хотя в настоящем разделе в основном рассматривается транслокация белков в эукариотических клетках, проблема сортировки белков важна и для прокариот, которые также образуют секреторные и мембранные белки. Посттрансляционная транслокация характерна для бактерий *E. coli*. Она напоминает посттрансляционную транслокацию у дрожжей в том отношении, что субстраты заранее не образуют нативной структуры, и узнавание сигнальной последовательности происходит внутри канала. Так же как и у эукариот, транслокация у бактерий происходит по водному каналу, который в основном состоит из трех белков, вместе называемых комплексом SecYEG. Белок SecY представляет собой бактериальный гомолог Sec61p и Sec61α. Однако, поскольку у бактерий нет органелл окруженных мембранами, белки переносятся непосредственно через плазматическую мембрану. Следствием этого является то, что источником энергии служит белок SecA (SecAp), действующий с цитозольной стороны мембраны, а не с противоположной ее части, как это имеет место у эукариот при посттрансляционной транслокации. Одна из возможных моделей функционирования SecAp представлена на рис. 3.19. Модель предполагает, что этот белок, расположенный с цитозольного конца канала, неоднократно входит в канал, каждый раз втягивая в канал и высвобождая из него новый участок субстрата. Связывание и высвобождение полипептида белком SecA происходят за счет цикла гидролиза АТФ. Неизвестно, почему в перерыве между функционированием SecAp полипептидная цепь не поступает назад, в цитозоль. Существование у прокариот трансмембранного электрохимического потенциала служит дополнительным фактором, облегчающим транслокацию, хотя механизм этого остается малопонятным.

Сравнение между собой котрансляционного, посттрансляционного и бактериального путей транслокации показывает, что основные механизмы переноса белков через мембраны являются консервативными и в то же время могут адаптироваться к разнообразным условиям. Во всех случаях сохраняется фундаментальная особенность процесса — перенос через водный канал. Однако субстраты, а также пути их позиционирования и переноса по каналу различаются между собой.

Позиционирование на транслокационном канале и начало переноса секреторных и трансмембранных белков происходят одинаково. Однако транслокация мембранных белков должна сочетаться с их **интеграцией** или вставкой в липидный бислой ЭПР. Интеграция происходит в тот момент, когда трансмембранные домены узнаются транслоконом, тогда их транслокация в просвет ЭПР прекращается, и они начинают переноситься из канала в липидный бислой в латеральном направлении. Таким путем синтезируются и интегрируются много различных типов трансмембранных белков, включая те, которые пронизывают мембрану несколько раз.

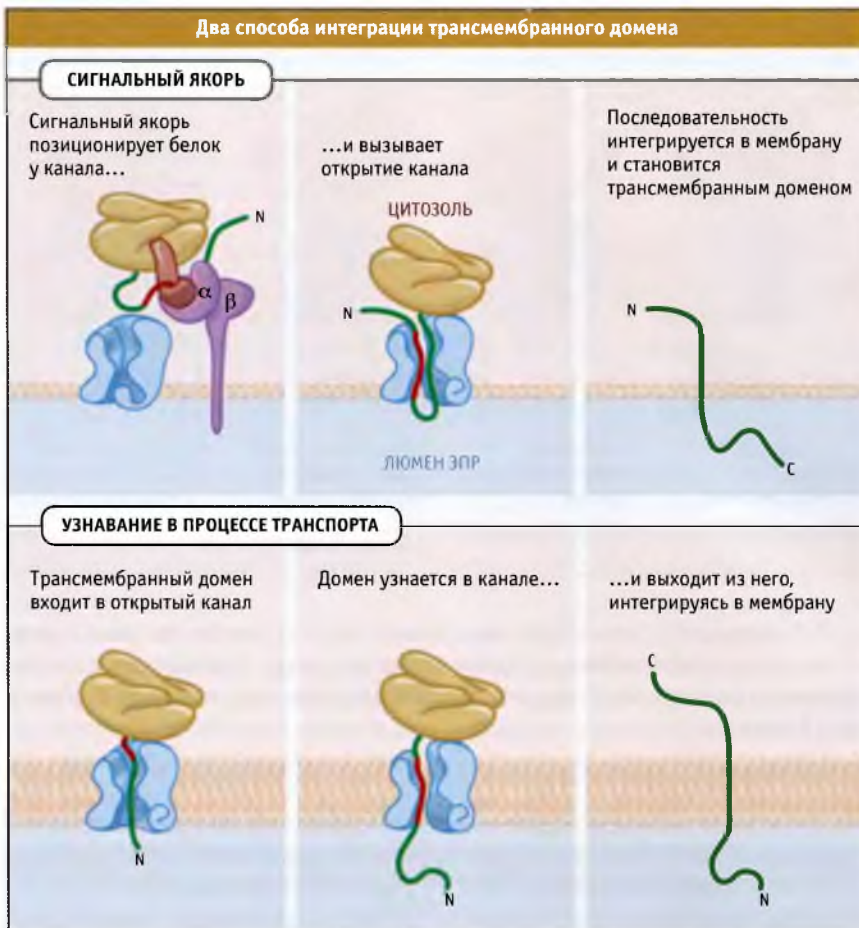
Первым шагом на пути интеграции белка в мембрану является узнавание трансмембранных доменов транслоконом. Эти домены простираются на расстояние около двадцати гидрофобных аминокислот. Из-за своего гидрофобного характера некоторые трансмембранные домены узнаются SRP как сигнальные последовательности. Эти так называемые **сигнальные якорные последовательности** вначале позиционируют новообразующийся белок на ЭПР, а затем направляются в канал как обычные сигнальные последовательности. Однако сигнальные якорные последовательности не отщепляются от белка, а интегрируются в мембрану. Как показано на рис. 3.20, в отличие от сигнальной якорной последовательности, большинство трансмембранных доменов узнаются транслоконом, как только они сошли с рибосомы, после завершения адресования с помощью обычной N-терминальной сигнальной последовательности. Информация о том, что трансмембранный домен уже синтезировался, должна передаваться на транслокон другим путем, отличным от переноса с SRP.

Самый простой признак, свидетельствующий о том, что трансмембранный домен находится в транслоконе, это гидрофобность самого домена. Из-за особенности структуры транслокационный канал обнаруживает эту гидрофобность. Как показано на рис. 3.21, структура транслокона предполагает, что канал способен открываться подобно раковине моллюска, что позволяет трансмембранному домену одновременно контактировать с каналом и с липидным бислоем. По-видимому, сигнальные последовательности и трансмембранные домены связываются с белком Sec61α, расположенным со стороны открывающихся створок, и это связывание затем вызывает латеральное открытие канала. Такая схема предложена на основании экспериментальных данных, согласно которым трансмембранные домены в канале контактируют с Sec61α и липидами. В результате, хотя в составе транслокона находится водный канал, в мембране присутствует достаточно гидрофобных каналов, в которых перемещаемые полипептиды могут попасть в окружение липидов. Следует ожидать, что участки, содержащие полярные аминокислоты, должны продвигаться через канал без остановки, в то время как гидрофобные домены за счет сильного взаимодействия с липидами будут оставаться связанными с боковыми стенками канала, препятствуя транслокации (рис. 3.22).

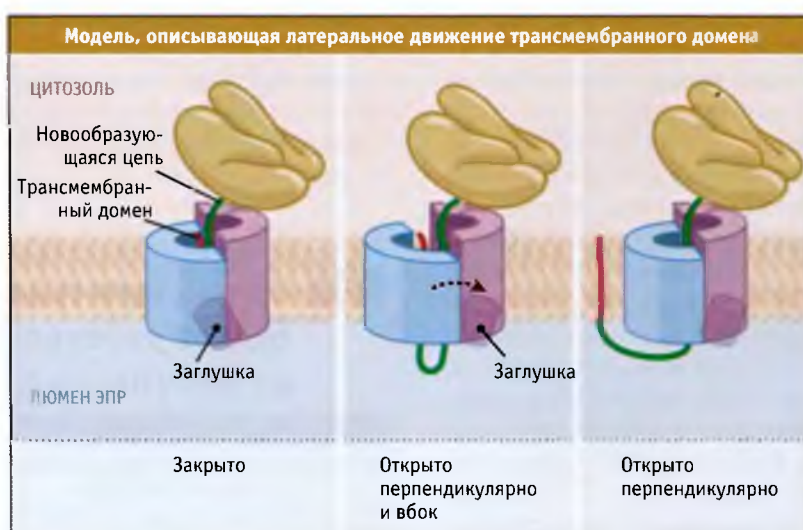
3.10 Трансмембранные белки выходят из канала транслокации и входят в липидный бислой

Основные положения

- Образование трансмембранных белков должно включать этапы узнавания трансмембранных доменов и их интеграцию в липидный бислой
- Трансмембранные домены выходят из транслокона в латеральном направлении через белок-липидную поверхность раздела



Сигнальные якорные последовательности переносятся непосредственно от SRP на транслокон, однако узнавание внутренних трансмембранных доменов должно происходить по мере их высвобождения из рибосомы



Транслокон изображен в виде цилиндра, который открывается и закрывается двумя способами, позволяющими движение новообразующейся цепи через пору и продвижение в мембрану трансмембранного домена

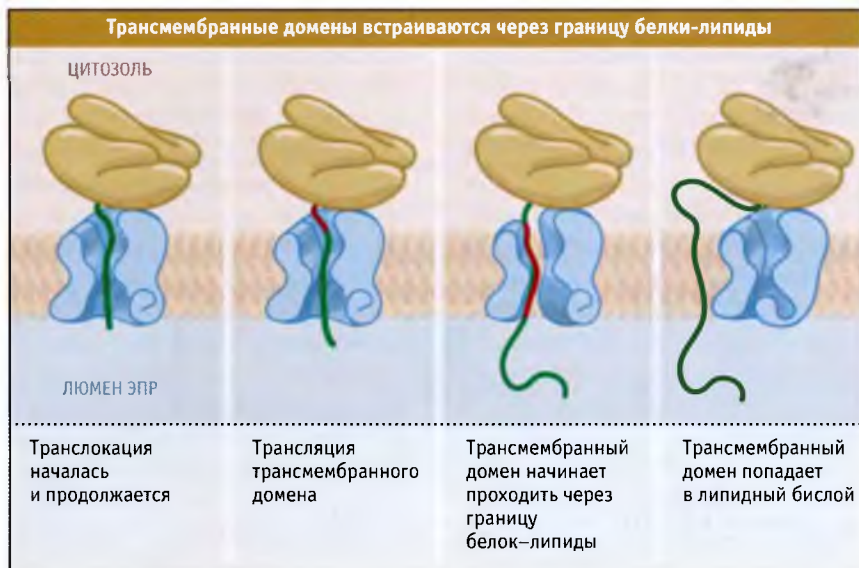


Рис. 3.15 Промежуток в стенке канала транслокации позволяет белкам поступать в липидный бислой, а также узнавать и встраивать трансмембранные домены. Поскольку домены обладают гидрофобными свойствами, они предпочитают липидное окружение и мигрируют из канала в липидный бислой

В некоторых случаях транслокон может по-другому идентифицировать трансмембранный домен. Например, иногда в процессе синтеза трансмембранного домена изменения во взаимодействии между рибосомой и транслоконом происходят до того момента, как домен сошел с рибосомы. Эти изменения служат для транслокона сигналом о скором появлении трансмембранного домена. Каким образом трансмембранный домен вызывает изменения в рибосоме и передает их транслокону, остается невыясненным. Иногда для узнавания также необходимы полярные элементы новообразующей цепи, примыкающие к трансмембранному домену. Это позволяет предположить, что, по крайней мере, в некоторых случаях процесс узнавания должен включать нечто большее, чем просто гидрофобное взаимодействие между доменом и каналом-липидным окружением.

Граница канала и липидного слоя, по-видимому, служит путем выхода трансмембранных доменов из канала после их узнавания. Однако механизм выхода домена из транслокона несколько варьирует от субстрата к субстрату. Некоторые домены покидают транслокон почти сразу после узнавания их в канале. В этих случаях трансмембранный домен сначала контактирует с Sec61α и с липидами, а затем только с липидами; при этом предполагается, что домен уже проник в липидный бислой. Для интеграции таких доменов других белков, за исключением комплекса Sec61, не требуется. Другие трансмембранные домены интегрируются более медленно и после узнавания долго не выходят из транслокона, иногда даже оставаясь там до окончания трансляции. По мере выхода из канала в бислой эти трансмембранные домены вступают в контакт с белком TRAM, хотя его дальнейшая роль остается пока неясной. Степень гидрофобности частично определяет,

интегрируется ли трансмембранный домен сразу же, или это происходит на более позднем этапе синтеза белка. Более гидрофобные домены могут быстрее продвигаться в липидный бислой, но менее гидрофобные могут оставаться на границе, и им необходимы дополнительные транспортные факторы. Не исключено, что TRAM и другие белки служат шаперонами для некоторых трансмембранных доменов (см. 3.15 *Шапероны способствуют сворачиванию вновь транслоцированных белков*). Они способствуют интеграции таких доменов, гидрофобность которых оказывается недостаточной для перемещения. Очевидно, что по крайней мере группа трансмембранных белков может представлять собой множественные формы, содержащие определенный домен, который в одних случаях интегрируется в мембрану, а в других остается неузнанным. Такие белки, как TRAM, могут определять, при каких условиях такие замены будут интегрированы.

3.11 Ориентация трансмембранных белков определяется способом их интеграции в мембрану

Основные положения

- Трансмембранные белки должны быть ориентированы с учетом строения мембраны
- Механизм интеграции трансмембранных доменов зависит от типа белка, причем особенно это относится к белкам, которые пронизывают мембрану более одного раза

Процессы узнавания трансмембранных доменов и их интеграция осложняются необходимостью определен-

ной ориентации каждого белка в мембране ЭПР. Для некоторых мембранных белков N-терминальные домены должны располагаться на цитозольной стороне мембраны, а для других требуется противоположная ориентация. Ориентация белка в мембране определяется в ходе процессов его адресования и транслокации.

Проще всего понять, каким образом ориентируются белки, которые пронизывают мембрану один раз и в составе которых присутствует отщепляемая N-терминальная сигнальная последовательность. Транслокация этих белков начинается так же, как и секреторных белков, т. е. адресование и инициация транслокации осуществляются с помощью сигнальной последовательности. Транслокация продолжается до тех пор, пока трансмембранный домен не сойдет с рибосомы, т. е. до начала интеграции. В результате, C-терминальный домен не переносится, а остается с цитозольной стороны мембраны (рис. 3.23). К числу мембранных белков такого типа относятся рецептор ЛНП и предшественник амилоида.

В отличие от трансмембранных белков с отщепляемой сигнальной последовательностью, адресование белков с сигнальной якорной последовательностью происходит с участием внутреннего трансмембранного домена (сигнального якоря). В зависимости от бел-

ка трансмембранный домен может находиться в одной из двух ориентаций. От того, как он интегрируется, зависит дальнейшая ориентация всего белка (). Некоторые домены приводят к транслокации C-терминального участка; домены, интегрирующиеся в противоположном направлении, вызывают транслокацию N-терминального участка. Другой класс мембранных белков интегрируется с C-терминального гидрофобного конца, а другая часть белка остается в цитозоле. Поскольку эти трансмембранные домены локализованы на C-терминальных концах белков, они должны узнаваться посттрансляционно. Механизм интеграции этих белков, включая вопрос использования ими транслокационного канала SecY1, исследован недостаточно.

Что определяет ориентацию трансмембранного домена в транслоконе? У бактерий, по-видимому, это определяется распределением заряженных остатков, расположенных по бокам от трансмембранного домена. Заряженные молекулы липидов асимметрично распределяются между двумя слоями плазматической мембраны бактериальной клетки, что объясняет ориентацию. Однако липиды в мембране ЭПР не распределены асимметрично по отношению к заряду, так что это не объясняет ориентацию у эукариот. Наряду

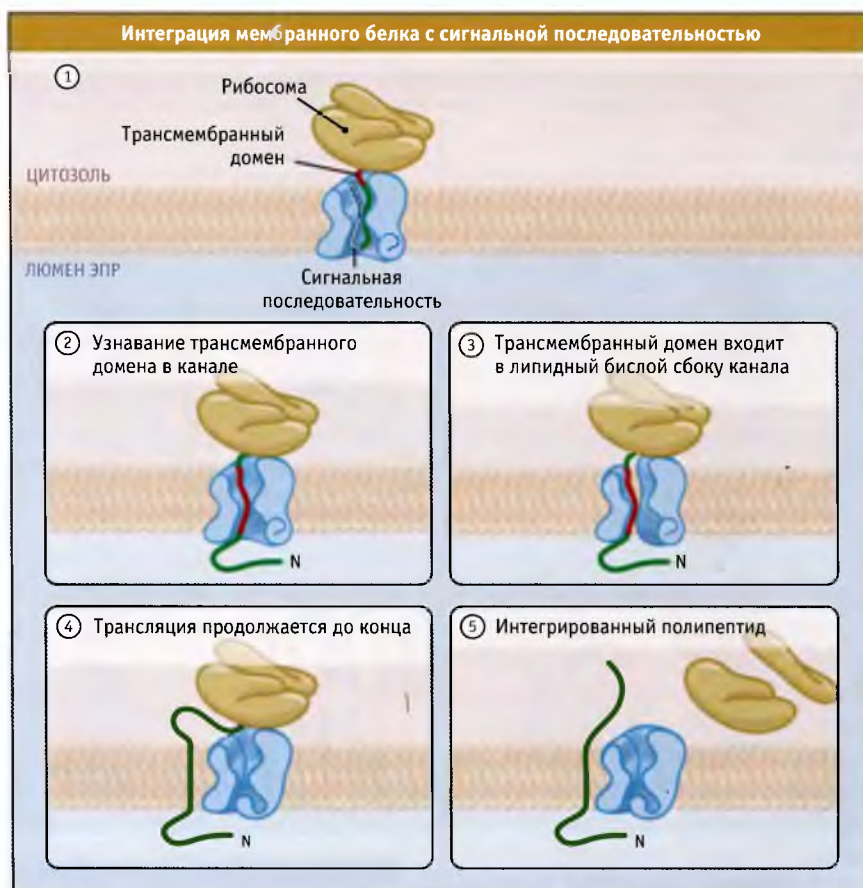


РИС. 3.23. Сигнальная последовательность инициирует транслокацию, которая протекает, как и для секреторных белков, до момента трансляции трансмембранного домена и узнавания его в канале. При этом белки могут интегрироваться только в одной ориентации

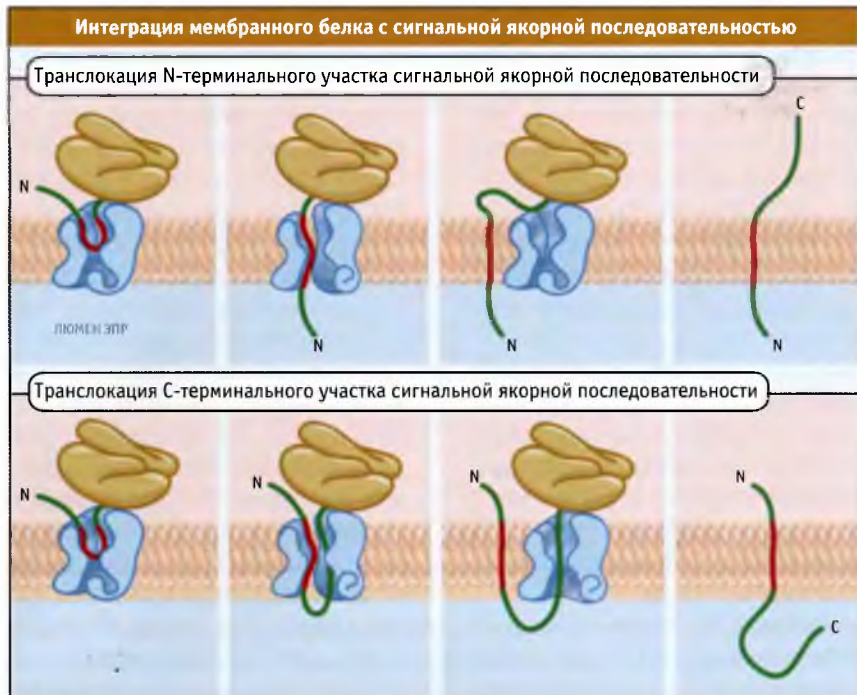
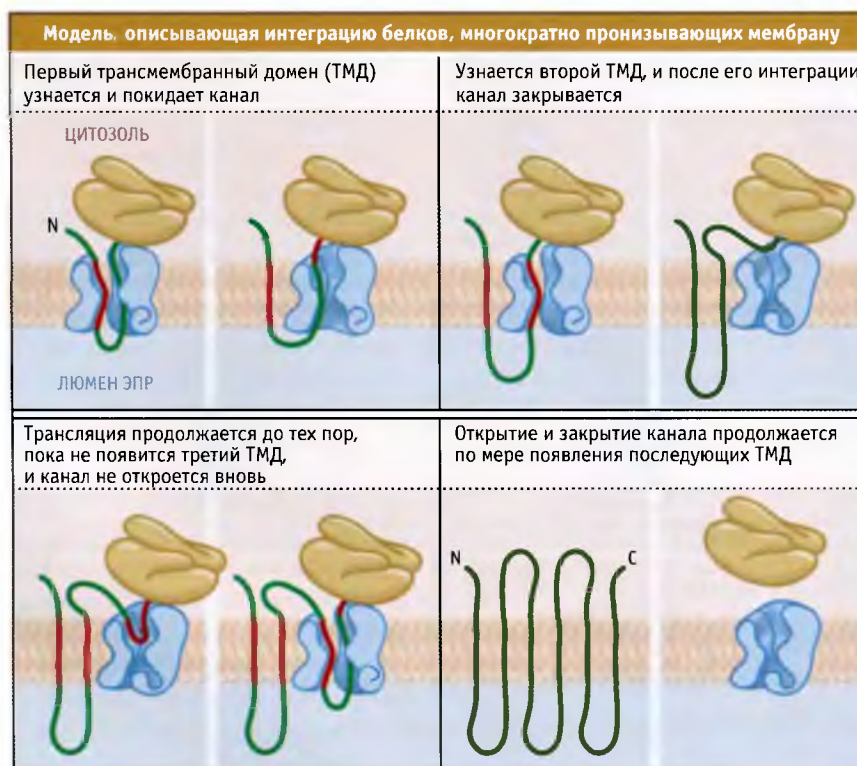


рис. 3.24 В зависимости от белка, или N- или С-терминальный участок сигнальной якорной последовательности транслируется после ее первоначального взаимодействия с каналом. Поэтому мембранные белки ориентируются по-разному



Согласно этой модели, транслокация трансмембранных доменов происходит по очереди. Ориентация первого домена определяет ориентацию белка в целом. Показано, что трансляция была инициирована сигнальной якорной последовательностью, но модель также применима к белкам, позиционированным с помощью сигнальной последовательности, которая после этого отщепляется

с этим, некоторые белки могут принимать множество топологических форм, что позволяет предположить участие других факторов ориентации. В общем, механизм ориентации трансмембранных доменов у эукариот остается пока неясным.

Столь же трудно выявить факторы, управляющие интеграцией и ориентацией политопных белков, т. е. белков, несколько раз пронизывающих мембрану. Простейшая модель предполагает, что трансмембранные домены интегрируются один за другим по мере их появления в канале. Ориентация всего белка определяется свойствами его первого трансмембранного домена. Этот механизм объясняет лишь некоторые случаи, и часто процесс протекает более сложным образом. Трансмембранные домены не обязательно интегрируются сразу после их узнавания, и в некоторых случаях на транслоконе могут одновременно позиционироваться, по крайней мере, два домена. Эти домены могут интегрироваться парой, а не поодиночке. До интеграции трансмембранные домены в результате взаимодействия друг с другом могут реориентироваться. Таким образом, последовательность событий интеграции политопного мембранного белка носит индивидуальный характер, и его ориентация определяется суммарным влиянием нескольких участков, присутствующих в первичной последовательности.

Интеграция больших белков пока не исследована детально. Однако на основании известных процессов инициации, транслокации и интеграции трансмембранных доменов для небольших мембранных белков предложена соответствующая модель (рис. 3.12). При исследовании в электронном микроскопе комплекса рибосома-транслокон между рибосомой и каналом обнаружен промежуток величиной около 15°. Узнавание трансмембранного домена в канале, вероятно, тормозит транслокацию, и при этом последующая порция новообразующейся цепи проходит в цитозоль через этот промежуток. Возможно, что изменение структуры рибосомы облегчает этот процесс. Следующий гидрофобный домен, сходящий с рибосомы, вероятно, имеет высокое сродство к сайту канала, связывающемуся с сигнальной последовательностью/трансмембранным доменом, и цепь опять входит в канал, возобновляя транслокацию. Циклы транслокации приостанавливаются и возобновляются до тех пор, пока не завершится синтез и узнавание всех трансмембранных доменов.

3.12 Сигнальные последовательности удаляются сигнальной пептидазой

Основные положения

- По мере транслокации в люмен ЭПР растущие цепи часто подвергаются ковалентной модификации
- Комплекс сигнальной пептидазы отщепляет сигнальные последовательности

Часто по мере транслокации в ЭПР белки ковалентно модифицируются. Наиболее часто происходят следующие три типа модификаций:

- удаление сигнальной последовательности;
- присоединение сложного углеводного остатка (**N-гликозилирование**); и
- присоединение фосфолипида **глицозилфосфатидилинозитола (ГФИ)**.

Почти каждый белок, поступающий в ЭПР или интегрирующийся в мембрану, подвергается, по крайней мере, одной из этих модификаций.

Наиболее очевидна необходимость отщепления сигнальной последовательности. Если эти последовательности сохраняются, то могут препятствовать образованию нативной структуры белков после транслокации. Также они могут быть ошибочно приняты за сигнальный якорь и вызвать интеграцию секреторных белков в мембрану ЭПР. Поэтому сигнальные последовательности относятся к «одноразовым» структурам. После выполнения своих функций по адресованию новообразующихся полипептидов в ЭПР и участия в начальных этапах транслокации, они удаляются и отбрасываются. Отщепление сигнальной последовательности представляет собой универсальное событие транслокации секреторных и таких трансмембранных белков, в которых эта последовательность не является трансмембранным доменом.

Отщепление сигнальной последовательности происходит под действием комплекса мембранных белков, состоящего из пяти субъединиц, который называется комплексом **сигнальной пептидазы (SPC)**. Только две субъединицы комплекса обладают протеолитической активностью, три других, вероятно, играют регуляторную роль. Поскольку новообразующаяся цепь входит в канал транслокации в виде петли, сайт деградации, по видимому, должен располагаться внутри мембраны ЭПР, обращенной в сторону люмена, при его разрезании SPC.

Местоположение сайта отщепления сигнальной последовательности зависит от белка и в значительной степени определяется аминокислотным окружением. Остаток, расположенный с N-терминальной стороны от места расщепления; должен быть представлен аминокислотой с короткой боковой цепью, а остаток, расположенный от него через три аминокислоты, должен принадлежать незаряженной аминокислоте. Для некоторых белков, поблизости от истинного сайта деградации существует несколько подобных сайтов, и неизвестно, каким образом выбирается нужный. На положение сайта расщепления могут также влиять некоторые неизвестные свойства сигнальной последовательности.

Обычно отщепление сигнальной последовательности происходит после того, как размеры белковой цепи достигли порядка ста или более аминокислот; более точно это определяется самой сигнальной последовательностью. Для некоторых белков отщепление происходит в гораздо более поздние сроки. Иногда до отщепления сигнальная последовательность может влиять на взаимодействие белка с другими факторами ЭПР, включая те, которые участвуют в модификации растущей цепи или в

образовании нативной структуры. Особенности строения сигнальной последовательности, которые влияют на время ее отщепления, остаются пока неизвестными.

Отщепившийся сигнальный пептид иногда подвергается дальнейшему протеолизу. Это осуществляется с помощью ферментного комплекса, который называется пептидазой сигнального пептида (SPP, в противоположность сигнальной пептидазе, которая удаляет сигнальный пептид из новообразующейся цепи). Эта пептидаза активна в отношении определенного набора отщепляемых сигнальных пептидов, что позволяет предполагать существование у нее более сложных функций, чем просто удаление использованного сигнального пептида. Однако подробности ее функционирования неизвестны.

3.13 К некоторым транслоцированным белкам добавляется гликолипидная группа ГФИ

Основное положение

- Добавление ГФИ ковалентно фиксирует С-концевой участок некоторых белков на липидном бислое

Довольно значительная часть белков, которые переносятся в ЭПР, модифицируется за счет ковалентного связывания с фосфолипидным остатком. Посредством ковалентного связывания с мембранным гликолипидом (мембранный фосфолипид, связанный полярной головкой с сахарной структурой), который называется гликозилфосфатидилинозитол (ГФИ), переносимый белок может фиксироваться на липидном бислое со стороны люмена. В результате белок остается связанным с мембраной. При этом трансмембранный белок может иметь на мембране дополнительную точку связывания. Причина, почему белок связывается с мембраной посредством ГФИ, а не путем интеграции, остается неясной. Существуют данные о том, что в результате связывания с ГФИ отбираются белки, предназначенные для внутриклеточного транспорта, например на апикальную поверхность поляризованных клеток, в кавеолы плазматической мембраны, или в липидное окружение. Белки, связанные с мембраной посредством липида, обладают большей подвижностью в пределах мембраны, чем интегрированные белки, поскольку липиды быстрее диффундируют в мембране. Также интегрированные белки с трудом выходят из мембраны, а белки, связанные посредством ГФИ, могут освободиться при ферментативном удалении гликолипида. Таким образом, белок может освобождаться из мембраны в ответ, например, на получаемый клеткой сигнал.

ГФИ представляет собой сложную структуру, которая должна синтезироваться раньше, чем она присоединится к белкам. Как показано на рис. 3.15, синтез ГФИ начинается на мембране ЭПР со стороны цитозоля. При этом происходит взаимодействие мембранного фосфолипида фосфатидилинозитола (PI) с N-ацетилглюкозамином

(GlcNAc). В дальнейшем происходит деацетилирование GlcNAc-PI и добавляются три остатка маннозы. Фосфоэтаноламин добавляется к каждому остатку маннозы, и при этом образуется конечный субстрат ГФИ. Во время протекания этих реакций один из промежуточных продуктов транспортируется через мембрану и оказывается со стороны люмена, где добавляется к перенесенным белкам. Изменение расположения продукта по сторонам мембраны, по-видимому, происходит за счет действия транслоказы или «флиппазы». Впрочем, эту флиппазу еще следует обнаружить, так же как и выяснить, на какой стадии синтеза ГФИ она действует.

Добавление ГФИ требует узнавания новообразованной цепи, которая является субстратом, и переноса остатка ГФИ на соответствующий акцепторный сайт. Сигналом добавления ГФИ служит небольшой гидрофобный домен, расположенный с С-терминальной стороны. Длина его обычно составляет от десяти до тридцати аминокислотных остатков. Подобно N-терминальным сигнальным последовательностям, сигнал ГФИ меняется от белка к белку, такие сигналы разных белков взаимозаменяемы. Когда присоединяется ГФИ, его сигнальная последовательность удаляется, и остаток ГФИ добавляется к новому остатку с С-терминальной стороны, который называется сайт омега (ω). Таким образом, так же как и сигнальная последовательность, ГФИ сигналы имеют одноразовую природу — они используются и затем отбрасываются.

Интегральный мембранный белок состоит, по крайней мере, из двух компонентов, Gaa1p и Gri8p, катализирующих связывание с ГФИ. Наиболее вероятный механизм связывания включает двухэтапную реакцию трансаминирования (рис. 3.16). На первом этапе фермент образует ковалентный интермедиат с сайтом ω , что приводит к отщеплению С-терминального пептида от остального белка. Затем терминальный фосфоэтаноламиновый остаток ГФИ вступает в контакт с новообразующимся белком при участии фермента и добавляется к сайту ω . При этом образуется ГФИ-связанный белок и освобождается фермент. Неизвестно, требуются ли для этого АТФ или ГТФ и необходима ли для добавления ГФИ предварительная интеграция сигнальной последовательности в бислой.

Хотя присоединение ГФИ катализируется трансаминазой, а не протеазой, существует поразительное сходство между процессами узнавания и отщепления сигнальной последовательности и ГФИ сигнала. Сигнальная последовательность и сигнал ГФИ достаточно сходны в том отношении, что часто могут выполнять одинаковые функции, если в белке занимают одно и то же положение. В некоторых случаях обычная N-терминальная сигнальная последовательность может служить в качестве ГФИ сигнала, если она сливается с С-терминальным участком секреторного белка. Оба типа сигналов узнаются как трансмембранные домены и интегрируются в бислой, если находятся в середине молекулы белка. Сайты расщепления двух этих типов сигналов также сходны. Все эти черты сходства позволяют предполагать интригующую возможность, что в узнавании двух типов сигналов могут участвовать одни и те же белки.

3.14 В процессе переноса ко многим белкам добавляются сахарные остатки

Основное положение

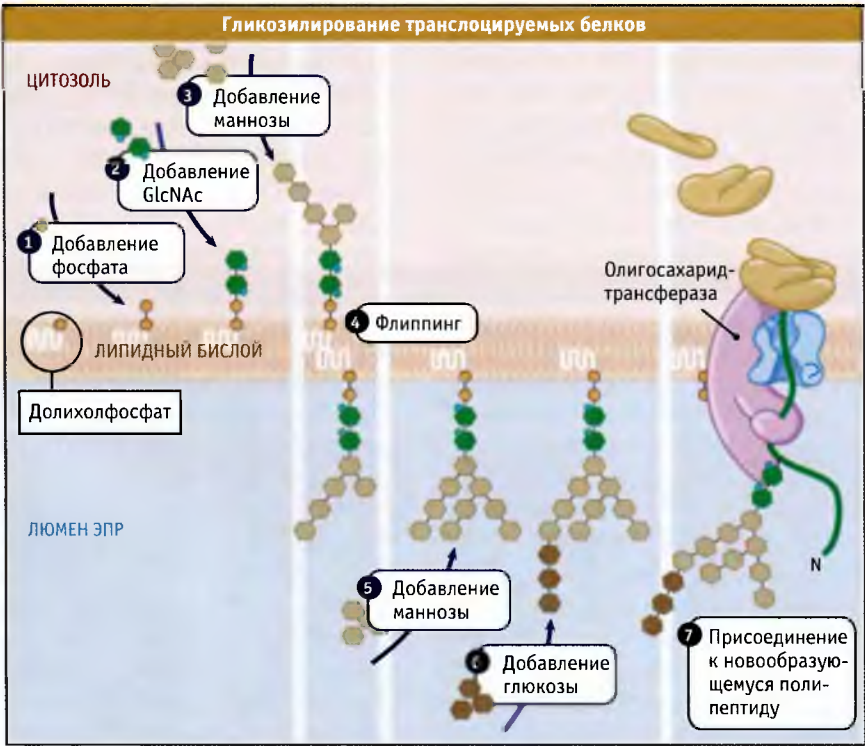
- Во время переноса многих белков в ЭПР олигосахарил-трансфераза катализирует процесс их N-гликозилирования

Во время переноса многих белков в ЭПР к ним ковалентно присоединяются большие комплексы сахарных остатков. Такая форма ковалентной модификации очень распространена: более половины секреторных и мембранных белков могут присоединять сахарные остатки, а многие модифицируются в нескольких местах полипептидной цепи. Поскольку этот процесс затрагивает аспарагиновые остатки (обозначаемые «N»-остатки), то он называется N-гликозилированием.

Гликозилирование может выполнять несколько функций. Выяснение этих функций достаточно затруднительно, поскольку многие гликозилированные белки не утрачивают своих функций при ингибировании этого процесса. Однако в некоторых случаях удалось выяснить роль гликозилирования. Пока белки находятся в ЭПР, присоединение к ним остатков сахаров спо-

собствует приобретению ими нативной структуры или же облегчает их деградацию. Роль этих модификаций у белков, находящихся вне ЭПР, остается менее ясной. По некоторым данным, гликозилирование белков служит механизмом изменения их функций. Например, секреция и активность фолликулостимулирующего гормона меняются в соответствии с изменением степени гликозилирования. В других случаях углеводные остатки могут способствовать растворимости белков или защищать их от деградации внеклеточными протеазами.

В процессе N-гликозилирования к белку, находящемуся в люмене ЭПР, присоединяются крупные промежуточные компоненты (). Синтез интермедиатов начинается в цитозольном слое мембраны с добавления двух остатков GlcNAc и пяти остатков маннозы к фосфатной группе долихолфосфата, одного из минорных мембранных фосфолипидов. Затем этот предшественник переносится на противоположную сторону мембраны при помощи неидентифицированной флиппазы. Там к нему добавляются четыре дополнительных остатка маннозы, что приводит к образованию трех ответвлений. Наконец, к одной из трех маннозных ветвей добавляются три остатка глюкозы, образуя молекулу, которая служит источником углеводов при гликозилировании.



Сложная углеводная структура образуется на фосфолипиде долихолфосфате в результате протекания нескольких последовательных реакций. Синтез начинается на мембране ЭПР со стороны цитоплазмы, а заканчивается на стороне, обращенной в сторону люмена. Образуемая олигосахаридная структура переносится на транслируемые белки ферментом олигосахаридтрансферазой. Модификация происходит по аспарагиновым остаткам, присутствующим в последовательности

Перенос разветвленной углеводной структуры с до-
лихолфосфата на субстрат происходит при транслока-
ции. Процесс катализируется сложным мультисубъеди-
ничным ферментативным комплексом **олигосахарид-
трансферазой (ОСТ)**. Две субъединицы ОСТ, рибофо-
рин I и II, пронизывают мембрану ЭПР и могут взаимо-
действовать со связанной рибосомой (отсюда их назва-
ние), позиционируя комплекс ОСТ в непосредственной
близости от канала. ОСТ модифицирует аспарагиновые
остатки, когда за ними расположены любые аминокисло-
ты, кроме пролина, а затем серин или треонин (N-X-S/T).
После того как сайт выйдет из канала, гликозилирование
происходит очень быстро; до его начала в люмен необ-
ходимо войти только 10–12 аминокислотным остаткам.
Узнавание сайтов происходит достаточно эффективно: в
клетке используется примерно 90% потенциальных сай-
тов, однако некоторые сайты не используются никогда.
В зависимости от условий, степень гликозилирования
того или иного белка меняется. После прохождения на-
чального гликозилирования в ЭПР и в аппарате Гольджи
в разные моменты происходят различные модификации
структуры олигосахаридов, которые включают удаление
и добавление сахарных остатков.

фектной нативной структуре белка или к его агрегации
при взаимодействии с другими белками. *In vivo* молеку-
лярные шапероны способствуют образованию нативной
структуры белка, обеспечивая надлежащее окружение
для протекания этого процесса и контроль за его резуль-
татами. Структурные перестройки могут повторяться до
тех пор, пока белок не приобретет правильную натив-
ную конформацию. Шапероны в ЭПР очень активны и
составляют основу системы контроля структуры белка.
Пока белок связан с шаперонами, он не может выйти из
ЭПР и транспортироваться в аппарат Гольджи.

Многие распространенные шапероны ЭПР род-
ственны шаперонам цитозоля. В люмене к числу наибо-
лее полно охарактеризованных шаперонов относится
белок BiP, из группы hsp70. Этот белок — самый часто
встречающийся в ЭПР и взаимодействует со многими
белками на ранних этапах образования их нативной
структуры.

Поскольку обычно гидрофобные области скрыты в
сердцевине глобулярных белков, присутствие на поверх-
ности молекулы гидрофобных участков свидетельствует
о том, что белок полностью не приобрел нативную струк-
туру. Эти участки служат местами связывания BiP с натив-
ной цепью. За счет последовательных циклов гидролиза
АТФ BiP неоднократно связывается с новообразующимся
белком и высвобождается. Тем самым предупреждается
агрегация образующегося белка и облегчается образова-
ние им правильной нативной структуры. На активность
BiP в качестве шаперона влияют дополнительные белки,
стимулирующие гидролиз АТФ, а также белки, способству-
ющие обмену АДФ на АТФ. Возможно, что таким образом,
в зависимости от потребностей клетки, может регулиро-
ваться скорость образования нативной структуры белка.
После того как белок образовал компактную структуру,
гидрофобные участки которой находятся внутри, связы-
вание BiP прекращается (рис. 3.29). Очень высокое содер-
жание BiP в люмене ЭПР позволяет предполагать, что он
является одним из первых шаперонов, с которыми встре-
чается большинство новообразующихся белков, и что при
попытке формирования нативной структуры поблизости
всегда оказываются молекулы BiP. Данный белок с самого
начала участвует в этом процессе и играет основную роль
в облегчении скручивания белковой цепи.

К другим шаперонам, содержащимся в люмене и
цитозоле, относится белок Grp94, принадлежащий к
семейству hsp90. Хотя этот белок, так же как и BiP, на-
ходится в люмене в больших количествах, в отличие от
последнего он связывается с белками, которые уже час-
тично приобрели нативную структуру, а не с теми, кото-
рые только что вышли в люмен и таковой не обладают.
Grp94 взаимодействует с меньшим количеством субстра-
тов, чем BiP, и неизвестно, какое свойство белка он узна-
ет. Вероятно, функция его в основном заключается в том,
чтобы способствовать эффекту BiP и других шаперонов,
участвующих в формировании нативной структуры. Су-
ществование белка Grp94 служит показателем того, что
контроль качества образования нативной структуры
белковой цепи носит многоуровневый характер.

3.15 Шапероны способствуют сворачиванию вновь транслоцированных белков

Основное положение

- Молекулярные шапероны связываются с белками в люмене и обеспечивают образование их нативной структуры

После того как новообразующиеся полипептиды подвер-
глись переносу и модификации, у них начинает обра-
зовываться нативная структура. Образование нативных
структур белков представляет собой один из наиболее
активных процессов, происходящих в люмене ЭПР, куда
постоянно поступают транслоцированные белки. Пос-
кольку белки, обладающие дефектной нативной структу-
рой, представляют большую опасность для клетки, одна
из главных функций ЭПР заключается в контроле за на-
тивной структурой белков, вступающих на секреторный
путь. Для этого в ЭПР существует активная система кон-
троля качества, которая распознает нескрученные или
неправильно скрученные белки и либо обеспечивает им
возможность принять правильную нативную конфигу-
рацию, либо вызывает их деградацию.

Для образования нативной структуры в ЭПР харак-
терны те же проблемы, что и для ее образования в ци-
тозоле. Движущей силой при формировании нативной
структуры белка являются гидрофобные взаимодействия:
гидрофобные домены проявляют тенденцию связывать-
ся друг с другом, а не оставаться в водном окружении
(см. MB10:3-0003). Однако гидрофобные домены могут
связываться неправильным образом, что приводит к де-

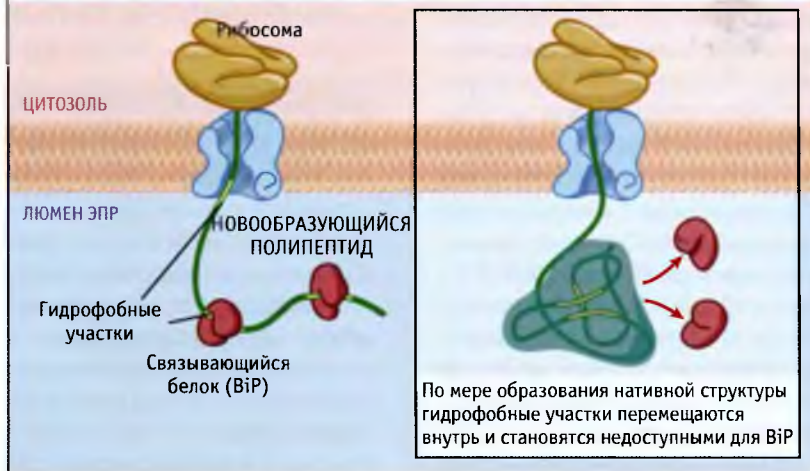


РИС. 3.29. BiP связывается с открытыми гидрофобными областями транслоцированных белков. После приобретения белком нативной структуры его гидрофобные участки оказываются в глубине и более недоступны для BiP

3.16 При сворачивании белковой молекулы образование правильно ориентированных дисульфидных связей обеспечивается протеиндисульфидизомеразой

Основное положение

- Протеин-дисульфид-изомераза катализирует образование дисульфидных связей и процессы молекулярной перегруппировки в ЭПР

Поскольку белки BiP и Grp94 находятся и в цитозоле, система специальных шаперонов должна также присутствовать в люмене ЭПР. Особенно важно, что белки были способны образовывать дисульфидные связи по мере необходимости. Образование дисульфидных связей является следствием окислительного окружения, характерного для люмена ЭПР и для внеклеточной среды. Дисульфидные связи возникают между цистеиновыми остатками при сворачивании белковой молекулы (хотя они иногда образуются также и между различными белками). Процесс катализируется семейством ферментов, называемых **протеиндисульфидизомеразы (ПДИ)**. Как показано на РИС. 3.30, эти ферменты могут образовывать не только надлежащим образом ориентированные дисульфидные связи, но часто в процессе скручивания образуют неправильные связи. Это приводит к возникновению неправильной конформации молекулы или даже к ее агрегации, если связи не могут занять правильное положение. В таких случаях ПДИ катализирует перегруппировку и образование новых дисульфидных связей. Таким образом, этот фермент и

другие тиоловые изомеразы обеспечивают молекулам насцентных белков необходимую гибкость, снимая ограничения, возникающие из-за дисульфидных связей.

ПДИ катализируют образование дисульфидных связей при участии цистеиновых остатков, находящихся в собственном активном центре (РИС. 3.31). Образование дисульфидной связи представляет собой окислительно-восстановительную реакцию, при которой происходит обмен электронов между цистеиновыми остатками белка и ПДИ. Для того чтобы началась реакция, катализируемая ПДИ, остатки цистеина в ферменте должны находиться в окисленном состоянии (в виде дисульфидной связи). Также должна присутствовать система их последующего окисления. Вначале предполагалось, что повторное окисление ПДИ происходит с участием небольшой молекулы глутатиона. Окисленная форма глутатиона селективно импортируется в люмен ЭПР и поддерживает ПДИ в окисленной форме. Однако недавно было показано, что, по крайней мере в некоторых белках, дисульфидные связи могут образовываться и перегруппировываться даже при отсутствии глутатиона. Сейчас кажется очевидным, что белок ЭПР, называемый Ero1p, главным образом отвечает за окисление ПДИ, хотя, возможно, определенную роль все-таки играет глутатион. Эта реакция схематически показана на РИС. 3.32. Сам Ero1p, вероятно, окисляется с участием флавинаденин динуклеотида (ФАД).

Как показано на РИС. 3.33, ПДИ использует другой механизм изомеризации существующих дисульфидных связей в неправильно скрученном белке. В этой реакции один из остатков цистеина в активном сайте ПДИ образует временную дисульфидную связь с цистеиновым остатком неправильно скрученного белка. Пока существует эта связь, образование нативной структуры может продолжаться, несмотря на связь с ПДИ. Когда белок принимает конформацию, при которой возможно обра-

В процессе созревания молекулы белка могут образоваться неправильные дисульфидные связи

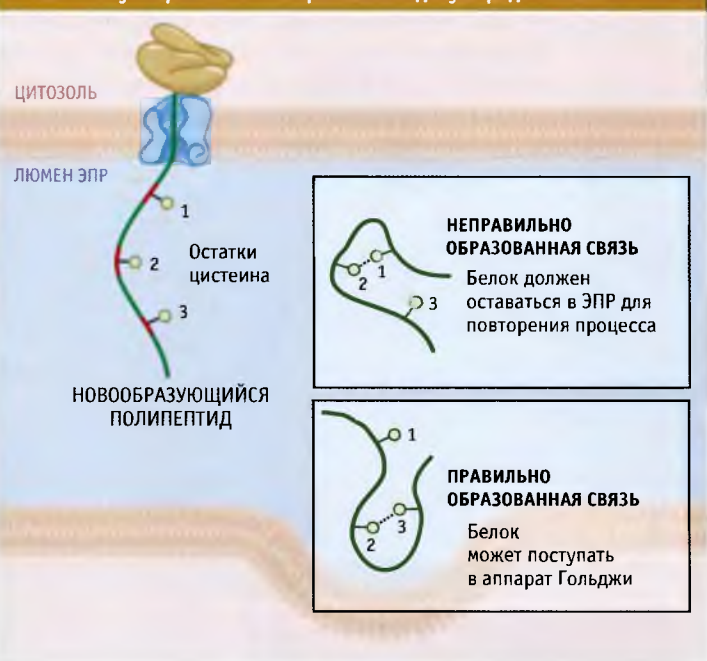


Рис. 3.30 При попытке транслоцированного белка приобрести нативную структуру могут образоваться неправильные дисульфидные связи. Эти связи должны узнаваться и заменяться на правильные до поступления белка в аппарат Гольджи

зование другой дисульфидной связи, связь с ПДИ разрывается. Каким образом ПДИ контролирует правильность образования дисульфидной связи и прекращает взаимодействовать с белком, пока неизвестно. Возможно, что плотная упаковка полипептидной цепи в правильно уложенном белке делает его дисульфидные связи недоступ-

ными для ПДИ. Наряду с оксидазным и изомеразным действием, ПДИ может действовать как шаперон, активность которого регулируется степенью его окисления. Хотя ПДИ является наиболее изученной тиолизомеразой и экспрессируется практически во всех тканях, известно много других типов шаперонов, содержащихся

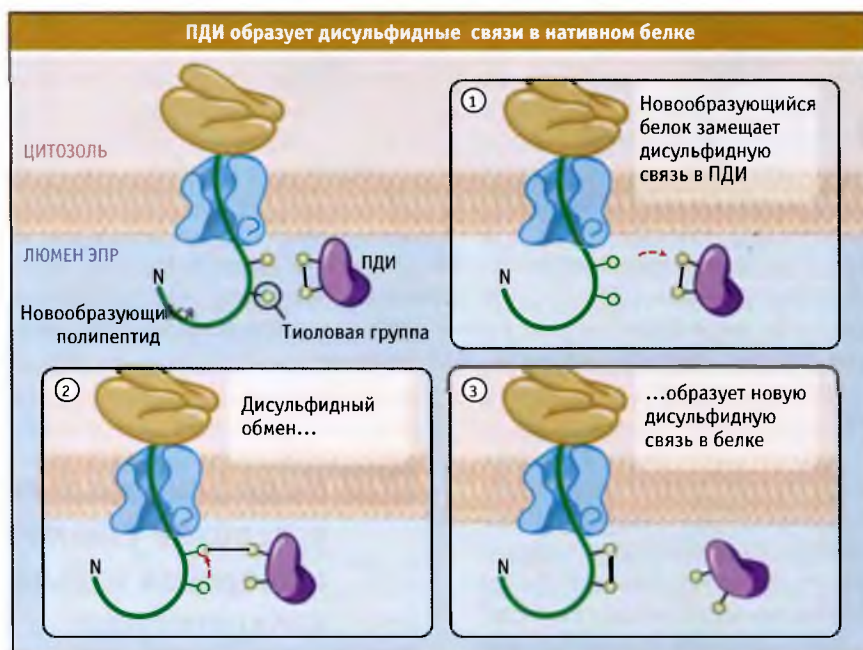
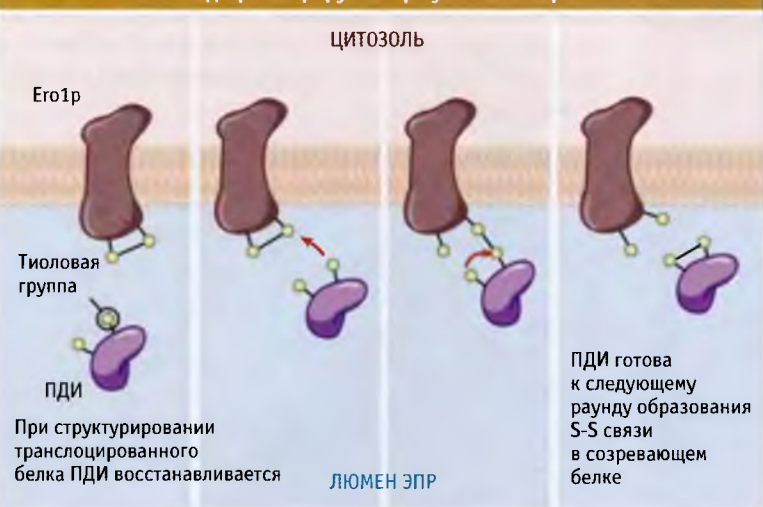
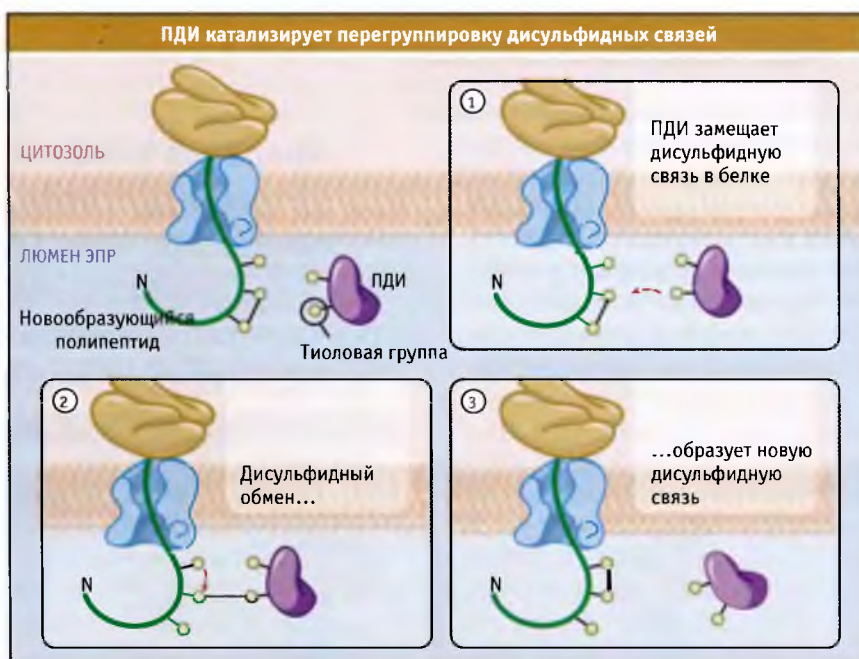


Рис. Дисульфидная связь в ПДИ используется для образования связи в новообразующемся полипептиде. После этого фермент регенерирует дисульфидную связь в ПДИ, так что этот механизм может использоваться многократно

ПДИ регенерируется при участии Ero1p



Белок Ero1 содержит дисульфидную связь, которая используется в реакции дисульфидного обмена при регенерации ПДИ. После окончания реакции дисульфидная связь в Ero1p регенерируется за счет протекания другой реакции, которая не требует ПДИ



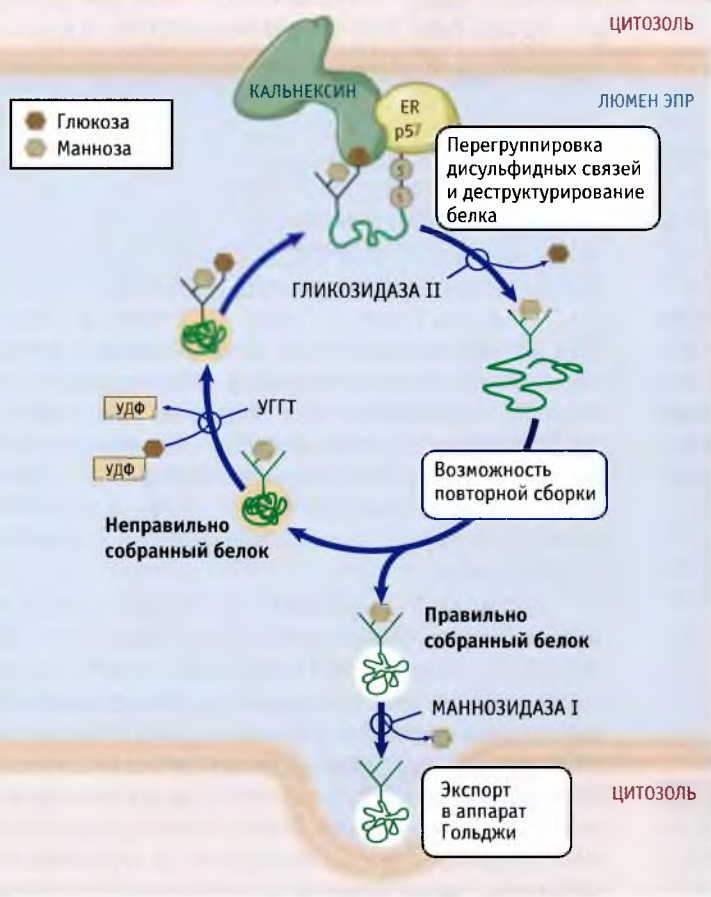
В процессе сворачивания белка неправильные дисульфидные связи могут узнаваться ПДИ. После соединения с ПДИ эти связи удаляются, и белок продолжает созревать до тех пор, пока за счет дисульфидного обмена в нем не образуется другая связь. Обратите внимание, что белок созревает, находясь в связанном с ПДИ состоянии

в люмене ЭПР, которые функционируют по окислительно-восстановительному принципу. Возможно, что некоторые или даже большинство из них обладают специфичностью по отношению к определенному типу клеток или даже субстратов. Интересно, что к этому семейству также относится белок ERdj5, способный также стимулировать гидролиз АТФ под действием BiP. Поэтому не исключено, что ERdj5 служит связующим звеном между процессами образования нативной структуры с участием белка BiP и перегруппировкой дисульфидных связей.

3.17 Модифицированные остатки углеводов узнаются системой шаперонов кальнексин/кальретикулин

Основное положение

- Кальнексин и кальретикулин сопровождают гликопротеины в повторяющихся циклах их взаимодействия с шаперонами, что контролируется присоединением и удалением глюкозы



Присутствие остатка глюкозы в составе N-концевого олигосахиарида дает возможность молекуле белка, обладающей неправильной структурой, еще раз связаться с кальнексином или кальретикулином и повторить попытку сборки нативной структуры. Остаток глюкозы добавляется к неправильно собранным белкам с помощью фермента УГГТ. Следовательно, фермент способен различать белки, имеющие правильную и неправильную структуру.

Еще одна форма контроля за образованием нативной структуры белка в ЭПР осуществляется шаперонами, зависящими от лектинов. При этом гликопротеины в люмене ЭПР связаны с белками, присоединяющими углеводы (**лектинами**). Эти лектины обычно представлены интегральным мембранным белком кальнексином и его гомологом, присутствующим в люмене, — кальретикулином. По-видимому, они не являются шаперонами. Их функция заключается в том, что они облегчают контакт новообразованных гликопротеинов с ПДИ и шапероном ERp57. Таким образом, гликозилирование транслоцированных белков представляет собой еще один путь контроля за их качеством. Хотя кальнексин и кальретикулин узнают несколько разные сайты гликопротеинов, они функционируют одинаково, и поэтому в данном разделе будет рассмотрен только кальнексин.

Как показано на рисунке, вступление белка в кальнексиновый цикл контролируется специфической модификацией углеводной структуры, которая добавляется к молекуле белка при его транслокации (см. 3.14 В процессе переноса ко многим белкам добавляются сахарные остатки). При первом добавлении углеводного остатка одна из его ветвей заканчивается тремя остатками глюкозы. Два дальних ос-

татки глюкозы быстро удаляются (гликозидазой I и II соответственно). При этом остается только ближайший остаток глюкозы. Затем кальнексин соединяется с этой формой белка, что обеспечивает его контакт с ERp57, который катализирует образование или перегруппировку дисульфидных связей и позволяет белку принять нативную структуру.

После приобретения белком нативной структуры под действием ERp57 последний остаток глюкозы удаляется из белка гликозидазой II. Белок, не имеющий гликозильных остатков, уже не является субстратом кальнексина. Однако если после одного кальнексинового цикла белок приобрел неправильную структуру, то под действием фермента УГГТ (УДФ-глюкоза-гликопротеин гликозил трансфераза), содержащегося в люмене, гликозилирование может пройти повторно. Это позволяет белку опять связаться с кальнексином и снова пройти цикл. Таким образом, остатки глюкозы могут добавляться к белку и отщепляться от него несколько раз, пока он не примет нативную структуру. При этом УГГТ играет критическую роль, поскольку представляет собой инструмент, позволяющий различать правильно и неправильно скрученный белок. УГГТ узнает открытые кластеры

гидрофобных остатков и может осуществлять повторное гликозилирование сайтов, находящихся вдали от тех областей молекулы, которые УГГТ узнает как нескрученные.

Хотя кальнексиновый цикл описан подробно, общепризнанное биологическое значение скручивания и раскручивания гликопротеинов, особенно в ходе описанного цикла, остается не совсем ясным. Фактически мыши, у которых ген кальнексина удален, доживают до взрослого возраста, и хотя дефицит кальретикулина оказывается летальным в процессе эмбрионального развития, это в большей степени связано его ролью в регуляции обмена ионов кальция в ЭПР (см. 3.24 *Морфологически и функционально ЭПР подразделяется на ряд отделов*), чем с участием в формировании нативной структуры. Возможно, что роли многочисленных систем шаперонов, существующих в люмене ЭПР, частично перекрываются, так, что утрата одного шаперона переносится клеткой.

3.18 Сборка белков в комплексы находится под контролем

Основное положение

- Субъединицы, которые не успели собраться в комплексы, удерживаются в ЭПР за счет взаимодействия с шаперонами

Помимо образования нативной структуры, некоторые белки должны образовывать комплексы. Большинство мультимерных секреторных и мембранных белков собираются в ЭПР, что добавляет еще один уровень сложности к процессам контроля их качества. В образовании олигомеров участвуют те же типы связей и молекулярных процессов, которые ответственны за формирование нативной структуры: гидрофобные ассоциации, дисульфидные связи и ионные взаимодействия. Соответственно, те же самые белки, которые обеспечивают скручивание цепи, контролируют их сборку в комплексы. В отсутствие сборки многие белки задерживаются в ЭПР, связанные со специфическими шаперонами. Например, тяжелые цепи иммуноглобулина остаются связанными с BiP до того момента, как они свяжутся с функциональными молекулами легкой цепи. Это приводит к удержанию несобранных тяжелых цепей в ЭПР, и только полностью готовые антитела выходят из ЭПР в аппарат Гольджи. Для удержания несобранных белков в ЭПР также используется **тиол-опосредованный контроль**. Специфические цистеиновые остатки, которые образуют в олигомере межмолекулярные дисульфидные связи, служат показателем состояния процесса сборки некоторых белков. Считается, что в отсутствие олигомеризации эти остатки образуют дисульфидные связи с членами семейства ПДИ, что

приводит к удержанию непользованных собранных белков в ЭПР. Наконец, первичная структура некоторых белков содержит уникальные сигналы для удержания их в ЭПР. Сигналы маскируются, когда происходит правильная сборка, позволяющая белкам покинуть ЭПР. Например, трансмембранный домен α -цепи рецептора Т-клеток, до тех пор пока он не является частью полностью собранного мультимерного рецептора, удерживается в ЭПР.

Наряду с описанными, в люмене ЭПР протекают и другие, более субстрат-специфические процессы контроля за сборкой белков. Например, белки пролил-4-гидроксилаза и Hsp47 участвуют в образовании нативной структуры и в сборке молекул проколлагена, которые собираются в характерные тройные спирали, уникальные для семейства коллагенов (см. 15.3 *Коллаген обеспечивает поддержку структуры ткани*). Субстратно-специфичные белки, выполняющие контрольные функции, часто способствуют процессам скручивания и секреции по неизвестным механизмам.

Часто при созревании и сборке новообразованные белки взаимодействуют более чем с одной системой шаперонов. Поверхность молекулы белка ограничена, поэтому каждое взаимодействие носит временный характер. Поэтому, прежде чем выйти из ЭПР, белок может транспортироваться от одной системы шаперонов к другой. Специфические факторы, с которыми реагирует белок, и последовательность реагирования с ними, варьируют от субстрата к субстрату и, по-видимому, определяются первичной структурой белка. Например, белки с сайтами гликозилирования в N-терминальной области вначале реагируют с кальнексином и с кальретикулином, если сайт гликозилирования расположен далее, то белок может связываться с BiP, уже потом — с кальнексином и с кальретикулином. Поскольку нативная структура белка находится под контролем нескольких различных систем, блокирование их доступа к одному из путей, например при удалении из молекулы сайтов гликозилирования или цистеиновых остатков, часто не предотвращает скручивание и секрецию белка.

Хотя в ЭПР были идентифицированы многие белки, обеспечивающие контроль качества, молекулярные механизмы их действия большей частью остаются неизвестными. Очевидно, что они способны различать белки с неправильной нативной конфигурацией, но не ясно, на чем это основано. Довольно легко отличить белки, не обладающие структурой высшего порядка, но каким образом отличить белки с неправильной структурой от правильно скрученных? Особенно непонятно, как УГГТ осуществляет контрольную функцию. Каким образом белки, образовавшие правильную олигомерную структуру, отличаются от неправильно агрегированных белков? Для полного понимания механизмов процессов контроля качества в ЭПР необходимо ответить на эти и другие аналогичные вопросы.

3.19 Неправильно свернутые белки ЭПР поступают в цитозоль, где подвергаются деградации

Основные положения

- Транслоцированные в ЭПР белки могут экспортироваться обратно в цитозоль, где они подвергаются убиквитинилированию и деградации протеосомой — процесс известный как деградация, связанная с ЭПР
- Белки возвращаются в цитозоль путем ретроградной транслокации, механизм которой менее понятен, чем механизм транслокации в ЭПР

Контроль за структурой белков, осуществляемый в ЭПР, обеспечивает экспорт только таких трансмембранных и секреторных белков, которые обладают правильной нативной конфигурацией, в то время как белки неправильной структуры удерживаются в ЭПР шаперонами и имеют шанс исправить конфигурацию. Однако что же происходит с белками, которым не удастся приобрести правильную структуру? Такие белки должны каким-то образом деградировать. Одним из путей решения этой проблемы служит использование ретроградной транслокации (иногда называемой *дислокация* или *ретротранслокация*) для экспорта неправильно собранных белков обратно в цитозоль. Там они взаимодействуют с убиквитином и деградируют с участием больших протеазных комплексов, протеосом (см. ВСНМ:В-0001). Этот путь деградации называется — **деградация, связанная с ЭПР (ERAD)**.

Открытие этого пути последовало после понимания того факта, что белки, обладающие неправильной нативной структурой, не накапливаются в ЭПР, а деградируют. Первоначально предполагалось, что деградация происходит в самом ЭПР, однако, несмотря на тщательные поиски, в этой органелле не были обнаружены соответствующие протеазы. Вместо этого начали появляться данные о том, что белки деградируют под действием протеаз, содержащихся в цитозоле. Вначале было показано, что химические ингибиторы протеосом блокируют деградацию вновь синтезированного интегрального мембранного белка (CFTR, или регулятор трансмембранного переноса при кистозном фиброзе). Эти данные позволили предположить, что белки должны экспортироваться из ЭПР до деградации. В дальнейшем было показано, что ингибирование функций протеосом приводит к накоплению в цитозоле полностью транслоцированных белков.

Каким образом белок отбирается для ERAD? В отличие от процесса транслокации в ЭПР сигнальная последовательность на белке для его направления на деградацию отсутствует. Скорее всего, при ERAD распознаются какие-то свойства, которые отличают белки с неправильной структурой от белков, обладающих нативной конформацией или временно не имеющих правильной структуры высшего порядка. Например, мутация, которая дестабилизирует нативную структуру белка, может вызывать ее деградацию. Фактически мутировавший белок может быть признан субстратом для ERAD, даже если

мутация мало повлияла на его функцию. Даже белки, не обладающие заметными дефектами структуры, могут быть отобраны для ERAD, что свидетельствует о существовании скрытых, неизвестных нам признаков, которые, однако, узнаются клеткой.

Рис. 3.35 иллюстрирует основные этапы ERAD. Первый этап отбора белка для ERAD — это обнаружение неправильной структуры. Хотя мы и не знаем, каким образом это происходит, возможно, что существенную роль здесь играют шапероны. Однако ассоциация с шаперонами не может являться единственным критерием отбора белка для ERAD, поскольку шапероны участвуют в организации конформации всех новообразующихся белков. Не исключено, что сигнал к ретроградной транслокации зависит от промежутка времени, в течение которого белок находится в связанной с шаперонами форме. Шапероны остаются в связанной форме до тех пор, пока белок не приобретет нативную структуру. Если образование такой структуры невозможно, то белок дольше, чем обычно, будет оставаться связанным с шаперонами. Впрочем, вообще не ясно, каким образом продолжительность связи белка с шаперонами дает сигнал к ретроградной транслокации. В случае неправильной структуры гликопротеинов фермент α -маннозидаза I отщепляет маннозу и тем самым дает сигнал к деградации белка. Не ясно, однако, что служит сигналом к отщеплению маннозы.

После отбора белка для ретроградной транслокации, он должен пройти через мембрану ЭПР. Многочисленные генетические и биохимические данные позволяют предполагать, что роль канала ретроградной транслокации выполняет комплекс Sec61p. В некоторых случаях, однако, ретроградная транслокация не зависит от Sec61, и поэтому возникает вопрос о природе канала или даже о наличии нескольких каналов, специфичных для различных типов белков, обладающих неправильной структурой. Независимо от природы канала, для ретроградной транслокации надо выполнять те же шаги, как и для прямой транслокации. Для того чтобы прошел экспорт, белок должен вначале попасть в канал, канал должен открыться, и затем — белок пройти через него в цитозоль.

Большинство белков направляются на деградацию только после завершения транслокации. Неизвестно, остаются ли эти белки поблизости от транслокона, пока не разрешится вопрос об их деградации. Также неизвестно, каким образом неправильно скрученные белки попадают в канал ретроградной транслокации. Фактически вырисовывающаяся картина позволяет предполагать, что путь, по которому направляется субстрат из ЭПР, и белки цитозоля, необходимые для деградации, сильно зависят от типа деградируемого белка и от того, где в нем располагается неправильно скрученная область. Не исключено, что растворимые и трансмембранные белки деградируют по крайней мере частично отличающимися друг от друга путями и что среди трансмембранных белков эти пути зависят от положения мутации в домене люмена или цитозоля.

Как только белок оказался в ретроградном транслоконе, он, вероятно, начинает проходить через канал под

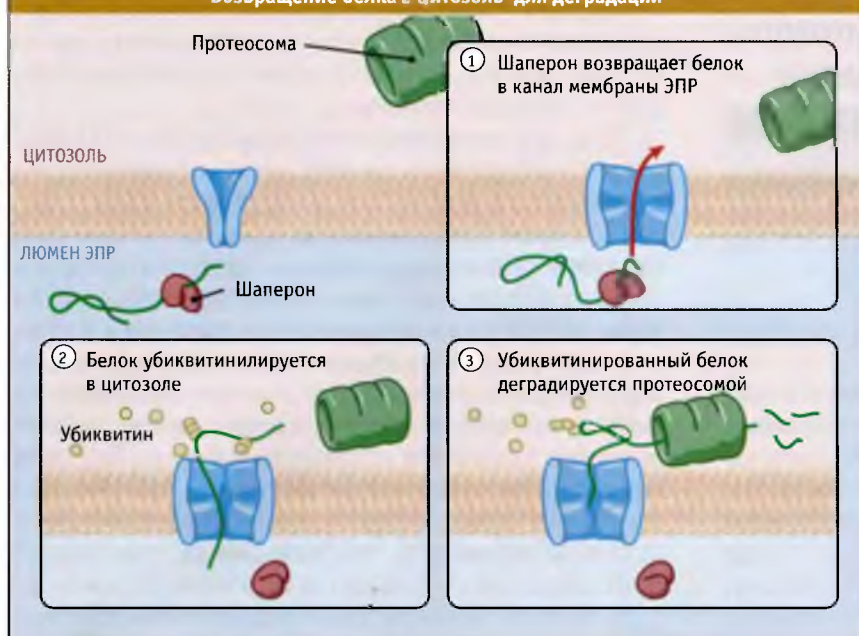


Рис. 3.35. При ретроградной транслокации белки с неправильной нативной структурой возвращаются из люмена ЭПР обратно в его мембрану и в цитоплазму. Там они подвергаются деградации в протеосомах. По-видимому, определенную роль в переадресовании играют шапероны люмена, поскольку они должны связываться с белками, обладающими неправильной нативной структурой

действием сил цитозоля. Убиквитинилирование играет роль в экспорте многих (хотя и не всех) субстратов. Большинство субстратов деградации подвергается полиубиквитинилированию, и убиквитинилирование происходит, пока они еще находятся в связанном с мембраной состоянии. Мутации в каком-либо компоненте системы убиквитина приводят к образованию в ЭПР агрегатов, состоящих из белков неправильной структуры. Это позволяет предполагать, что канал блокируется в случае, когда субстрат не может модифицироваться. Однако одного убиквитинилирования недостаточно для перехода белков в цитозоль. Также необходимо присутствие АТФазы цитозоля (p97 Cdc48 у дрожжей), которая связывается с мембраной ЭПР, при этом p97 связывает цитозольные кофакторы, которые прямо соединяются с субстратом ERAD. Пока неясно, каким образом эта АТФаза приводит к высвобождению субстрата в цитозоль, но аналогичные АТФазы бактерий и митохондрий непосредственно связываются с интегральными мембранными белками и извлекают их из мембраны. Не исключено, что АТФаза, требующаяся для ретротранслокации, действует аналогичным образом, связываясь или непосредственно с субстратом, или с присоединенным к нему остатком убиквитина и вытягивая белок из канала в цитозоль. Пока неизвестно, какую роль играет протеосома в процессе ретроградной транслокации.

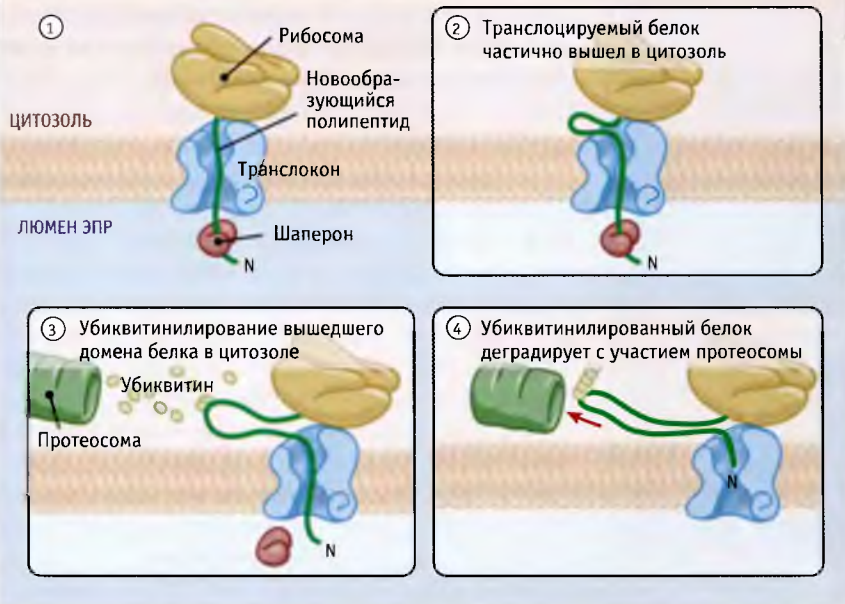
Еще одним ключевым компонентом системы ERAD является небольшой мембранный белок дерлин. Этот белок необходим для ретроградной транслокации некоторых белков, обладающих неправильной структурой. Показано, что он взаимодействует как с неправильно скрученным белком в ЭПР, так и с p97 через связывание с белком VIMP. Поэтому дерлин представляет собой, по крайней мере, один компонент молекулярного «моста»

между люменом ЭПР и аппаратом деградации цитозоля, хотя, конечно, существуют и другие.

Как иллюстрирует Рис. 3.36, в некоторых случаях белки могут отбираться для деградации даже до завершения их транслокации в ЭПР. Это используется для особенно больших субстратов для того, чтобы избежать затрат энергии на транслокацию белка целиком, если он начинает принимать неправильную конфигурацию уже в самом начале синтеза. Отбор белков для ретроградной транслокации в процессе их импорта позволяет не помечать их повторно. Наилучшим примером этому является деградация аполипопротеина В. Это очень большой секретируемый белок, который на первом шаге сборки липопротеинов низкой плотности (см. 3.22 *Липиды должны перемещаться с ЭПР на мембраны других органелл*) связывается с липидами люмена ЭПР и жирными кислотами. Неспособность фермента люмена ЭПР переносить липиды на аполипопротеин В по мере транслокации вызывает начало деградации белка до момента завершения его синтеза и транслокации.

Когда белки достигают цитозоля, они обычно узлаются и деградируют. Однако в некоторых случаях экспортируемые белки подвергаются агрегации в цитоплазме. При этом белки накапливаются в цитоплазме в специальных образованиях, которые называются агрегаты. Они способны сохранять для деградации большие количества белка.

Исследование ERAD еще только начинается. Очевидно, в этом процессе участвует больше компонентов, чем известно на сегодняшний день, и его молекулярные основы исследованы пока недостаточно. Сюда относятся фундаментальные вопросы, связанные с распознаванием белков, обладающих неправильной структурой. Выяснение деталей этих процессов позволит реконструировать их *in vitro*.



Деградация некоторых белков начинается до того момента, как они полностью транслоцировались. Когда белок отобран для деградации, в цитоплазме начинают накапливаться и убиквитироваться фрагменты его цепи

3.20 Взаимодействие между ЭПР и ядром предотвращает накопление в люмене несвернутых белков

Основные положения

- Образование нативной структуры в люмене ЭПР контролируется особым процессом, получившим названия «отклик неструктурированных белков (UPS)» или «реакция на несвернутые белки». При этом запускается каскад процессов, приводящих к увеличению экспрессии генов шаперонов ЭПР
- Белок Ire1p опосредует отклик неструктурированных белков у дрожжей и активируется в ответ на стрессорные условия
- Активированный Ire1p осуществляет сплайсинг иРНК *HAC1*, что приводит к образованию Hac1 белка, фактора транскрипции, локализованного в ядре и связанного с промотором генов, содержащих UPR повтор
- Отклик неструктурированных белков у высших эукариот включают больше уровней, чем для клеток дрожжей

Даже при функционировании системы ERAD в ЭПР могут накапливаться белки, обладающие неправильной нативной структурой. Это происходит в случаях, когда клетка испытывает стресс, например при вирусной инфекции, повышенной температуре или при воздействии некоторых химических веществ. При этом утрачиваются механизмы контроля за конформацией белка и нарушаются процессы секреции. Поскольку белки секреторного пути должны попасть в ЭПР, эта органелла играет важную роль в поддержании гомеостаза на всем секреторном пути. ЭПР узнает нарушения процесса секреции белков, которые происходят в различных участках секреторного пути. **Отклик неструктурированных белков** (англ. *unfolded*

protein response, UPR) представляет собой каскад процессов, происходящих на пути от люмена ЭПР до ядра клетки, в результате которого в ЭПР поддерживается контроль над условиями созревания белков и при необходимости усиливается экспрессия шаперонов. Существование этого отклика характерно для всех клеток эукариот, однако наиболее существенные его детали на молекулярном уровне впервые были выяснены на дрожжевых клетках.

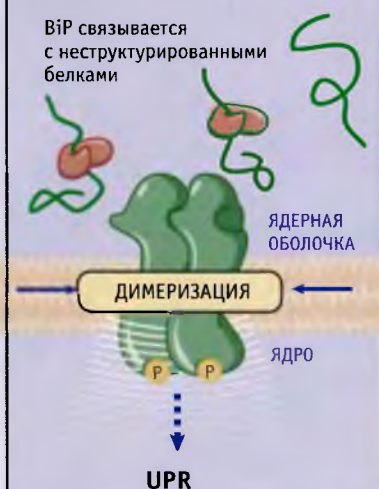
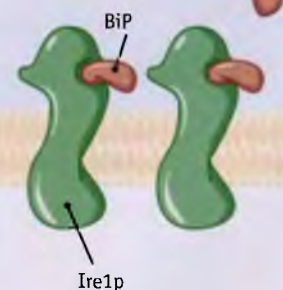
Для UPR дрожжей критическим медиатором сигнала, т. е. продуктом, который «отслеживает» условия для сворачивания белков в ЭПР и передает эту информацию, является белок мембраны ЭПР, называемый Ire1p. Этот белок способен образовывать димеры за счет ассоциации со своими доменами со стороны люмена, однако в нормальных условиях с этими доменами связывается BiP, что делает невозможным образование димеров. Однако при стрессе BiP связывается с неправильно скрученными белками, а Ire1p образует димеры и тем самым активирует каскад процессов, составляющих UPR (рис. 3.33). Сигнал передается через цитозольный домен Ire1p, который представляет собой серин-треонин киназу. (Возможно, что Ire1p расположен в области ЭПР, образующей ядерную оболочку, и поэтому его «цитозольный» домен в действительности находится в ядре, хотя это строго и не доказано.) Димеризация Ire1p индуцирует процесс аутофосфорилирования и активации цитоплазматического домена. Поэтому Ire1p функционирует, как и другие рецепторные киназы, за исключением того, что димеризуется в отсутствие, а не в присутствии лиганда (BiP). Он также передает сигнал между компартментами, а не с поверхности внутрь клетки (см. MB10:3-0004).

Как показано на рис. 3.33, при активации Ire1p второй домен цитозольной области этого белка катализирует удаление интрона из иРНК специфического гена,

В отсутствие неструктурированных белков BiP связывается с Ire1p

СТРЕСС

BiP связывается с неструктурированными белками



В обычных условиях BiP может связаться с Ire1p и тем самым предотвратить его димеризацию. При развитии стресса BiP связывается с неструктурированными белками. Это приводит к димеризации Ire1p и к развитию отклика неструктурированных белков

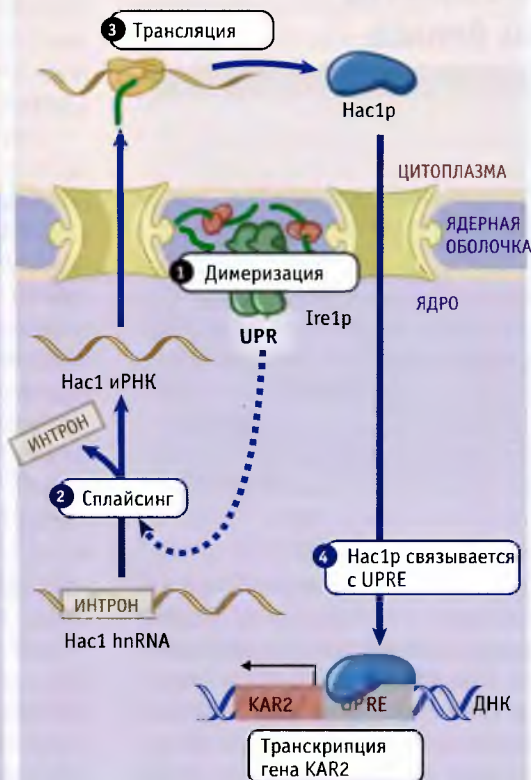
Для UPR требуется сплайсинг Нас1 иРНК

UPR НЕ РАЗВИВАЕТСЯ

Трансляция заблокирована



UPR



Димеризация Ire1p вызывает сплайсинг Нас1 иРНК и ее трансляцию. Образуется фактор транскрипции Нас1р, который стимулирует экспрессию генов, кодирующих шапероны ЭПР

HAC1. Когда интрон удален, лигата трНК соединяет экзоны, образуя новую иРНК. Таким образом, сплайсинг с участием Ire1p отличается от сплайсинга, катализируемого сплайсосомой (см. MBIO:3-0005). Сплайсинг *HAC1* иРНК является критическим событием для UPR, поскольку интрон задерживает рибосому на иРНК и нарушает трансляцию белка Hac1p. Однако после удаления интрона этот белок транслируется.

Белок Hac1p представляет собой фактор транскрипции, который связывается с промотором гена, кодирующего белок BiP, и стимулирует его транскрипцию. (Дрожжевой гомолог BiP называется KAR2.) Связывание происходит с участием специфической регуляторной последовательности, которая носит название элемента отклика неструктурированных белков (англ. *unfolded protein response elements*, UPR). Эта последовательность также присутствует в промоторной области некоторых других генов, и Hac1p также стимулирует транскрипцию этих генов. Таким образом, узнавая неправильно структурированные белки посредством их связывания с BiP, Ire1p запускает каскад событий, которые приводят к дополнительному синтезу ЭПР шаперонов. Эти шапероны усиливают способность клеточных контрольных систем справляться с притоком большого количества неструктурированных белков, при попадании клетки в условия стресса. Ответная реакция клетки носит более обширный характер, чем было выше описано. Хотя первоначально существование UPR было обнаружено по его влиянию на экспрессию специфических шаперонов, сейчас известно, что этот отклик затрагивает экспрессию сотен различных генов. Исследование природы экспрессируемых генов позволяет предполагать, что при появлении неструктурированных белков в клетке меняются элементы трансляции, транслокации, секреции и пролиферации мембран ЭПР. К числу такого рода ответов относится индукция синтеза липидов, необходимая для увеличения массы мембран ЭПР (см. 3.25 ЭПР представляет собой динамическую органеллу).

UPR в клетках млекопитающих похож на UPR клеток дрожжей, однако имеет более сложный характер. Гомологи Ire1p у млекопитающих также катализируют сплайсинг, который приводит к увеличению экспрессии шаперонов ЭПР, однако при этом транскрипционный фактор отличается от Hac1p. Этот фактор в клетках млекопитающих называется Xbp1. Однако белок IRE1, по-видимому, не играет критической роли в UPR клеток млекопитающих, поскольку клетки, дефицитные по этому белку, не утрачивают способность к активации UPR в условиях стресса и стимулируют синтез шаперонов. Согласно современному представлению, IRE1 у млекопитающих контролирует экспрессию генов, необходимых для стимуляции ERAD. Вероятно, белок IRE1 и его мишень XBP1 играют важную роль в созревании В-клеток, у которых масса ЭПР должна значительно увеличиваться по мере приобретения способности к синтезу и секреции антител (см. 3.25 ЭПР представляет собой динамическую органеллу).

В UPR у млекопитающих участвуют нехарактерные для дрожжевых клеток компоненты и процессы (рис. 3.39). При стрессе в ЭПР активируется второй фактор транскрипции, который носит название ATF6. Обычно этот белок пронизывает мембрану ЭПР, однако индукция UPR приводит к отщеплению его мембранного домена. Высвободившийся при этом цитозольный домен транспортируется в ядро, где связывается с промоторами генов, экспрессирующих шапероны ЭПР. Наряду с усилением контроля качества при ЭПР-стрессе, в клетках млекопитающих снижается синтез белка, и в ЭПР начинает поступать меньше белков. В этом процессе принимает участие белок PERK, представляющий собой трансмембранную киназу ЭПР, домен которой со стороны люмена гомологичен белку Ire1p, но цитозольный домен имеет отличную структуру. PERK в повышенных количествах экспрессируется в клетках поджелудочной железы, и его инактивация приводит к дисфункции органа. Это свидетельствует о значимости UPR для органов, характеризующихся высокой секреторной активностью. Активированный цитозольный домен белка PERK фосфорилирует α -субъединицу фактора инициации трансляции eIF2. Это приводит к общему ингибированию синтеза белка, в результате чего уменьшается его количество, поступающее в ЭПР (см. MBIO:3-0006). Важно, что этот эффект носит обратимый характер, и, таким образом, увеличение синтеза шаперонов носит регулируемый характер. Вместе с тем, по крайней мере одна иРНК, кодирующая фактор транскрипции ATF4, может транслироваться только при фосфорилировании eIF2 α и ингибировании общего синтеза белка. ATF4, который синтезируется в результате фосфорилирования eIF2 α , транспортируется в ядро и регулирует экспрессию генов, участвующих в энергетических процессах, поддержании окислительно-восстановительного потенциала и синтезе аминокислот. Следует отметить, что при иных типах стресса другие киназы фосфорилируют eIF2 α (например, при вирусной инфекции активируется для фосфорилирования eIF2 α киназа PKR), и, таким образом, мишенями для ATF4 служат те гены, которые важны для общей реакции клетки на стресс, в то время как пути через ATF6 и IRE1 представляются более ЭПР-стресс-специфичными.

С активацией процессов UPR связано развитие многих патологических состояний, включающих нейродегенеративные болезни, диабет, функциональные расстройства печени, нарушения свертываемости крови, и многие другие. В экспериментальных условиях постоянная активация UPR приводит к активации процесса клеточной гибели. Однако развитие большинства болезней, связанных с нарушением UPR, происходит через несколько месяцев или лет. Это позволяет предполагать, что физиологическая активация UPR скорее напоминает адаптивный ответ, чем апоптоз. Учитывая, что UPR активирует как процессы выживаемости, так и апоптоз, не вполне ясно, каким образом этот процесс может способствовать выживаемости клетки в условиях хронического стресса.

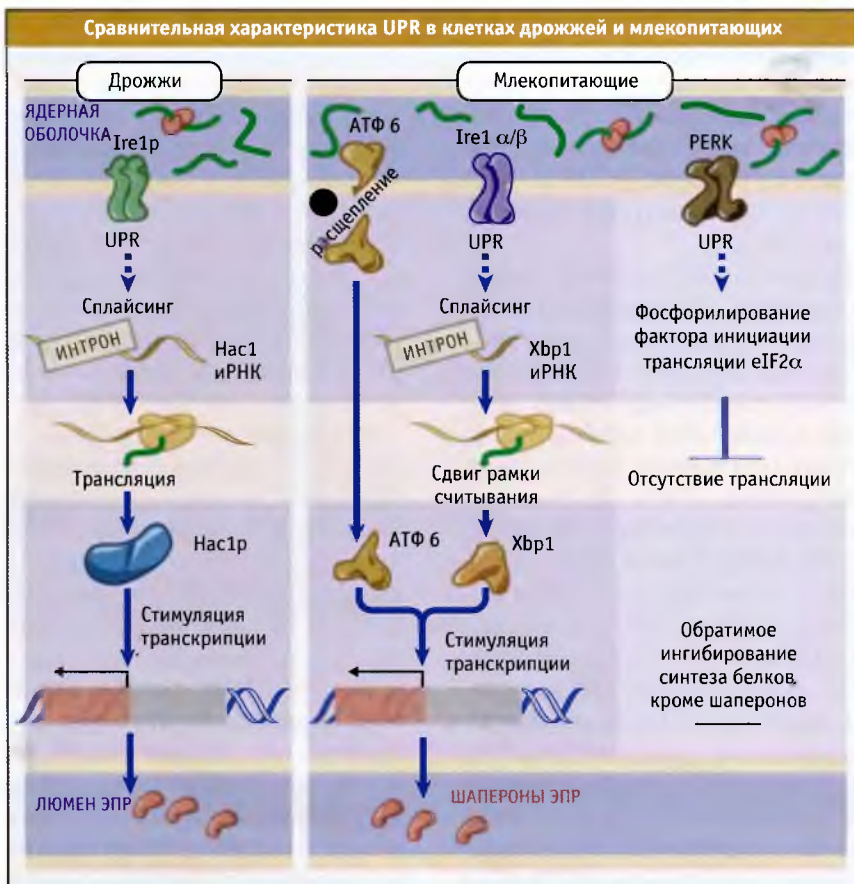


Рис. 3.29 У высших эукариот существует несколько путей UPR. Они включают ингибирование трансляции через PERK и расщепление ATF6 с образованием фактора транскрипции

3.21 В ЭПР образуются основные клеточные фосфолипиды

Основные положения

- Основные клеточные фосфолипиды синтезируются в мембране ЭПР, главным образом, со стороны цитозоля
- Регуляция синтеза новых липидов контролируется локализацией ферментов, участвующих в этом процессе
- Биосинтез холестерина регулируется протеолизом фактора транскрипции, который интегрирован в мембрану ЭПР

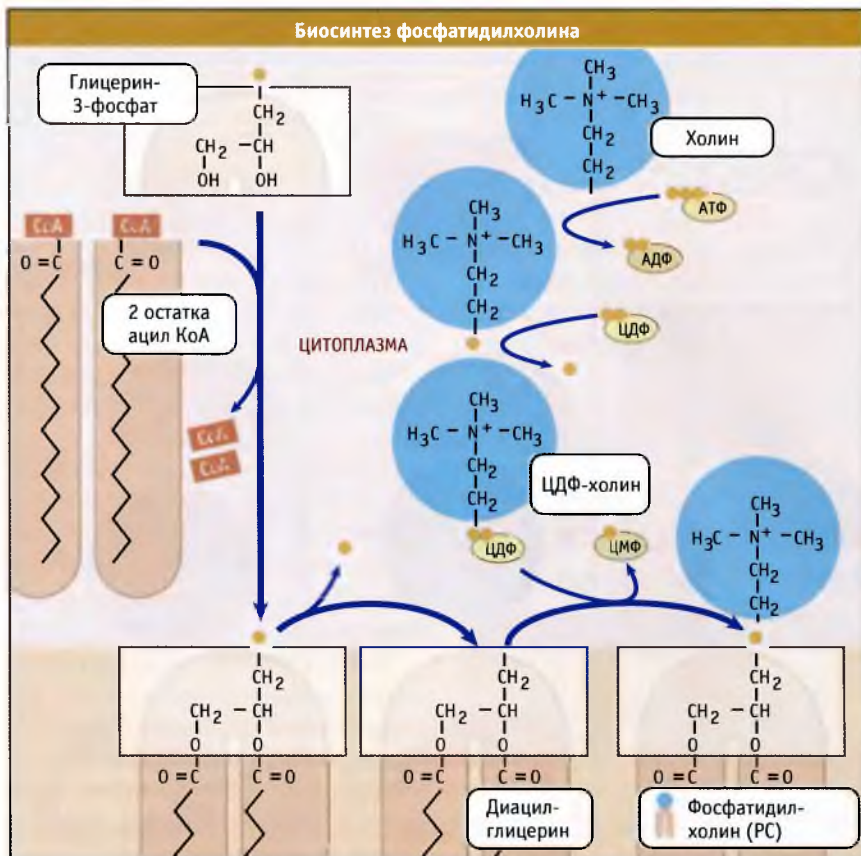
Наряду с транслокацией и подготовкой белков к секреторному процессу, ЭПР функционирует как место первичного образования клеточных фосфолипидов. Эти молекулы синтезируются в мембране ЭПР и затем распределяются по отдельным мембранам и органеллам внутри клетки. К их числу относится плазматическая мембрана, митохондрии и органеллы секреторного пути.

При возникновении необходимости клетка должна обладать способностью увеличивать количество мембран. Наиболее очевидно это проявляется при удвоении плазматической мембраны и всех органелл, которое происходит в ходе клеточного цикла. Наряду с этим, при гиперфункции, отдельные органеллы могут увели-

чиваться в размерах. Например, при созревании предшественников В-лимфоцитов в плазматические клетки, секретирующие антитела, ЭПР сильно увеличивается, что соответствует потребностям усиленного транспорта белков по секреторному пути (см. 3.25 ЭПР представляет собой динамическую органеллу).

Образование фосфолипидов из растворимых предшественников *de novo* происходит, главным образом, на мембране ЭПР со стороны цитоплазмы, в ходе процесса, называемого **цикл Кеннеди**. Как показано на рис. 3.30, при росте мембраны ЭПР две молекулы жирных кислот, связанные с ацетил КоА, реагируют с глицерин-3-фосфатом, образуя **диацилглицерин (ДАГ)**. В отличие от своих предшественников, ДАГ достаточно гидрофобен для того, чтобы интегрироваться в мембрану ЭПР.

Попав в мембрану, ДАГ взаимодействует с «головой» будущей молекулы фосфолипида. Как показано на рис. 3.31, основные фосфолипиды различаются, главным образом, природой «головы» молекулы. Все они образуются при присоединении «головы» к ДАГ. Вначале происходит ее фосфорилирование, а затем присоединение к цитидиндифосфату (ЦДФ). После этого «голова» с одной из фосфатных групп переносится на ДАГ, и синтез завершается.



При объединении водорастворимых цитоплазматических компонентов (глицерин-3-фосфата, ацил КоА и полярной головки) образуется молекула фосфолипида. Новая растворимая в липидах молекула включается в мембрану

Присоединение головной группы холина к ЦДФ с образованием фосфатидилхолина иллюстрирует использование клеткой субклеточной локализации белков для регуляции процессов биосинтеза. В этой реакции участвует фермент цитидилтрансфераза (ЦТ), и она контролирует скорость всего процесса синтеза фосфатидилхолина. В клетке ЦТ находится в двух различных формах: в неактивной, в цитозоле, и в активной, с цитозольной стороны мембраны ЭПР.

Механизм, который обеспечивает существование двух этих форм фермента, представляется не вполне ясным. Очевидно, однако, что условия внутри клетки, которые сигнализируют о необходимости усиления синтеза фосфатидилхолина, могут контролировать переход ЦТ из одной формы в другую. Например, увеличение в клетке концентрации свободного ДАГ или жирных кислот вызывает миграцию ЦТ на мембрану ЭПР, где эти компоненты реагируют с холином. В то же время, когда в клетке содержится много фосфатидилхолина, ЦТ локализуется в цитозоле. Таким образом, предотвращается синтез фосфатидилхолина.

Наряду с фосфатидилхолином, который является наиболее распространенным мембранным фосфолипидом, в цикле Кеннеди также образуются фосфатидилэтаноламин и фосфатидилинозитол. У дрожжей *S. cerevisiae*

синтезируется фосфатидилсерин. У животных, однако, этот фосфолипид образуется за счет другой реакции, которая не требует участия ЦДФ, однако также протекает с цитозольной стороны мембраны ЭПР.

Интересная особенность синтеза фосфатидилэтаноламина заключается в том, что хотя этот фосфолипид образуется в цикле Кеннеди, он также может синтезироваться в митохондриях. В этих органеллах он образуется при модификации фосфатидилсерина, который образовался в ЭПР. Образование фосфатидилэтаноламина в клеточных компартментах, отличающихся от тех, в которых синтезируется его предшественник, предполагает существование механизма транспорта липидов между двумя компартментами. Имеются данные, позволяющие предполагать, что этот транспорт осуществляется посредством специального субдомена ЭПР, который называется **мембраной, связанной с митохондрией (МСМ)**. МСМ представляет собой участок ЭПР, который физически ассоциирован с митохондрией. Он характеризуется плоской поверхностью и тесным контактом с органеллой. В МСМ находятся ферменты синтеза фосфатидилсерина. Возможно, что область контакта мембраны с митохондрией обеспечивает быстрый перенос фосфатидилсерина в органеллу, хотя механизм этого переноса остается неясным.

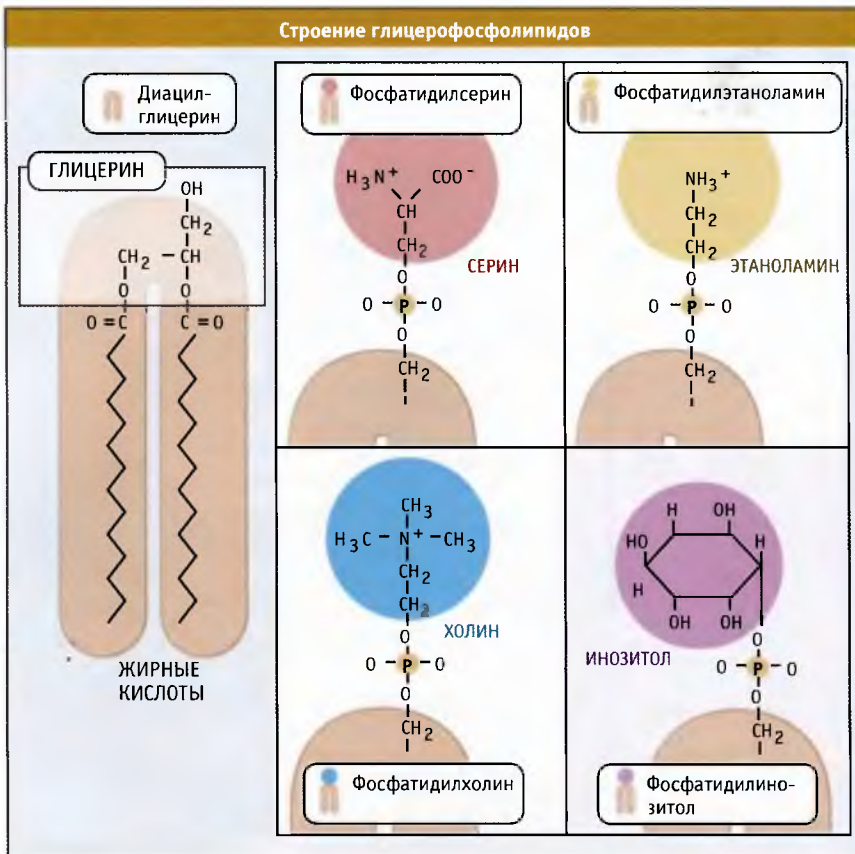


Рис. 3.4.1. Основные мембранные фосфолипиды различаются по составу головок

Наряду с участием в синтезе фосфолипидов, ЭПР является местом синтеза стерина. К числу основных стерина мембран клетки относится холестерин; его биосинтез осуществляется в несколько этапов. Первые несколько реакций происходят в цитозоле, а остальные в мембране ЭПР. Также в ЭПР находятся элементы, необходимые для регуляции образования холестерина. Ключевыми медиаторами этого регуляторного пути являются белки, связывающиеся с регуляторным стерин-респонсивным элементом (SREBP). Эти белки обычно интегрированы в мембрану ЭПР и со стороны люмена содержат небольшую петлю, соединяющую два трансмембранных домена, N- и C-концевые участки которых ориентированы в сторону цитозоля. Также в ЭПР находится белок SCAP (белок, активирующий разрезание SREBP). Этот белок контролирует уровень внутриклеточного холестерина. Когда возникает необходимость в повышенном синтезе холестерина, SCAP транспортирует SREBP из ЭПР в аппарат Гольджи. Там происходит разрезание SREBP, и N-терминальный участок молекулы высвобождается в цитозоль. (В реакции участвуют те же протеазы, которые расщепляют АТФ 6 при возникновении стрессорных условий в ЭПР (см. 3.20 *Взаимодействие между ЭПР и ядром предотвращает накопление в люмене несвернутых белков*). Затем N-терминальный домен SREBP мигрирует в ядро, где действует как фактор транскрипции, активируя экспрессию генов в каскаде реакций биосинтеза холестерина.

3.22 Липиды должны перемещаться с ЭПР на мембраны других органелл

Основные положения

- Каждая органелла обладает уникальным составом липидов, что предполагает специфичность транспорта липидов из ЭПР в каждую органеллу
- Механизм транспорта липидов между органеллами неизвестен, но может включать прямой контакт между ЭПР и другими клеточными мембранами
- При перемещении липидов через бислой возникает асимметричность слоев мембраны

После синтеза липидов в ЭПР они должны транспортироваться на другие мембраны клетки. Этот процесс осложняется тем фактом, что мембранные органеллы различаются по составу липидов; таким образом, перенос должен представлять собой специфический процесс, а не просто обмен липидов. Поэтому должны существовать механизмы, которые обеспечивают не только движение липидов, но и направление этого процесса.

Хотя механизм транспорта липидов остается невыясненным, предложено несколько схем движения. Одна схема подразумевает наличие прямого контакта между мембранами, как это, например, имеет место между ЭПР и митохондриями в МСМ. Вероятно, когда

мембраны двух органелл непосредственно примыкают друг к другу, это облегчает движение фосфолипидов между ними. Такая схема распределения липидов кажется вероятной, поскольку известно, что ЭПР непосредственно контактирует со всеми основными клеточными органеллами. Последние включают плазматическую мембрану, *транс*-Гольджи сеть, пероксисомы, вакуоли и эндосомы/лизосомы. Хотя функциональное значение этих контактов выяснено не столь подробно, как для МСМ, но если они действительно имеют общую природу, то могут служить средством передвижения липидов из одной органеллы в другую и обеспечивать специфичность этого процесса.

Для объяснения механизма транспорта липидов были предложены также другие гипотезы. До недавнего времени общепризнанным считалось представление о белках-переносчиках фосфолипидов. Эти белки были обнаружены в экспериментах *in vitro* по их способности обменивать липиды между мембранами. Белки экстрагируют липиды из одной мембраны и помещают их в гидрофобный связывающий карман, где они находятся до того момента, как будут перенесены в другую мембрану. Хотя эти белки, возможно, участвуют в прямом переносе фосфолипидов между органеллами, они вряд ли обуславливают увеличение их липидного состава, поскольку при диссоциации липида от мембранного белка, его место занимает в белке другой липид этой же мембраны. Данные о роли этих белков в транспорте липидов *in vivo* отсутствуют.

Предполагается также, что при транспорте везикул по секреторному пути наряду с белками переносятся новые липиды. Однако этот механизм кажется маловероятным, поскольку вещества, препятствующие движению везикул по секреторному пути, блокируют транспорт липидов от ЭПР к плазматической мембране. Секреторные везикулы не могут доставлять липиды к митохондриям и хлоропластам, поскольку ЭПР даже не связан с этими органеллами через секреторный путь.

В некоторых случаях образующиеся в ЭПР липиды экспортируются в другие клетки. При этом некоторые специализированные клетки транспортируют по секреторному пути липиды, находящиеся в форме **липопротеинов**. Последние представляют собой крупные агрегаты, состоящие из белка и липидов, и используются для транспорта через кровоток водонерастворимых метаболитов, особенно холестерина и триацилглицеринов. Они состоят из ядра, содержащего холестерин и триацилглицерины, окруженного монослоем фосфолипидов и белка. Существует несколько типов липопротеинов, различающихся по плотности. Особый интерес представляют липопротеиды низкой плотности (ЛНП), поскольку они образуются в люмене ЭПР клеток печени и кишечника, а затем транспортируются из них по секреторному пути. Предшественниками ЛНП являются фосфоли-

пиды очень низкой плотности (ЛОНП), которые синтезируются на цитозольной стороне ЭПР, а затем, вероятно, проходят через мембрану. Там они реагируют с белком АроВ, по мере его транслокации в люмен ЭПР. Сформировавшиеся ЛОНП частицы транспортируются по секреторному пути. Если частица не была правильно собрана в люмене ЭПР, то за счет ретроградной транслокации белок АроВ возвращает-ся в цитозоль, где деградирует (см. 3.19 *Неправильно свернутые белки ЭПР поступают в цитозоль, где подвергаются деградации*).

3.23 Два слоя мембраны часто различаются по составу липидов

Основные положения

- Асимметричность распределения предполагает перемещение молекул липидов между слоями мембраны
- Перемещение липидов между слоями происходит с участием ферментов («флиппаз»)

Часто липиды распределены асимметрично между двумя слоями мембраны. Например, фосфатидилхолин преимущественно содержится во внешнем слое двойной плазматической мембраны, а фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин — в слое, примыкающем к цитозолю. От этой асимметрии зависят некоторые сигнальные механизмы, а также межклеточные взаимодействия. Она поддерживается за счет того, что полярные головки липидов не могут пройти через гидрофобную внутреннюю среду бислоя. В результате спонтанное движение липидов между двумя слоями мембраны происходит с крайне низкой скоростью.

Неспособность липидов самостоятельно из одного слоя в другой (флиппинг) требует участия в этом ферментов, называемых флиппазами. По крайней мере, некоторые из них должны присутствовать в мембране ЭПР, поскольку синтез липидов ограничивается ее стороной, примыкающей к цитозолю. В отсутствие перехода между слоями при синтезе новых липидов будет увеличиваться только эта сторона мембраны. У дрожжей в качестве флиппазы идентифицирован белок Rft1p, однако механизм его действия остается невыясненным. Этот белок и другие флиппазы могут действовать, просто уравнивая липидный состав двух слоев, или флиппинг липидов регулируется, с тем чтобы создать необходимую асимметрию. По-видимому, установление асимметрии требует участия ферментов, проявляющих селективность в отношении определенных «головок» липидов, а также энергетических затрат. Хотя существуют убедительные доказательства существования флиппаз, очистка и характеристика этих белков вызывают затруднения. Неизвестно, насколько широко они распространены в клетках, а также их локализация.

3.24 Морфологически и функционально ЭПР подразделяется на ряд отделов

Основные положения

- Морфологически ЭПР подразделяется на ряд компартментов, которые включают гранулярный ЭПР, секретирующий белки, агранулярный (гладкий) ЭПР, в котором происходит образование стероидов и детоксикация лекарственных препаратов, и саркоплазматический ретикулум, представляющий собой депо для хранения внутриклеточных запасов кальция
- В зависимости от типа клеток, агранулярный ЭПР может обладать различными функциями
- ЭПР также подразделяется на отделы в соответствии со своими молекулярно-биологическими характеристиками, однако это никак не проявляется морфологически

Исследование ЭПР в электронном микроскопе показывает, что эта органелла обладает чрезвычайно гетерогенной структурой. В некоторых частях клетки она образует большие плоские структуры (*цистерны*), часто расположенные параллельно и иногда тесно примыкающие друг к другу (рис. 3.1). Иногда ЭПР обладает структурой длинных изогнутых каналов. Две эти формы взаимосвязаны, и образуют единую непрерывную структуру. Рядом с ядерной оболочкой, представляющей собой часть ЭПР, обнаруживаются плоские структуры и их стопки. Клетка пронизана сетью каналов, обеспечивающих контакт плазматической мембраны с мембранами других органелл.

Структурная гетерогенность ЭПР отражает пространственное распределение его функций по специализированным отделам. Эту специализацию можно рассматривать как продолжение процесса, в результате которого впервые часть плазматической мембраны по-

лучила секреторную функцию, что и привело к образованию ЭПР. Образовавшись, органелла приобрела новые функции и новую мембрану, подразделенную на специализированные отделы. Хотя не вызывает сомнения, что по своим функциям ЭПР представляет собой высокодифференцированную структуру, механизм, ответственный за специализацию ее отделов, пока не выяснен.

В состав ЭПР входит **гладкий и гранулярный эндоплазматический ретикулум**. Гранулярный ретикулум покрыт рибосомами, на которых синтезируются секретируемые или мембранные белки. Рибосомы хорошо видны в электронном микроскопе и придают мембране типичный вид (из-за которого ретикулум и получил свое название). Гранулярный эндоплазматический ретикулум особенно характерен для клеток, секретирующих большое количество белка. К их числу относятся эндокринные клетки, например α - и β -клетки поджелудочной железы, секретирующие гормоны в кровоток, и В-лимфоциты, продуцирующие и секретирующие антитела. Как показано на рис. 3.1, в этих клетках гранулярный ЭПР занимает большую часть внутриклеточного пространства, в то время как во многих других типах клеток эта структура представлена не столь широко и не является столь высокоорганизованной.

Напротив, гладкий ЭПР не содержит рибосом (рис. 3.2). В большинстве клеток гладкий ЭПР в основном ограничен областью, где содержащие белок везикулы отпочковываются от ЭПР для транспорта в аппарат Гольджи. Эта область известна как **переходный ЭПР** или промежуточный компартмент ЭПР-Гольджи (ERGIC).

Гладкий ретикулум, в широком смысле этого термина, обозначающий ЭПР без рибосом, также выполняет несколько других функций: он участвует в метаболизме липидов и гликогена, в синтезе стероидов, и в детоксикации лекарственных препаратов. Эти функции являются



Морфология гранулярного ЭПР, видимая на микрофотографии, полученной с помощью трансмиссионного электронного микроскопа. В некоторых клетках, например в В-лимфоцитах, синтезирующих большое количество иммуноглобулина, гранулярный ЭПР занимает большую часть цитоплазмы и выглядит в виде плоских листовидных структур, расположенных в стопках. Напротив, в эмбриональном фибробласте, секретирующем коллаген и другие белки внеклеточного матрикса, гранулярный ЭПР выглядит в виде трубочек. Слева: фотография предоставлена д-ром Дон В. Фосеттом. Из: *The Cell*, 1981. Справа: фотография любезно предоставлена Томом Рутковским

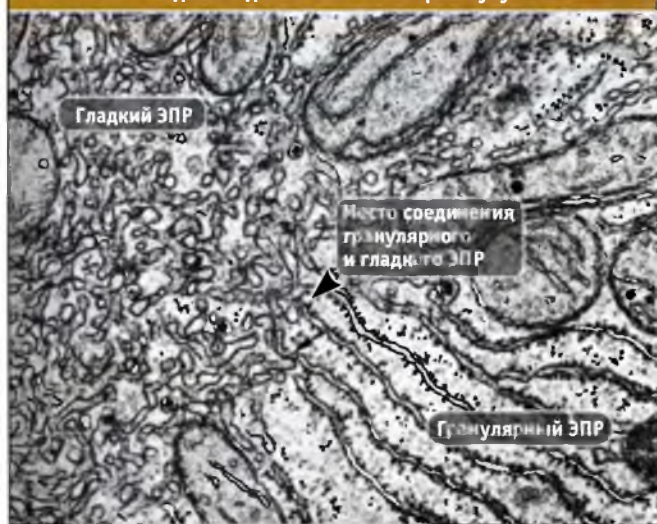


Рис. 3.43. Электронная микрофотография гепатоцита. Эти клетки обезвреживают токсические вещества в разветвленной сети гладкого ЭПР, видимой в левой части фотографии. Гладкий ЭПР представляет собой изогнутые трубочки и на поперечных срезах часто выглядит в виде кружков и овалов. Показано место соединения гладкого и гранулярного ЭПР. Отметьте, насколько четко по зонам расположения отличаются два типа ЭПР. Фотография любезно предоставлена д-ром Дон В. Фосеттом. Из: *The Cell*, 1981. Оригинальная работа опубликована в *The Journal of Cell Biology*, 1973, vol. 56, pp. 746–761, © Rockefeller University Press. Фотография любезно предоставлена Эвальдом Р. Вайбелем, Университет в Берне

более специализированными по сравнению с функциями гранулярного ЭПР, и обычно в клетке гладкий ЭПР представлен менее широко. Однако в клетках, для которых характерны интенсивные метаболические процессы, гладкий ретикулум может разрастаться, и его может быть так же много, как и гранулярного ЭПР. Например, в клетках Лейдига в семенниках в разветвленной сети гладкого ЭПР происходит синтез тестостерона. Аналогичным образом, в обширной сети гладкого ЭПР гепатоцитов находится цитохром P450 и другие ферменты, участвующие в процессах детоксикации. В этих клетках, в ответ на воздействие некоторых препаратов, изменяется количество гладкого ЭПР. Так, при попадании в клетку токсических препаратов, доля в ней гладкого ЭПР становится больше, а при их удалении из клетки — меньше. Несмотря на четкие морфологические различия между гранулярным и гладким ЭПР, неизвестно, каким образом поддерживается функционирование этих самостоятельных доменов и перекрываются ли их функции.

В клетках скелетных мышц гладкий ЭПР образует еще один субдомен, который называется **саркоплазматический ретикулум (СР)**. По сравнению с другими частями ЭПР, этот домен характеризуется чрезвычайно разветвленной структурированной сетью, окружающей саркомеры мышц (Рис. 3.44). В СР кальций удерживает-

ся с помощью белка кальсеквестрина, который содержит множество сайтов, обладающих низким сродством к ионам кальция. При открытии кальциевых каналов в мембране СР кальций выходит в цитозоль, наступает сокращение мышцы. Затем с помощью специфических насосов, расположенных в различных частях СР, кальций быстро откачивается назад. Таким образом, СР можно рассматривать как разновидность гладкого ЭПР, осуществляющую функции захвата, хранения и высвобождения ионов кальция. Хотя лучше всего эти функции изучены в клетках скелетных мышц, СР также играет определенную роль и в других клетках, функционирование которых регулируется ионами кальция.

Хотя система СР служит для выполнения функций по быстрому высвобождению ионов кальция, в большинстве



Рис. 3.44. Саркоплазматический ретикулум клетки скелетных мышц на электронной микрофотографии. Он представляет собой разновидность гладкого ЭПР, депонирует ионы кальция и высвобождает их при мышечном сокращении. На фотографии видны три миофибриллы, идущие сверху вниз. Средняя миофибрилла окружена разветвленной сетью саркоплазматического ретикулума. Фотография любезно предоставлена д-ром Дон В. Фосеттом. Из: *The Cell*, 1981. Оригинальная работа опубликована в *The Journal of Cell Biology*, 1965, vol. 25, pp. 209–231, © Rockefeller University Press. Фотография любезно предоставлена Ли Д. Пичи, Университет Пеннсилвании

Основные положения

- Развитие ЭПР и состав его мембран меняются в зависимости от запросов клетки
- Перемещения мембран ЭПР происходят вдоль цитоскелета
- Механизм расширения, сокращения и образования трубочек ЭПР пока не выяснен
- Сигнальные процессы, контролирующие состав ЭПР до конца не выяснены, однако они могут перекрываться с откликом неструктурированных белков

клеток захват и депонирование этого катиона выполняются ЭПР. Это имеет особенно важное значение, принимая во внимание, что изменения внутриклеточной концентрации кальция служат важным элементом системы передачи сигналов внутрь клетки (см. *14 Функционирование внутриклеточных систем передачи сигналов*). В немышечных клетках кальций связывается в ЭПР с помощью кальретикулина, который выполняет двойную роль — белка, связывающего кальций и гликопротеинового шаперона (см. *3.17 Модифицированные остатки углеводов узнаются системой шаперонов кальнексин/кальретикулин*). К числу других белков, присутствующих в большом количестве в люмене ЭПР, относятся BiP, Grp94, ERp72, ПДИ и кальнексин, которые связывают кальций *in vitro*, и также могут способствовать его накоплению в клетке. Подобно кальсеквестерину СР, эти белки обладают множественными сайтами, которые характеризуются низким сродством к ионам кальция. Поскольку ЭПР выполняет функции кальциевых депо, для активности присутствующих в люмене шаперонов обычно необходимы ионы кальция. Так, BiP, кальнексин и кальретикулин функционируют гораздо менее эффективно при истощении кальциевых депо ЭПР. Это может приводить к тому, что длительный недостаток ионов кальция индуцирует UPR.

Выход кальция из ЭПР играет важную роль не только в инициации каскадных процессов передачи сигнала, но также в определенных условиях может служить пусковым процессом апоптоза. Области ЭПР, тесно связанные с митохондриями (см. *3.21 В ЭПР образуются основные клеточные фосфолипиды*), способствуют быстрому захвату этими органеллами ионов кальция, которые высвобождаются из ЭПР. Предполагается, что при этом в митохондриях запускаются процессы, приводящие клетку к гибели.

Хотя такие субдомены как гладкий и гранулярный ЭПР различимы морфологически, эта органелла обнаруживает также и другие, менее очевидные признаки гетерогенности. Например, несмотря на непрерывность ядерной оболочки и ЭПР, некоторые белки присутствуют только на внутренней ядерной мембране и не обнаруживаются на внешней мембране ядра и ЭПР. Локализацию белков обычно связывают с их контактом с ядерной ламиной или с хроматином. В точках контакта ЭПР с другими органеллами могут присутствовать другие функциональные субдомены. Так, область контакта мембраны ЭПР с митохондриями обогащена ферментом фосфатидилсеринсинтазой. Также некоторые белки локализуются в точках тесного контакта ЭПР с пероксисомами. Можно предполагать, что уникальные белки находятся и в других доменах ЭПР. ЭПР проявляет гетерогенность и в отношении распределения фосфолипидов, холестерина и даже иРНК, связанных с рибосомами и кодирующих синтез транслоцируемых белков. Правда, функциональная значимость гетерогенности этих компонентов не вполне понятна. В настоящее время, когда идентифицированы многие молекулярные процессы, играющие роль в различных функциях ЭПР, открылась возможность изучения механизмов, обеспечивающих их пространственную ориентацию.

Подобно другим органеллам, ЭПР должен адаптироваться к нуждам клетки. При необходимости отдельные регионы ЭПР должны расширяться или сокращаться. Клетка должна иметь возможность собирать и реорганизовывать органеллу, а также поддерживать ее форму. При митозе ЭПР должен распределяться между дочерними клетками. Хотя в отношении молекулярных основ этих процессов известно немного, очевидно, что органелла характеризуется высокой динамичностью.

Форма ЭПР постоянно меняется. Особенно это касается трубочек ЭПР, которые находятся в постоянном движении: они удлиняются, сокращаются, разветвляются и сливаются между собой. Это движение определенным образом связано с цитоскелетом; в клетках млекопитающих трубочки ЭПР часто ориентированы в соответствии с микротрубочками, так, что их расширение и сокращение происходят вдоль этих структур цитоскелета. В клетках дрожжей ЭПР часто связан с актиновыми филаментами. Однако разрушение цитоскелета не приводит к дисфункции ЭПР или к коллапсу системы его трубочек. Для образования трубочек или их сетей *in vitro* не требуются элементы цитоскелета. Поэтому представляется вероятным, что образование трубочек и их сборка в сеть являются характерным свойством ЭПР, которое не зависит от цитоскелета. Скорее, роль цитоскелета может заключаться в том, чтобы обеспечить надлежащее распределение сети трубочек в клетке после ее сборки.

Механизмы, посредством которых происходит сборка новых или расширение существующих мембран ЭПР, неизвестны, однако выяснены некоторые процессы, играющие ключевую роль. Образование трубочек ЭПР *in vitro* требует АТФ и ГТФ, а также, возможно, белка, близкого к участвующему в слиянии везикул ЭПР-Гольджи (белок NSF). Это позволяет предполагать, что пролиферация ЭПР включает события слияния, при котором из маленьких везикул ЭПР образуются большие разветвленные цепи взаимосвязанных везикул. Для того чтобы при слиянии образовались трубочки, а не аморфные массы, процесс должен определенным образом регулироваться. У всех эукариот преобладает тубулярная форма ЭПР, что позволяет предполагать, что формообразование является контролируемым и функционально важным процессом. Тубулярная форма может отчасти возникать за счет селективного распределения липидов в местах их локализации при расширении сети ЭПР. У молекул некоторых липидов головки более крупные, чем хвостовые участки, и в результате их присутствие искривляет бислой. Распо-

ложение этих липидов может вызывать локальное скручивание мембраны, благоприятствующее образованию трубочек. Еще одна возможность состоит в том, что трубочки ЭПР формируются за счет белкового каркаса, находящегося на одной из поверхностей мембраны, который и обеспечивает необходимую кривизну. По крайней мере, частично, форма ЭПР зависит от содержания в нем белков. На рис. 3.45 показано, как слабые взаимодействия между трансмембранными белками, входящими в состав ЭПР, значительно меняют форму и характер распределения этой органеллы в клетке. Остается неясным, каким образом плоские слои, характерные для некоторых гранулярных ЭПР, принимают свою форму и почему они часто группируются в структуры, напоминающие стопки.

Необходимость регуляции размера и формы ЭПР подтверждается поведением этой органеллы в клетках, которые предъявляют повышенные требования к сети ЭПР. У клеток, выполняющих секреторные функции, например эндокринных, развивается протяженный гранулярный ЭПР. Это достигается за счет механизма обратной связи, который сигнализирует о необходимости усиления синтеза липидов и белков ЭПР в ответ на усиление транспорта белков через ЭПР. Препараты, которые обезвреживаются в гладком ЭПР, например фенobarбитал, также индуцируют развитие органеллы, и их выведение быстро возвращает гладкий ЭПР к исходному состоянию. Еще одно загадочное проявление способности ЭПР изменять размер, состоит в образовании **кармеллы** при гиперэкспрессии некоторых мембранных белков. На рис. 3.46 приведена клетка, в которой образовалась кармелла. Эта структура представляет собой образование из стопок мембран ЭПР, тесно связанное с ядерной оболочкой и заполненное

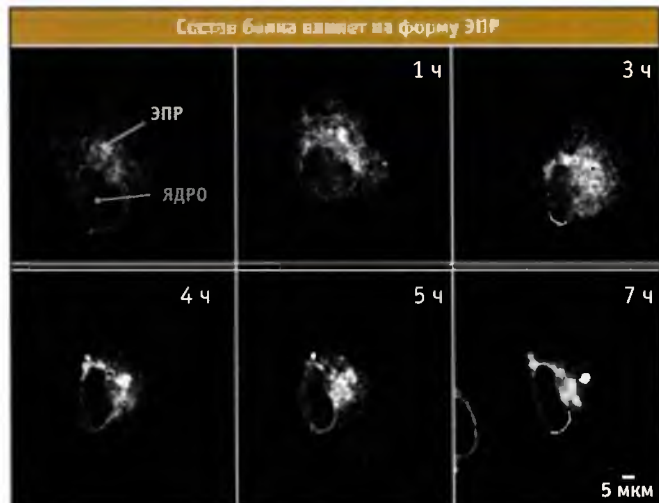


РИС. 3.45. Гиперэкспрессия флуоресцирующего трансмембранного белка на протяжении нескольких часов приводит к изменению структуры ЭПР. Из: *The Journal of Cell Biology*, 2003, vol. 163, pp. 257–269, © Rockefeller University Press

белком. Вероятно, кармеллы служат резервуарами, в которых хранится избыток белков. Опять-таки, возможно существование механизма обратной связи между ЭПР и аппаратами генной экспрессии и синтеза липидов.

Интересно, что отклик неструктурированных белков, представляющий собой одну из систем сигнализации между ЭПР и ядром, о которой говорилось выше, может играть роль в пролиферации ЭПР. Активация UPR не только стимулирует синтез шаперонов в ЭПР, но также синтез инозитола. Последний представляет собой головку молекулы фосфати-

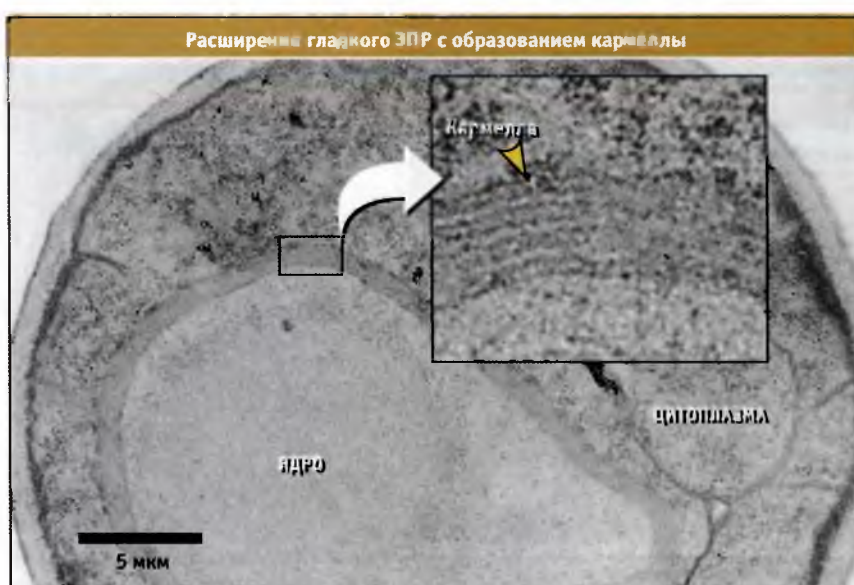


РИС. 3.46. Гиперэкспрессия некоторых трансмембранных белков приводит к образованию стопок ЭПР, называемых кармеллами. Представлена микрофотография дрожжевой клетки в электронном микроскопе, на которой видны кармеллы, окружающие ядро. Из: *The Journal of Cell Biology*, 1988, vol. 107, pp. 101–114, © Rockefeller University Press

дифенилфосфата, одного из четырех основных липидов мембран. У дрожжей эта активация происходит с участием белков Ire1p и Hac1p, т. е. таким же образом, как и активация синтеза шаперонов. Для обеспечения развития новых мембран ЭПР также активируется синтез других фосфолипидов. Таким образом, UPR может обуславливать запуск каскада процессов, участвующих в перестройках ЭПР. Хотя это предположение достаточно привлекательно, оно еще не доказано.

Какой механизм дает клетке возможность воспринимать поступающий при стрессе сигнал как свидетельствующий о необходимости пролиферации ЭПР, а не как сигнал к гибели? При дифференцировке В-клеток в плазматические клетки, секретирующие антитела, активация UPR и развитие мембран ЭПР происходят до усиления синтеза иммуноглобулинов. Эти данные позволяют предполагать, что существуют механизмы, по которым UPR активируется раньше, чем возрастает нагрузка на ЭПР, а не в ответ на нее. Аналогичным образом, ЭПР-компарменты у растений интенсивно используются для хранения различных белков и масел, т. е. компонентов, важных для развития семян и для защиты от патогенов. Эти белки могут агрегировать в компартаментах ЭПР, но таким способом, который не вызывает их деградации. Накоплению белков в таких компартаментах также предшествует активация синтеза шаперонов ЭПР.

Еще один процесс, иллюстрирующий реструктуризацию органеллы, представляет собой распределение ЭПР при митозе (см. 11 Регуляция клеточного цикла). При этом данная

органелла не синтезируется *de novo*, а происходит из предсуществующего ЭПР, поэтому важно обеспечить распределение ее по дочерним клеткам. Одинаковое распределение между дочерними клетками имеет свои преимущества. Когда одна клетка получает значительно меньше половины массы ЭПР, то происходит задержка в следующем клеточном цикле, которая во многих ситуациях представляет опасность. В наибольшей степени подготовка ЭПР к митозу проявляется в области ядерной оболочки. С началом митоза она фрагментируется, и происходит диссоциация комплексов ядерных пор. Эти процессы позволяют предполагать, что существуют сигналы разрушения ядерной оболочки, предшествующие митозу, и сигналы последующей ее сборки. Остальная часть ЭПР также должна сегрегировать при митозе. В некоторых клетках эта сегрегация сопровождается везикуляризацией (т. е. распадом) и повторным образованием ЭПР после завершения митоза. Однако в большинстве клеток в течение митоза ЭПР поддерживается в виде целостной сети и делится на две примерно равные части при цитокинезе. В некоторых случаях, например в раннем эмбриогенезе, ассоциация ЭПР с микротрубочками митотического веретена помогает равномерному распределению ЭПР между дочерними клетками (рис. 3.47).

Еще один аспект биогенеза ЭПР, который в значительной степени остается неисследованным, представляет собой слияние друг с другом компонентов ЭПР. (Это гомотипическое слияние, поскольку две мембраны принадлежат одной и той же органелле). Гомотипическое слияние необходимо

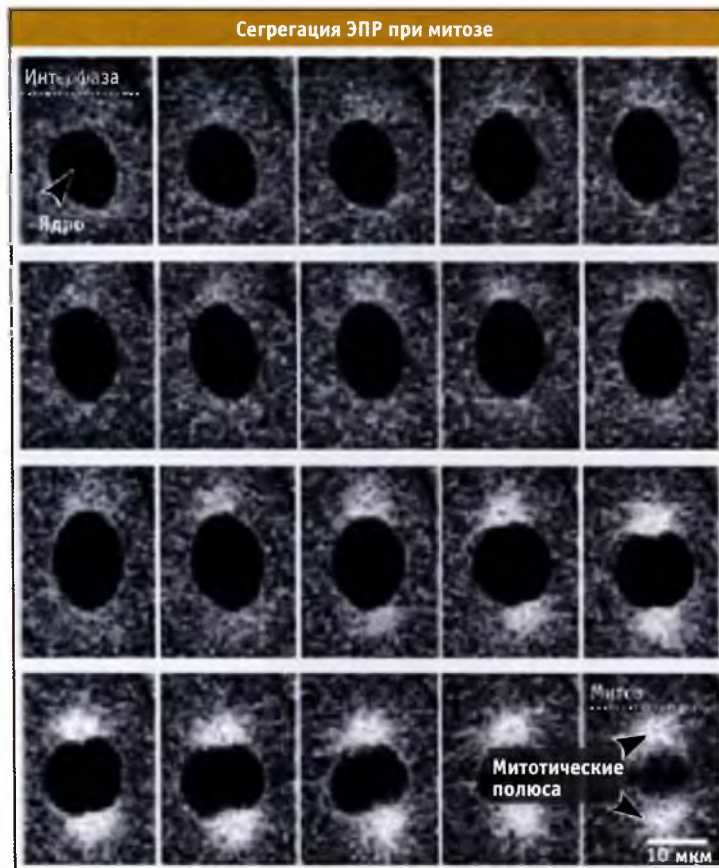


РИС. 3.47. Флуоресцентная микрофотография ЭПР бластомера морского ежа при вхождении в митоз. Интерфаза представлена на левом верхнем снимке, а метафаза — внизу справа. При делении ЭПР сохраняется в виде непрерывной сети и концентрируется на полюсах. Экспрессия флуоресцирующего белка, локализованного в ЭПР, дает возможность наблюдать за этим процессом. Фотография любезно предоставлена Тerasaki M., *Mol. Biol. Cell.* March, 2000. 11(3): 897–914. © 2000 The American Society of Cell Biology

для образования сети ЭПР, для сборки ядерной оболочки после митоза, и происходит при слиянии ядер двух гаплоидных клеток, что у дрожжей известно как **кариогамия**. Для протекания кариогамии необходимы, видимо, те же белки, что и для слияния ЭПР-Гольджи (NSFs, SNAREs, АТФазы и несколько G-белков). Кариогамия уникальна в том отношении, что для нее требуется несколько компонентов посттрансляционного транслокона, однако отличных от тех, которые образуют канал. (Белок KAR2, представляющий собой дрожжевой гомолог BiP, был сначала идентифицирован как участник кариогамии). Какую роль играют в кариогамии эти белки, пока неизвестно. Согласно одному из представлений, они непосредственно не связаны с кариогамией, а способствуют транслокации других белков-участников этого процесса.

В основе транслокации белка в другие органеллы лежат те же принципы, что и при транспорте белков в ЭПР. Это относится к ядру (см. 5 *Структуры ядра и процессы транспорта*), митохондриям, хлоропластам и пероксисомам. Сравнение процессов транслокации белков в различные органеллы показывает, что общими элементами механизма их сортировки являются сигнальные последовательности и каналы.

Почти все белки митохондрий и хлоропластов кодируются ядерными генами и синтезируются в цитозоле. (Геном каждой из этих органел кодирует небольшое количество белков, которые синтезируются в самой органелле.) Ядерные и пероксисомальные белки также образуются в цитозоле. Так же как и в случае белков ЭПР, эти белки должны направляться к соответствующей органелле и транспортироваться через ее мембрану. На рис. 3.48 показано, что доставка белков к определенным органеллам предполагает их позиционирование в ЭПР, митохондриях, хлоропластах, пероксисомах и в ядре, которое происходит с участием различных сигнальных последовательностей. Каждый тип последовательностей узнается системой адресования и специфичным для этой органеллы каналом. Большинство компонентов системы адресования нескольких органелл никак не связаны друг с другом. Это позволяет предполагать, что таргетинг и импорт белков эволюционировали в нескольких различных направлениях.

3.26 Сигнальные последовательности также используются для транспорта белков в другие органеллы

Основные положения

- Сигнальные последовательности служат для адресования белков и их транслокации через мембраны других органелл
- Митохондрии и хлоропласты окружены двойными мембранами, каждый бислой которых содержит свой транслокон
- Матриксные белки направляются к пероксисомам двумя различными путями

Сигналы таргетинга, соответствующие различным органеллам		
ОРГАНЕЛЛА	СИГНАЛ	СИГНАЛ
ЭПР	MDPPRPALLALPALLLLLLLAGARA...	N-терминальный участок
Ядро	...LAEADRKRRGEFRKE...	Внутри молекулы
Митохондрия	MLSNLRILLNKAALRKANTSMVRNFRYGKPVQ...	N-терминальный участок
Хлоропласт	MRTRAGAFFGKQRSTSPSGSSTASRQWLRSSPGRTQRPAAHRLA...	N-терминальный участок
Пероксисома PTS1	...VVVGGGTPSAE	C-терминальный участок
Пероксисома PTS2	MNLTRAGARLQVLLGHLGRP...	N-терминальный участок
<div>Гидрофобные</div> <div>Кислые</div> <div>Основные</div>		

Рис. 3.48 Различные сигнальные последовательности, направляющие белки к определенным органеллам. Последовательности существенно отличаются друг от друга по размерам и по локализации в белках, а также по распределению содержащихся в них остатков заряженных и гидрофобных аминокислот. Эти различия обуславливают различные физические свойства последовательностей, благодаря чему возможно их разделение

3.27 Импорт белков в митохондрии начинается с узнавания сигнальной последовательности на внешней мембране

- Основные положения
- Митохондрии обладают внутренней и внешней мембранами, в каждой из которых присутствует транслокационный комплекс
 - Импорт белков в митохондрии происходит после завершения трансляции
 - Митохондриальная сигнальная последовательность узнается рецептором, расположенным на наружной мембране



Митохондрии могли произойти из захваченных прокариотических клеток, поглощенных более крупными клетками. Впоследствии митохондрии приобрели специализированные энергопродуцирующие функции. Это объясняет, почему они окружены двойной мембраной и содержат собственный геном

Комплекс **ТОМ** (транслоказа внешней мембраны) пронизывает внешнюю мембрану, а **ТИМ** (транслоказа внутренней мембраны) — внутреннюю. В специфических точках между мембранами оба комплекса находятся в контакте, но они способны действовать независимо.

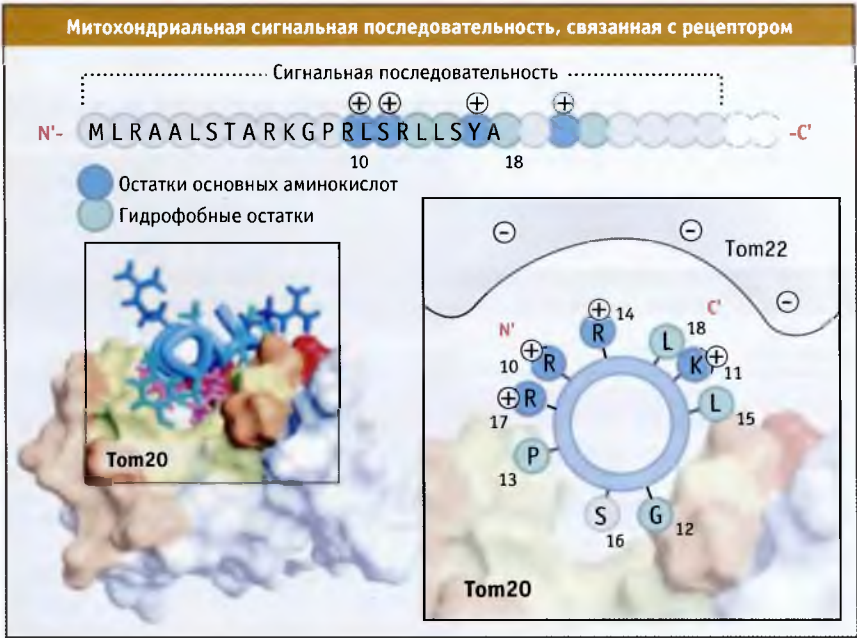


РИС. 3.50. При формировании спиральной структуры последовательность митохондриального сигнала образует поверхности с основными и гидрофобными свойствами. Последовательность аминокислот, соответствующая митохондриальному сигналу, представлена наверху, и та же последовательность, свернутая в спираль, показана справа. Гидрофобный участок спирали взаимодействует с гидрофобной щелью Tom20; остатки положительно заряженных аминокислот взаимодействуют с кислым доменом Tom22. Слева показана структура Tom20, связанная с сигнальной последовательностью; гидрофобная поверхность белка выделена желтым цветом. Фотография любезно предоставлена Даисукэ Кодэ, Университет Кюсю. Из: *Cell*, vol. 100, Abe, Y., et al., Structural Basis of Presequence..., pp. 551–560. © 2000 Elsevier

Митохондриальные белки переносятся к мембране после окончания трансляции. При этом узнается N-концевая сигнальная последовательность, длина которой обычно составляет 20–50 аминокислот. Эта последовательность обогащена как основными (положительно заряженными), так и гидрофобными аминокислотами. Эти остатки образуют амфипатические спирали, заряженные группы которых размещены с одной стороны, а гидрофобные остатки — с другой. Сигнальная последовательность митохондриального белка вначале узнается Tom20, интегральным мембранным белком, который является компонентом TOM-комплекса. Tom20 связывается с гидрофобной стороной сигнальной последовательности, находящейся в мелкой бороздке (в отличие от глубокой и гибкой бороздки, которая используется SRP при таргетинге в ЭПР). Как показывает взаимодействие между сигнальной последовательностью и Tom20 носит слабый характер и позиционирует положительно заряженные остатки в сигнальной последовательности вне связывающего кармана. Затем взаимодействие сигнальной последовательности с TOM-комплексом укрепляется вторым белком, Tom22. Tom22 содержит кислый цитозольный домен, который взаимодействует с остатками основных аминокислот в составе сигнальной последовательности.

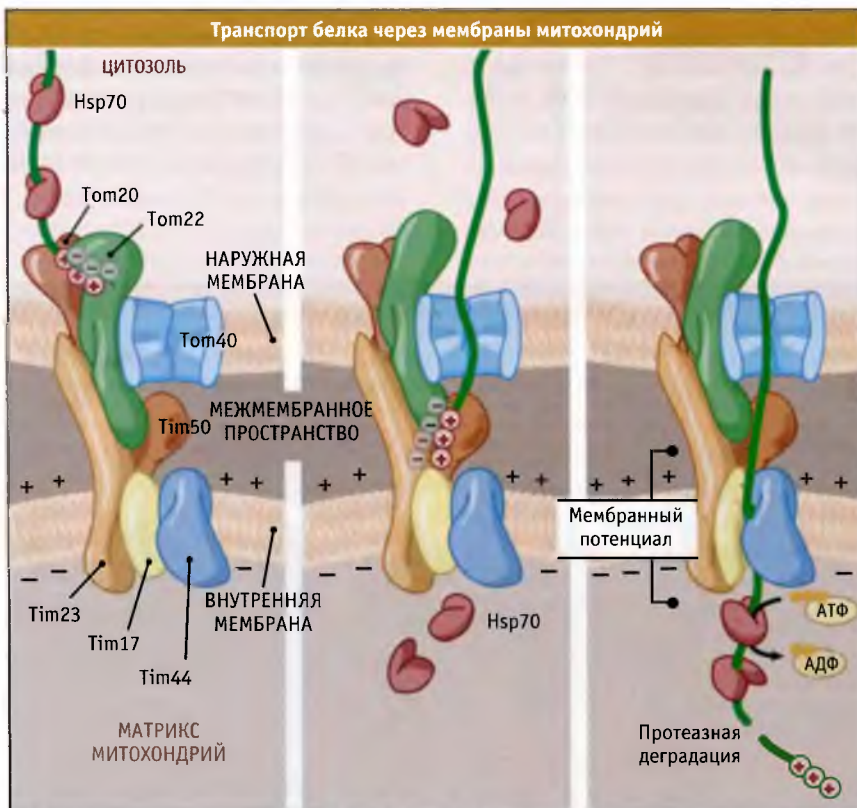
В основном в результате этих двух взаимодействий белок входит в контакт с комплексом TOM. При таргетинге митохондриальные белки находятся в несвернутом состоянии и подготавливаются к транслокации за счет связи с hsp70, находящимся в цитозоле.

3.28 В транспорте митохондриальных белков совместно участвуют комплексы, расположенные на внутренней и наружной мембране

Основные положения

- Комплексы TOM и TIM физически связаны между собой и при импорте белки непосредственно переходят от одного к другому
- Импорт белков обеспечивается энергией за счет Hsp70 матрикса митохондрий и мембранного потенциала внутренней мембраны

Рис. 3.28 иллюстрирует транспорт митохондриального белка с участием комплексов TOM и TIM. Наряду с



Белок, предназначенный для транслокации в матрикс митохондрии, узнается на поверхности наружной мембраны и затем проходит между каналами в наружной и внутренней мембранах. Когда белок достигает матрикса, сигнальная последовательность удаляется. Необходимая для транспорта энергия поставляется за счет гидролиза АТФ шаперонами матрикса и за счет мембранного потенциала на внутренней мембране. Белок Tim23 интегрирован в обе мембраны и связывает между собой каналы

белками Tom20 и Tom22, комплекс TOM содержит и другие белки. Из них в образовании канала, вероятно, принимает участие белок Tom40. До настоящего времени остаются не вполне понятными ни механизм узнавания транслоцируемого белка в канале, ни воротный механизм канала. Однако после прохода в канал основная сигнальная последовательность субстрата за счет сил электростатического притяжения входит в контакт в межмембранном пространстве с кислыми доменами белков Tim22 и Tim23. Последний входит в комплекс TIM. Близость Tom22 и Tim23 обеспечивает прохождение белка между этими комплексами, минуя выход в межмембранное пространство. Существуют данные, свидетельствующие о том, что N-концевой участок Tim23 может быть интегрирован во внешнюю мембрану. Это приводит к тесной ассоциации комплексов TIM и TOM и обеспечивает эффективный перенос белковой цепи от одного комплекса к другому. Предполагается также, что важная роль в транспорте предшественников белков от комплекса TOM в канал TIM23 принадлежит белку Tim50.

После причаливания цепи в комплексе TIM (который образуется в основном белками Tim23, Tim17 и Tim44; из них два первых, вероятно, образуют канал) она продвигается в матрикс под действием двух сил. Белок mtHsp70, являющийся гомологом в матриксе белка, Hsp70, связывается с каналом посредством взаимодействия с Tim44 (см. MBIO:3-0007). Так же как и при посттрансляционной транслокации в ЭПР, mtHsp70 связывает субстрат по мере его выхода из канала и действует как храповой механизм, или как мотор, а

возможно, осуществляет обе функции (см. 3.9 Транслокация происходит за счет энергии гидролиза АТФ). Многое здесь зависит от транслоцируемого субстрата. Транслокации также способствует электрохимический потенциал внутренней мембраны, вероятно, за счет взаимодействия с положительно заряженной сигнальной последовательностью. Потенциал направлен поперек мембраны, что благоприятствует движению положительных зарядов в направлении матрикса. Пока, однако, неизвестно, каким образом потенциал действительно, способствует транслокации. После входа в матрикс большинство сигнальных последовательностей отщепляются растворимой митохондриальной процессирующей протеазой (MPP).

Так же как и в случае белков, интегрированных в мембрану ЭПР, белки митохондриальной мембраны часто позиционируются с участием внутренней неотщепляемой сигнальной последовательности. Эта последовательность также содержит инструкции по интеграции в виде отдельных участков гидрофобных аминокислот. Каким образом узнаются и интегрируются в одну из двух мембран трансмембранные домены, в общем, неизвестно. Белки, которым необходимо интегрироваться во внутреннюю мембрану, позиционируются в альтернативном транслоконе, состоящем из Tim22, Tim54 и Tim18. Транспорту белка из комплекса TOM в этот альтернативный транслокон способствуют небольшие белки, которые называются «Маленькие Тимы», и которые находятся в межмембранном пространстве. Последовательность событий представлена на рис. 3.52. Подробнее об этих процессах почти ничего не известно.

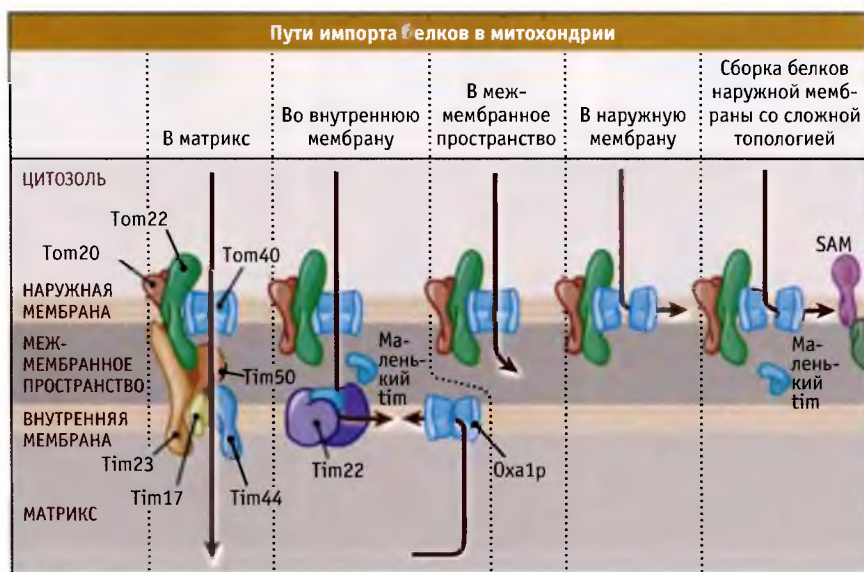


РИС. 3.52. Для импорта белков в различные отсеки митохондрий требуются различные пути. Во многих из них может участвовать комплекс TOM, однако для комплексов внутренней мембраны характерна специализация. Существуют два пути, посредством которых белки могут достигать внутренней мембраны. Некоторые белки используют комбинированный путь: вначале они транспортируются в матрикс, а потом поступают назад в мембрану

Белки внутренней мембраны, независимо от их кодирования в ядре или в митохондриях, интегрируются с участием белка внутренней мембраны Oxa1p. Белки внутренней мембраны, кодируемые в ядре, вначале транслируются через обе мембраны в матрикс. Затем от белка отщепляется сигнальная последовательность, за счет которой происходит импорт, и еще одна последовательность направляет белок обратно к внутренней мембране, где она интегрируется с участием Oxa1p. Белки, кодируемые митохондриальным геномом, синтезируются рибосомами матрикса, и затем непосредственно интегрируются во внутреннюю мембрану с участием Oxa1p. Детали этого процесса пока точно не выяснены.

Идентифицирован еще один транслокон митохондрий, названный «комплекс SAM» (sorting and assembly machinery of the outer membrane complex; сортировочно-сборочный комплекс наружной мембраны). Хотя состав и механизм действия этого комплекса в деталях неизвестны, он, вероятно, благоприятствует транслокации и интеграции белков внешней мембраны, которые пронизывают мембрану β -структурами, а не более обычными α -спиралями. Так же как и комплекс Tim22, для транспорта субстратов из TOM канала, комплекс SAM использует «Маленьких Тимов».

Особый интерес представляет вопрос, как белки внутренней мембраны проходят через наружную мембрану и при этом не интегрируются в нее. Такая специфичность может объясняться различиями между трансмембранными доменами белков внутренней и наружной мембран, которые делают белки внутренней мембраны неузнаваемыми комплексом интеграции TOM. В то же время, не исключено, что комплекс TIM может узнавать белки внутренней мембраны до того, как они интегрируются во внешнюю мембрану комплексом TOM. Пока еще не совсем понятны воротные механизмы, регуляции и координации комплексов TOM и TIM. Хотя многие выполняемые ими функции аналогичны функциям транслокона ЭПР, остается неясным, насколько близки механизмы их функционирования.

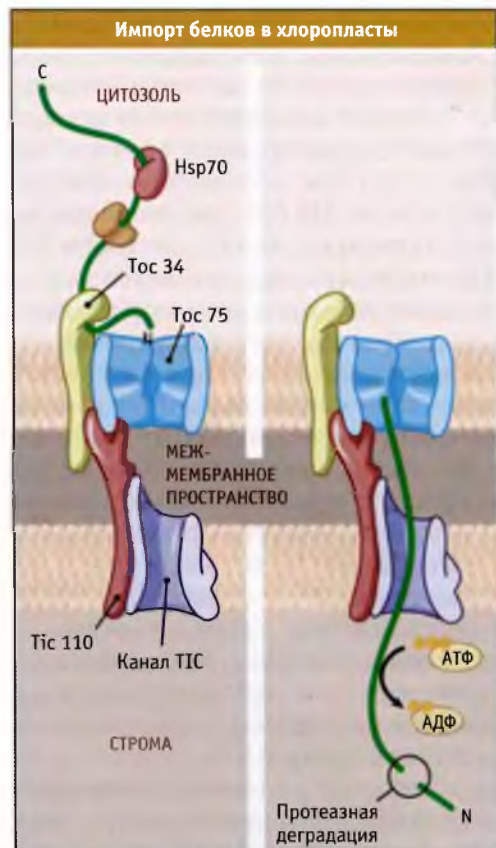


РИС. 3.53. Для того чтобы попасть в строму, белки хлоропластов должны пройти через две мембраны. Предназначенные к импорту белки находятся в цитоплазме и не обладают нативной структурой, что поддерживается с помощью шаперонов. Они продвигаются через связанные между собой каналы в наружной и внутренней мембранах хлоропласта. Когда белки попали в строму, происходит удаление транзитных пептидов. Источник энергии, необходимой для протекания процесса импорта белков, пока неизвестен

происходит с участием hsp70 цитозоля, который предотвращает преждевременное сворачивание молекул. Белок, интегрирующийся в строму, обычно содержит на N-конце **транзитный пептид**, длина которого составляет от 20 до 120 остатков аминокислот. Транзитный пептид характеризуется присутствием центрального региона, богатого серином, треонином и основными аминокислотами, и амфипатическим доменом, который расположен со стороны С-концевого участка. Транзитный пептид содержит информацию о позиционировании белка в хлоропластах. Посредством белка Toc34p переносимый белок связывается с комплексом **ТОС** (транслокон наружной оболочки хлоропласта). Затем он переносится в канал, образованный белком Toc75, который, возможно, также узнает транзитный пептид. Имеются данные о том, что Toc75 может связываться с различными дополнительными белками, в зависимости от переносимого субстрата. При этом широко распространенные белки фотосинтеза, использу-

3.29 Поступающие в хлоропласты белки также должны пройти через две мембраны

Основные положения

- Импорт белков в хлоропласты происходит после окончания трансляции
- Внутренняя и наружная мембраны обладают отдельными транслокационными комплексами, которые в процессе импорта белков функционируют совместно

Так же как и митохондрии, хлоропласты обладают двойной мембраной. Транслокация белков внутрь органеллы (в **строму**) происходит так же, как их транспорт в матрикс митохондрий (рис. 3.53). Белки переносятся в хлоропласты после завершения трансляции, и процесс

ют один канал переноса, а другие редкие белки — другие каналы. Таким образом, представление о том, что различные субстраты требуют участия различных дополнительных факторов для облегчения их транслокации, не ограничивается транслокацией белков в ЭПР.

Субстрат пересекает внутреннюю мембрану посредством комплекса **ТІС** (для транслокона внутренней оболочки хлоропласта). Комплексы ТОС и ТІС физически связаны между собой, и считается, что сигнал к их функционированию подается субстратом. Комплекс ТІС и соответствующий ему канал менее исследованы, чем комплекс ТОС. Что служит источником энергии в процессе транспорта белков с участием комплексов, пока неизвестно. В отличие от митохондрий, хлоропласты не обладают электрохимическим потенциалом на внутренней мембране, который мог бы компенсировать энергетические затраты процесса транспорта. Должен существовать другой источник энергии. Возможно, что это гидролиз АТФ, который происходит с участием стромальных компонентов. Впрочем, может использоваться совершенно другой источник энергии. Когда субстрат попадает в строму, транзитный пептид отщепляется ферментом созревания белков хлоропластов (CPE).

Наряду с внутренней и наружной мембранами хлоропласты содержат внутренние структуры, также имеющие мембраны, которые называются тилакоиды. В тилакоиде мембрана ограничивает компартмент, содержащий множество ферментов фотосинтеза. Большинство этих ферментов синтезируются в цитозоле и должны импортироваться в органеллу. Один из механизмов транспорта белков через мембрану тилакоида реализуется, когда вторая сигнальная последовательность узнается комплексом, напоминающим SecYEG транслокон бактерий (см. 3.9 *Транслокация происходит за счет энергии гидролиза АТФ*). Эта сигнальная последовательность выполняет свою функцию только в том случае, когда белок уже транспортировался в строму.

Примерно половина всех белков, которые транспортируются в люмен тилакоида, используют систему Tat (система Транслокации Твин-Аргинина). Хотя механизм Tat неизвестен, Tat-зависимая сигнальная последовательность весьма напоминает сигнал адресования в ЭПР, с тем исключением, что она имеет менее гидрофобный характер, и содержит два расположенных рядом остатка аргинина, за что и получила свое название. Транслокация через мембрану тилакоида происходит при полной зависимости от трансмембранного градиента pH, одна-ко причины этого неизвестны.

В интеграции белков в мембрану тилакоида участвует гомолог белка внутренней мембраны митохондрий, Oxa1p. Этот гомолог носит название белка Alb3. Позиционирование субстратов на Alb3 осуществляется при их взаимодействии с еще одним белком, который представляет собой стромальный гомолог белка SRP. Функции белка Alb3 выяснены не в полной мере.

Учитывая общую амфипатическую природу сигнальных последовательностей, возникает вопрос, каким об-

разом в цитозоле клеток растений различаются белки митохондрий и хлоропластов? Возможно, что это объясняется отсутствием у Tom22 растений кислого цитозольного домена. Поэтому у клеток растений, в отличие клеток от дрожжей и млекопитающих, выработался другой способ узнавания позиционирования митохондриальных белков.

3.30 Белки сворачиваются перед импортом в пероксисомы

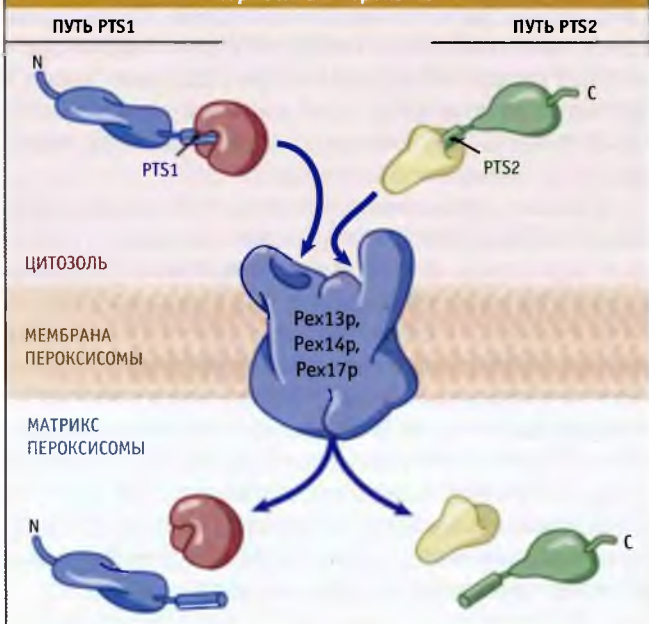
Основные положения

- Сигнальные последовательности пероксисом узнаются в цитозоле и позиционируются в транслокационный канал
- Белки импортируются в пероксисомы после сворачивания
- Белки, узнающие сигнальные последовательности пероксисом, при импорте остаются в связанном с ними состоянии. Они входят в органеллу и выходят из нее
- Мембраны пероксисом образуются при отпочковывании от мембран ЭПР

Так же как и при транспорте в ЭПР, митохондрии и хлоропласты, белки позиционируются и транслоцируются прямо в пероксисомы. Эти органеллы участвуют в таких окислительных процессах, как окисление жирных кислот и образование перекиси водорода, и окружены одним липидным бислоем. В отличие от митохондрий и хлоропластов, пероксисомы не содержат собственного генома, и поэтому все их белки должны импортироваться из цитозоля. Происхождение пероксисом представлялось не вполне ясным, пока не было убедительно продемонстрировано, что они образовались из ЭПР. Их предшественники, которые отпочковались от ЭПР, содержат лишь минимальный набор характерных компонентов, и большая часть белков пероксисом импортируется в органеллы на более поздней стадии их развития.

После завершения трансляции белки содержимого пероксисом или их **матрикса** направляются в органеллу по одному из двух путей. Один путь реализуется с участием С-терминального сигнала пероксисомального адресования (PTS1). Простейшие последовательности PTS1 гораздо короче, чем сигнальные последовательности большинства других органелл, и часто состоят всего из трех остатков аминокислот. Подобно другим сигнальным последовательностям, они различаются по составу. (Каноническая последовательность, содержит серин, цистеин или аланин, после которого расположен остаток основной аминокислоты, а затем лейцин.) Наличие дополнительных аминокислот вне последовательности PTS1 может усиливать адресный сигнал, особенно в случаях, когда состав основной сигнальной последовательности отличается от канонического. Белки, имеющие PTS1, позиционируются на пероксисомах с участием цитозольного белка Pex5p, который связывается с сигнальной последовательностью. Белки, имеющие PTS2, которые рас-

Импорт белка в пероксисомы



Белки пероксисом импортируются после того, как они приобрели нативную структуру и были отобраны одной из двух узнающих систем. Обе системы используют некоторые общие компоненты канала транспорта, однако остальные компоненты специфичны для каждой из них. Белки, узнающие сигнальные последовательности пероксисом, импортируются вместе со своими субстратами

пространены в меньшей степени, чем PTS1, несут более длинные последовательности, обычно расположенные в N-терминальной части молекулы. Эти последовательности представляют собой часть более крупного пептида, который отщепляется после окончания процесса транспорта. Белки PTS2 узнаются и позиционируются другим белком цитозоля, Pex7p. У млекопитающих адресование белков с PTS2 происходит с участием белка, представляющего собой альтернативный вариант сплайсинга Pex5p. Пути пероксисомального импорта белков, с участием PTS1 и PTS2, характеризуются наличием в мембране общих компонентов (рис. 3.34). К числу их относится ком-

плекс заякоривания, состоящий по крайней мере из трех белков, Pex17p, Pex14p и Pex13p. Впрочем, также существуют белки, уникальные для каждого пути импорта. Могут существовать и другие механизмы адресования белков в пероксисомальный матрикс, независимые от PTS1 и PTS2, однако о них известно мало.

Хотя механизм импорта белков матрикса пероксисом исследован не в полной мере, он существенным образом отличается от транслокации белков в ЭПР, митохондрии и хлоропласты, по крайней мере в одном отношении: белки матрикса пероксисом импортируются после того, как они приобрели в цитозоле нативную или даже олигомерную структуру. Эта особенность импортируемых белков хорошо иллюстрируется электронно-микроскопическими исследованиями препаратов, содержащих частицы коллоидного золота, размерами 90 Å, покрытые пептидами PTS1 (рис. 3.55). Несмотря на большие размеры, такие частицы способны импортироваться в пероксисомы. В этом отношении импорт белков в матрикс пероксисом напоминает транспорт через комплекс ядерных пор (см. 5 Структура ядра и процессы транспорта). Вместе с тем, при транспорте в ядро и пероксисому, рецептор, узнающий сигнальную последовательность (т. е. Pex5p при пероксисомальном транспорте и импортины при ядерном транспорте), переносится вместе с транслоцируемым субстратом через мембрану. Рецептор затем экспортируется отдельно и в дальнейшем используется. Содержимое пероксисомы было бы токсично для клетки, если мембрана органеллы была бы также проницаема для белков и мелких молекул, как ядерная оболочка. Поэтому канал транслокации в пероксисоме должен обладать системой эффективного воротного механизма, гарантирующего, что из органеллы ничего не выходит. Каким образом осуществляется такой контроль, неизвестно.

В отличие от полностью транслоцируемых белков, импорт мембранных компонентов пероксисом происходит по-другому. Предполагается, что в процессе участвуют несколько белков, включая Pex19p, Pex3p и Pex16p, причем Pex19p, вероятно, служит рецептором импорта. Однако роли этих белков остаются невыясненными.



РИС.3.55. На этой микрофотографии, сделанной с помощью электронного микроскопа, видны частицы золота, покрытые пептидом PTS1, которые были импортированы в пероксисомы. Размеры золотых частиц составляют 90 Å в диаметре, т. е. существенно выше, чем размеры большинства глобулярных белков. Фотография любезно предоставлена Уолтоном П. А. с сопр. *Mol. Biol. Cell.* June, 1995. 6(6): 675–683. © American Society of Cell Biology

Большая часть настоящей главы посвящена объяснению того, каким образом белки переносятся через мембрану ЭПР. В основном это связано с тем, что транспортная функция ЭПР изучена лучше всего. Достаточно подробно исследован основной путь транслокации секреторных белков. Однако вопросы, связанные с транслокацией более сложных субстратов, остаются неисследованными, в особенности это касается интеграции мембранных белков. Каким образом ориентируются трансмембранные домены и что определяет их интеграцию в мембрану? Какую роль играет взаимодействие между ТМ доменами, которое происходит до момента их интеграции? Наряду с этим, становится ясно, что транслокация представляет собой регулируемый процесс, при котором эффективность позиционирования, переноса и интеграции белка, а также необходимые для этого факторы, существенно зависят от субстрата и от условий, в которых находится клетка. Пока мы не понимаем, как регулируется транслокация и каким образом клетка осуществляет этот процесс в соответствии со своими запросами.

Хотя в настоящее время выяснена структура канала транслокации, способ мобилизации и воротный механизм транслокона еще исследуются. Каким образом узнавание сигнальной последовательности приводит к структурным изменениям канала? Обладает ли структура канала гибкостью, достаточной для переориентации переносимой цепи, или для обеспечения накопления нескольких трансмембранных доменов? Что происходит со структурой канала по окончании транслокации? В какое время и каким образом белки, находящиеся поблизости от транслокона, связываются с ним?

Еще менее изучен вопрос, как ЭПР осуществляет сворачивание белков, а также узнает и удаляет белки с неправильной структурой. Почти совершенно не исследован наиболее фундаментальный аспект процесса, каким образом органелла «чувствует» правильно и неправильно собранный белок. Многое предстоит выяснить о том, как шапероны взаимодействуют с белками. Необходимо определить, насколько тесно взаимодействуют между собой многочисленные системы шаперонов ЭПР и обладают ли они разными или перекрывающимися функциями. Также остается неясным, каким образом клетка принимает решение о деградации белка, обладающего неправильной структурой. Существование механизма, ограничивающего длительность его взаимодействия с шаперонами, представляется привлекательным, однако какие-либо предположения о том, каким образом он может работать, отсутствуют. Наконец, неизвестно, как белок, отобранный для деградации, направляется обратно в канал и в цитозоль. Это же относится к механизму, посредством которого канал может открываться изнутри.

Еще менее изучена роль ЭПР в синтезе и сортировке липидов. Отчасти это связано с тем, что, по сравнению с белками, липиды труднее поддаются анализу, поскольку с ними гораздо сложнее манипулировать экспериментально. Дискуссионным остается основной вопрос, связанный с мембранными липидами: каким образом осуществляется их

адресный транспорт из ЭПР в соответствующие мембраны. Обнаружение физического взаимодействия ЭПР с другими органеллами, например с мембранами митохондрий, предполагает существование возможного механизма переноса. Однако конкретная роль таких контактов не установлена. Также остается неясным, каким образом ЭПР регулирует синтез отдельных фосфолипидов.

Наконец, неизвестны механизмы, управляющие динамикой ЭПР в целом. Каким образом органелла сохраняет свою характерную форму? Как поддерживаются субкомпарменты? Как осуществляется связь ЭПР с цитоскелетом и как он перемещается в клетке? Чем определяются размеры ЭПР и каким образом он расширяется? Существование отклика неструктурированных белков свидетельствует о взаимосвязи между ЭПР и ядром. Возможно, что наличие такой взаимосвязи поможет ответить на некоторые из перечисленных особенностей ЭПР. Наличие контактов между ЭПР и другими компартментами клетки позволяет предполагать, что между ними возможен обмен, однако, каким конкретным образом это может происходить, остается неизвестным.

3.32 Резюме

В клетке содержится много разных органелл, окруженных мембранами, некоторые из которых импортируют белки прямо из цитозоля. Митохондрии, хлоропласты и пероксисомы импортируют необходимые белки. Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) также импортирует белки из цитозоля, однако большинство этих белков транспортируется дальше, или секретируется, или функционирует в органеллах и мембранах, которые не могут импортировать белки сами. К их числу относятся плазматическая мембрана и органеллы секреторного или эндоцитозного пути.

Белки, импортируемые в органеллы, идентифицируются с помощью сигнальной последовательности, представляющей собой короткую цепочку аминокислот, обычно расположенную на N-конце цепи. Последовательности, соответствующие разным органеллам, различаются по длине и по составу. Последовательности ЭПР содержат около двадцати аминокислот и характеризуются протяженным участком, состоящим из гидрофобных остатков. Близкими размерами обладают сигнальные последовательности митохондрий. Однако они содержат чередующиеся группы гидрофобных и заряженных аминокислот. Поэтому, когда сигнальная последовательность принимает форму α спирали, одна ее сторона становится гидрофобной, а другая заряженной. Сигнальная последовательность пероксисом обычно состоит только из трех аминокислотных остатков. Во всех случаях белки идентифицируются и позиционируются больше не в соответствии с составом сигнальных последовательностей, а на основании их физических свойств.

Каждый тип сигнальной последовательности связывается со специфическим рецептором, который направляет белок к определенной органелле. Когда белок достигает органеллы, он транслоцируется внутрь нее по мембранно-

му каналу. От момента распознавания сигнальной последовательности, при синтезе белка или после его завершения, зависит тип транслокации. Котрансляционная транслокация происходит в случаях, когда сигнальная последовательность узнается в процессе синтеза белка. При этом, рибосома, на которой синтезируется белок, связывается с мембраной, и образующийся белок переносится в канал транслокации. Посттрансляционная транслокация происходит, когда сигнальная последовательность узнается после завершения синтеза белка.

Большинство белков попадают в ЭПР путем котрансляционной транслокации. Сразу после выхода сигнальной последовательности с рибосомы с ней связывается частица, распознающая сигнал (SRP). Рибосома и растущий белок позиционируются на мембране ЭПР за счет взаимодействия между SRP и ее рецептором. Затем рибосома вместе с растущей цепью занимает канал, по которому белок проходит через мембрану. Сердцевину канала образует комплекс Sec61, вокруг — большая группа белков, участвующих в транслокации. Все вместе это называется транслоконом. При взаимодействии с сигнальной последовательностью канал открывается, что позволяет цепи войти в него таким образом, который исключает транспорт других молекул через мембрану ЭПР. Трансляция продолжается до тех пор, пока рибосома остается связанной с каналом, и белок транспортируется по нему в люмен.

Интеграция белка в мембрану ЭПР начинается в тот момент, когда трансмембранный домен начинает транслироваться и входить в канал. Поскольку трансмембранные домены обладают гидрофобностью, они узнаются каналом, и проходят через его стенки в липидный бислой мембраны. После узнавания трансмембранного домена транспорт образующегося белка через мембрану прекращается. Трансляция, однако, продолжается, что приводит в выходу дальнейших участков полипептидной цепи в цитозоль. Для полной интеграции мембранных белков с несколькими трансмембранными доменами, вероятно, необходимо многократное открытие и закрытие канала.

Процесс интеграции мембранных белков осложняется необходимостью их определенной ориентации в мембране. Очевидно, что она зависит от свойств трансмембранных доменов белков. Однако не ясно, как домены должны взаимодействовать с каналом, мембранными липидами, или друг с другом, чтобы определить ориентацию белков.

Некоторые белки транслоцируются в ЭПР посттрансляционно. Связывание шаперонов в цитоплазме предотвращает сворачивание этих белков, и пока они находятся в процессе адресования, поддерживает их в состоянии, готовом для транслокации. Адресование обеспечивается при связывании их сигнальных последовательностей с Sec61 в канале транслокации. Это тот же канал, который используется при котрансляционной транслокации, однако содержащий четыре дополнительных белка, включая Sec62 и Sec63. Вновь образованные белки проходят через канал за счет энергии, высвобождающейся при гидролизе АТФ белком BiP в люмене ЭПР. BiP использует гидролиз АТФ для связывания и высвобождения белка на конце канала со стороны люмена. Молекулы BiP остаются

в связанном состоянии достаточно долго и действуют как хrapовик, продвигающий белок в люмен.

При транслокации в ЭПР многие белки подвергаются ковалентной модификации. Обычно сигнальная последовательность удаляется пептидазой вскоре после того, как белок вошел в канал. Остальные участки молекулы транслоцируемого белка часто модифицируются после того, как они прошли в люмен. К белку могут добавляться остатки сахаров олигосахаридтрансферазой, или за счет действия протеиндисульфидизомеразы (ПДИ) в молекуле могут образоваться дисульфидные связи. Некоторые полностью транслоцированные белки расщепляются рядом с С-концевым участком и присоединяются к гликозилфосфатидилинозитолу (ГФИ), фосфолипиду, который связывает их с мембраной.

После попадания в люмен белки начинают приобретать нативную структуру. Это обеспечивается большим количеством разнообразных шаперонов. BiP и Grp94 непосредственно взаимодействуют с неструктурированными белками. Кальнексин и кальретикулин связываются с сахарными остатками, которые добавляются к белкам при транслокации. Они также участвуют в процессе добавления глюкозного остатка к полипептидной цепи. Наличие этого остатка позволяет судить о том, насколько правильной нативной структурой обладает белок. ПДИ участвует в перегруппировке дисульфидных связей, которая сопровождает структурирование белка. После приобретения белками правильной нативной структуры они уже не реагируют с шаперонами и получают возможность выйти из ЭПР в аппарат Гольджи. Если несколько попыток образования белком правильной нативной структуры оказались безуспешными или белок не может образовать комплекс с другими белками, то он возвращается в канал и назад в цитозоль за счет ретроградной транслокации. Когда он попадает в цитозоль, то подвергается деградации в протеосомах.

Накопление в ЭПР больших количеств белков, не имеющих нативной структуры, вызывает отклик неструктурированных белков. Это цепь сигналов от ЭПР к ядру, которые обеспечивают дополнительный синтез шаперонов. Сигнал опосредуется трансмембранными белками, резидентными компонентами ЭПР, которые узнают присутствие неструктурированных белков, не связанных с BiP. При этом запускаются события, в результате которых изменяется экспрессия генов, и ЭПР получает возможность преодолеть последствия избытка неструктурированных белков. В случае высших эукариот, при продолжающемся состоянии стресса, эти же процессы вызывают клеточную гибель.

Импорт белков в митохондрии и хлоропласты происходит после окончания трансляции. Для обеих органелл характерно существование двух мембран. Белки могут быть локализованы в одной из мембран, в межмембранном пространстве или внутри органеллы. Каждая мембрана имеет свой транслокон. У митохондрий они носят название TOM для наружной мембраны и TIM для внутренней мембраны, а у хлоропластов TOC и TIC соответственно. Сигнальные последовательности узнаются транслоконом наружной мембраны. Транслоконы внутренней и наружной мембран связаны между собой, так что импортируемые белки

переносятся между ними непосредственно. Белки митохондрий могут переноситься через обе мембраны и затем при узнавании отдельной сигнальной последовательности снова направляться к внутренней мембране. В транслокации белков хлоропластов через мембрану внутренней органеллы, называемой тилакоидом, также участвует особая сигнальная последовательность.

Транслокация белков в митохондрии происходит за счет электрохимического градиента через внутреннюю мембрану и сил взаимодействия между импортируемыми белками и шаперонами в матриксе митохондрий. За счет чего происходит транслокация в хлоропласты, остается неясным. Мы также не знаем, каким образом происходит интеграция белков в мембраны этих органелл.

Транспорт белков в пероксисомы происходит посттрансляционно, но отличается от их транслокации в другие органеллы. При импорте в пероксисомы белок проходит через одну мембрану, и процесс начинается после того, как он приобрел в цитозоле нативную структуру. Сигнальная последовательность для пероксисом узнается в цитозоле при участии белков, которые остаются связанными с субстратом в момент его транслокации. Белки-переносчики диссоциируют только после того, как они оказались внутри органеллы, и возвращаются в цитозоль для дальнейшего использования. Происхождение белков мембраны пероксисом остается неизвестным.

Наряду с импортом, созреванием и распределением белков, ЭПР выполняет в клетке еще несколько функций. Его функции отражаются в структуре. Транслокация и созревание белков происходят в гранулярном ЭПР, покрытом рибосомами. Гладкий ЭПР отличается от гранулярного. Обычно он представляет собой трубочки, организованные в динамичную сеть, разветвленную по всему цитозолу. Гладкий ЭПР часто связан с элементами цитоскелета и контактирует с другими мембранами клетки. К числу его функций относится синтез липидов для всех клеточных мембран. Липиды должны каким-то образом транспортироваться из ЭПР в другие мембраны, однако неизвестно, как это происходит. Возможно, что это происходит в точках контакта гладкого ЭПР с другими мембранами. ЭПР также служит резервуаром внутриклеточного кальция. Кальций выходит в ответ на получаемый клеткой сигнал, и после выполнения своих функций закачивается назад в органеллу. В специализированных клетках в гладком ЭПР могут также синтезироваться жирорастворимые гормоны или обезвреживаться потенциально опасные для клетки химические соединения. В клетках, специализированных для выполнения какой-либо функции, осуществляемой за счет ЭПР, например секретирующих много белка, или образующих стероидные гормоны, может дополнительно образовываться гранулярный или гладкий ЭПР, и занимать в них большую часть цитозоля. В таких высокоспециализированных клетках как скелетные мышцы, ЭПР также чрезвычайно высокоспециализирован по своему составу и строению. Саркоплазматический ретикулум, который представляет собой специализированный гладкий ЭПР, обернут вокруг саркомеров скелетных мышц и приспособлен для доставки ионов кальция, стимулирующих мышечное сокращение.

Список литературы

3.2 Белки вступают на путь секреции путем переноса через мембрану ЭПР

Обзор

- Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A., 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* v. 286 p. 1882–1888.
- Johnson, A. E. and van Waes, M. A., 1999. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 15 p. 799–842.
- Matlack, K. E., Mothes, W., and Rapoport, T. A., 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* v. 92 p. 381–390.
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B., and Kutay, U., 1996. Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 65 p. 271–303.

3.3 Перед переносом белки связываются с ЭПР с помощью сигнальной последовательности

Обзор

- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Stroud, R. M., and Walter, P., 2001. The signal recognition particle. *Annu. Rev. Biochem.* v. 70 p. 755–775.

Исследования

- Blobel, G. and Dobberstein, B., 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* v. 67 p. 835–851.
- Lingappa, V. R., Chaidze, J., Yost, C. S., and Hedgpeth, J., 1984. Determinants for protein localization: beta-lactamase signal sequence directs globin across microsomal membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 81 p. 456–460.
- von Heijne, G., 1985. Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* v. 184 p. 99–105.

3.4 Сигнальные последовательности узнаются частицей, распознающей сигнал (SRP)

Исследования

- Keenan, R. J., Freymann, D. M., Walter, P., and Stroud, R. M., 1998. Crystal structure of the signal sequence-binding subunit of the signal recognition particle. *Cell* v. 94 p. 181–191.

3.5 Закрепление белков на мембране ЭПР обеспечивается взаимодействием между SRP и ее рецептором

Исследования

- Egea, P. F., Shan, S. O., Napetschnig, J., Savage, D. F., Walter, P., and Stroud, R. M., 2004. Substrate twinning activates the signal recognition particle and its receptor. *Nature* v. 427 p. 215–221.
- Focia, P. J., Shepotinovskaya, I. V., Seidler, J. A., and Freymann, D. M., 2004. Heterodimeric GTPase core of the SRP targeting complex. *Science* v. 303 p. 373–377.
- Raden, D., Song, W., and Gilmore, R., 2000. Role of the cytoplasmic segments of Sec61alpha in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. *J. Cell Biol.* v. 150 p. 53–64.

Rapiejko, P. J. and Gilmore, P. J., 1997. Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 89 p. 703–713.

Snapp, E. L., Reinhart, G. A., Bogert, B. A., Lippincott-Schwartz, J., and Hegde, R. S., 2004. The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J. Cell Biol.* v. 164 p. 997–1007.

3.6 Транслокон представляет собой водный канал, который пропускает белки

Обзор

Johnson, A. E., van Waes, M. A., 1999. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 15 p. 799–842.

Pohlschroder, M., Prinz, W. A., Hartmann, E., and Beckwith, J., 1997. Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* v. 91 p. 563–566.

Исследования

Crowley, K. S., 1994. Secretory proteins move through the ER membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* v. 78 p. 461–471.

Crowley, K. S., Reinhart, G. D., and Johnson, A. E., 1993. The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* v. 73 p. 1101–1115.

Deshaies, R. J., and Schekman, R., 1987. A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* v. 105 p. 633–645.

Esnault, Y., Blondel, M. O., Deshaies, R. J., Schekman, R., and Kepes, F., 1993. The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* v. 12 p. 4083–4093.

Gorlich, D., and Rapoport, T. A., 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* v. 75 p. 615–630.

Mothes, W., Prehn, S., and Rapoport, T. A., 1994. Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J.* v. 13 p. 3973–3982.

Simon, S. M. and Blobel, G., 1991. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 65 p. 371–380.

Van den Berg, B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A., 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* v. 427 p. 36–44.

3.7 Для большинства секреторных и трансмембранных белков эукариот трансляция сопряжена с транслокацией

Обзор

Brodsky, J. L., 1998. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Int. Rev. Cytol.* v. 178 p. 277–328.

Rapoport, T. A., Jungnickel, B., and Kutay, U., 1996. Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 65 p. 271–303.

Исследования

Jungnickel, B., and Rapoport, T. A., 1995. A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* v. 82 p. 261–270.

Kim, S. J., Mitra, D., Salerno, J. R., and Hegde, R. S., 2002. Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner. *Dev. Cell* v. 2 p. 207–217.

Rutkowski, D. T., Lingappa, V. R., and Hegde, R. S., 2001. Substrate-specific regulation of the ribosome-translocon junction by N-terminal signal sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 7823–7828.

3.8 Для некоторых белков адресование и транслокация происходят после трансляции

Обзор

Matlack, K. E., Mothes, W., and Rapoport, T. A., 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* v. 92 p. 381–390.

Rapoport, T. A., Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B., and Staack, O., 1999. Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol. Chem.* v. 380 p. 1143–1150.

Исследования

Hann, B. C., and Walter, P., 1991. The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* v. 67 p. 131–144.

Panzner, S., Dreier, L., Dreier, E., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T. A., 1995. Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* v. 81 p. 561–570.

Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G., and Schekman, R., 1989. Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J. Cell Biol.* v. 109 p. 2641–2652.

3.9 Транслокация происходит за счет энергии гидролиза АТФ

Исследования

Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T. A., 1999. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* v. 97 p. 553–564.

Voisine, C., Craig, E. A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., and Voos, W., 1999. The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* v. 97 p. 565–574.

3.10 Трансмембранные белки выходят из канала транслокации и входят в липидный бислой

Обзор

Matlack, K. E., Mothes, W., and Rapoport, T. A., 1998. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* v. 92 p. 381–390.

Исследования

Do, H., Do, H., Lin, J., Andrews, D. W., and Johnson, A. E., 1996. The cotranslational integration of membrane proteins into the phospholipid bilayer is a multistep process. *Cell* v. 85 p. 369–378.

Heinrich, S. U., Mothes, W., Brunner, J., and Rapoport, T. A., 2000. The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell* v. 102 p. 233–244.

Liao, S., Lin, J., Do, H., and Johnson, A. E., 1997. Both lumenal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* v. 90 p. 31–41.

- Mothes, W., Heinrich, S. U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J., and Rapoport, T. A., 1997. Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 89 p. 523–533.
- Van den Berg, B., Clemons, W. M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S. C., and Rapoport, T. A., 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* v. 427 p. 36–44.
- Yost, C. S., Lopez, C. D., Prusiner, S. B., Myers, R. M., and Lingappa, V. R., 1990. Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature* v. 343 p. 669–672.

3.11 Ориентация трансмембранных белков определяется способом их интеграции в мембрану

Обзор

- Hegde, R. S., and Lingappa, V. R., 1997. Membrane protein biogenesis: regulated complexity at the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 91 p. 575–582.

Исследования

- Borel, A. C. and Simon, S. M., 1996. Biogenesis of polytopic membrane proteins: membrane segments assemble within translocation channels prior to membrane integration. *Cell* v. 85 p. 379–389.
- Hamman, B. D., Chen, J. C., Johnson, E. E., and Johnson, A. E., 1997. The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40–60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* v. 89 p. 535–544.
- Kim, P. K., Janiak-Spens, F., Trimble, W. S., Leber, B., and Andrews, D. W., 1997. Evidence for multiple mechanisms for membrane binding and integration via carboxyl-terminal insertion sequences. *Biochemistry* v. 36 p. 8873–8882.

3.12 Сигнальные последовательности удаляются сигнальной пептидазой

Обзор

- Martoglio, B., and Dobberstein, B., 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* v. 8 p. 410–415.

Исследования

- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y., and Kang, C. Y., 2000. The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* v. 272 p. 417–428.

3.13 К некоторым транслоцированным белкам добавляется гликолипидная группа ГФИ

Обзор

- McConville, M. J., and Menon, A. K., 2000. Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidyl inositol lipids (review). *Mol. Membr. Biol.* v. 17 p. 1–16.
- Udenfriend, S., and Kodukula, K., 1995. How glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane proteins are made. *Annu. Rev. Biochem.* v. 64 p. 563–591.

3.14 В процессе переноса ко многим белкам добавляются сахарные остатки

Обзор

- Helenius, A., and Aebi, M., 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* v. 291 p. 2364–2369.
- Parodi, A. J., 2000. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem. J.* v. 348 Pt 1 p. 1–13.
- Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Damian-Matsumura, P., and Dias, J. A., 1999. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* v. 11 p. 205–215.

3.15 Шапероны способствуют сворачиванию вновь транслоцированных белков

Обзор

- Argon, Y., and Simen, B. B., 1999. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 10 p. 495–505.
- Ellgaard, L., Molinari, M., and Helenius, A., 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* v. 286 p. 1882–1888.
- Gething, M. J., 1999. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 10 p. 465–472.

3.16 При сворачивании белковой молекулы образование правильно ориентированных дисульфидных связей обеспечивается протеиндисульфидизомеразой

Обзор

- Freedman, R. B., Hirst, T. R., and Tuite, M. F., 1994. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* v. 19 p. 331–336.
- Huppa, J. B., and Ploegh, H. L., 1998. The eS-Sence of -SH in the ER. *Cell* v. 92 p. 145–148.
- Wittrup, K. D., 1995. Disulfide bond formation and eukaryotic secretory productivity. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 6 p. 203–208.

Исследования

- Frand, A. R., and Kaiser, C. A., 1999. Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* v. 4 p. 469–477.
- Pollard, M. G. and Weissman, J. S., 1998. Ero1p: A novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* v. 1 p. 171–182.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I., and Rapoport, T. A., 2001. Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* v. 104 p. 937–948.
- Tu, B. P., Ho-Schleher, S. C., Travers, K. J., and Weissman, J. S., 2000. Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* v. 290 p. 1571–1574.
- Weissman, J. S., and Kim, P. S., 1993. Efficient catalysis of disulphide bond rearrangements by protein disulphide isomerase. *Nature* v. 365 p. 185–188.

3.17 Модифицированные остатки углеводов узнаются системой шаперонов кальнексин/кальретикулин

Обзор

- Helenius, A., and Aebi, M., 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* v. 291 p. 2364–2369.

3.18 Сборка белков в комплексы находится под контролем

Обзор

- Reddy, P. S., and Corley, R. B., 1998. Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *Bioessays* v. 20 p. 546–554.

Исследования

- Molinari, M., and Helenius, A., 2000. Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum. *Science* v. 288 p. 331–333.
- Walmsley, A. R., Batten, M. R., Lad, U., and Bulleid, N. J., 1999. Intracellular retention of procollagen within the endoplasmic reticulum is mediated by prolyl 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 14884–14892.

3.19 Неправильно свернутые белки ЭПР поступают в цитозоль, где подвергаются деградации

Обзор

- Kopito, R. R., 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* v. 10 p. 524–530.
- Plempner, R. K., and Wolf, D. H., 1999. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* v. 24 p. 266–270.
- Romisch, K., 1999. Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J. Cell Sci.* v. 112 p. 4185–4191.
- Suzuki, T., Yan, Q., and Lennarz, W. J., 1998. Complex, two-way traffic of molecules across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* v. 273 p. 10083–10086.
- Tsai, B., Ye, Y., and Rapoport, T. A., 2002. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 246–255.

Исследования

- Lilley, B. N., and Ploegh, H. L., 2004. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* v. 429 p. 834–840.
- Ward, C. L., Omura, S., and Kopito, R. R., 1995. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* v. 83 p. 121–127.
- Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L., 1996. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* v. 84 p. 769–779.
- Wiertz, E. J., et al., 1996. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* v. 384 p. 432–438.
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T. A., 2004. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* v. 429 p. 841–847.

3.20 Взаимодействие между ЭПР и ядром предотвращает накопление в люмене несвернутых белков

Обзор

- Gething, M. J., 1999. Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 10 p. 465–472.
- Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J., 2004. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* v. 14 p. 20–28.
- Sidrauski, C., Chapman, R., and Walter, P., 1998. The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell Biol.* v. 8 p. 245–249.

Исследования

- Cox, J. S., Shamu, C. E., and Walter, P., 1993. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* v. 73 p. 1197–1206.
- Harding, H. P., et al., 2001. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol. Cell* v. 7 p. 1153–1163.
- Harding, H. P., et al., 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* v. 11 p. 619–633.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K., 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* v. 10 p. 3787–3799.

Scheuner, D., et al., 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vitro glucose homeostasis. *Mol. Cell* v. 7 p. 1165–1176.

Travers, K. J., et al., 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* v. 101 p. 249–258.

Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K., 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* v. 107 p. 881–891.

3.21 В ЭПР образуются основные клеточные фосфолипиды

Обзор

- Sakai, J., and Rawson, R. B., 2001. The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport. *Curr. Opin. Lipidol.* v. 12 p. 261–266.
- Vance, D. E., and Vance, J. E., eds., 1996. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*. Amsterdam: Elsevier.

Исследования

- DeBose-Boyd, R. A., Brown, M. S., Li, W. P., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., and Espenshade, P. J., 1999. Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* v. 99 p. 703–712.
- Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Espenshade, P. J., 2000. Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* v. 102 p. 315–323.
- Vance, J. E., 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* v. 265 p. 7248–7256.

3.22 Липиды должны перемещаться с ЭПР на мембраны других органелл

Обзор

- Kang, S., and Davis, R. A., 2000. Cholesterol and hepatic lipoprotein assembly and secretion. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1529 p. 223–230.
- Stachelin, L. A., 1997. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* v. 11 p. 1151–1165.
- Trotter, P. J., and Voelker, D. R., 1994. Lipid transport processes in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1213 p. 241–262.

3.23 Два слоя мембраны часто различаются по составу липидов

Обзор

- Daleke, D. L., and Lyles, J. V., 2000. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1486 p. 108–127.

Исследования

- Helenius, J., Ng, D. T., Marolda, C. L., Walter, P., Valvano, M. A., and Aebi, M., 2002. Translocation of lipid-linked oligosaccharides across the ER membrane requires Rft1 protein. *Nature* v. 415 p. 447–450.

3.24 Морфологически и функционально ЭПР подразделяется на ряд отделов

Обзор

- Sitia, R. and Meldolesi, J., 1992. Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol. Biol. Cell* v. 3 p. 1067–1072.
- Szabadkai, G. and Rizzuto, R., 2004. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett.* v. 567 p. 111–115.
- Vertel, B. M., Walters, L. M., and Mills, D., 1992. Subcompartments of the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Biol* v. 3 p. 325–341.

3.25 ЭПР представляет собой динамическую органеллу

Обзор

- Galili, G., 2004. ER-derived compartments are formed by highly regulated processes and have special functions in plants. *Plant Physiol.* v. 136 p. 3411–3413.
- Powell, K. S., and Latterich, M., 2000. The making and breaking of the endoplasmic reticulum. *Traffic* v. 1 p. 689–694.
- Thyberg, J., and Moskalewski, S., 1998. Partitioning of cytoplasmic organelles during mitosis with special reference to the Golgi complex. *Microsc. Res. Tech.* v. 40 p. 354–368.
- Vitale, A., and Ceriotti, A., 2004. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? *Plant Physiol.* v. 136 p. 3420–3426.

Исследования

- Cox, J. S., Chapman, R. E., and Walter, P., 1997. The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol. Biol. Cell* v. 8 p. 1805–1814.
- Dreier, L., and Rapoport, T. A., 2000. In vitro formation of the endoplasmic reticulum occurs independently of microtubules by a controlled fusion reaction. *J. Cell Biol.* v. 148 p. 883–898.
- Jones, A. L., and Fawcett, D. W., 1966. Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital (with a O63op on the functions of this organelle in liver). *J. Histochem. Cytochem.* v. 14 p. 215–232.
- Snapp, E. L., Hegde, R. S., Francolini, M., Lombardo, F., Colombo, S., Pedrazzini, E., Borgese, N., and Lippincott-Schwartz, J., 2003. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* v. 163 p. 257–269.
- Terasaki, M., 2000. Dynamics of the endoplasmic reticulum and golgi apparatus during early sea urchin development. *Mol. Biol. Cell* v. 11 p. 897–914.
- van Anken, E., Romijn, E. P., Maggioni, C., Mezghrani, A., Sitia, R., Braakman, I., and Heck, A. J., 2003. Sequential waves of functionally related proteins are expressed when B cells prepare for antibody secretion. *Immunity* v. 18 p. 243–253.

3.27 Импорт белков в митохондрии начинается с узнавания сигнальной последовательности на внешней мембране

Обзор

- Lithgow, T., 2000. Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS Lett.* v. 476 p. 22–26.
- Pfanner, N., 2000. Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr. Biol.* v. 10 p. R412–R415.

Исследования

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., and Kohda, D., 2000. Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* v. 100 p. 551–560.

3.28 В транспорте митохондриальных белков совместно участвуют комплексы, расположенные на внутренней и наружной мембранах

Обзор

- Koehler, C. M., 2000. Protein translocation pathways of the mitochondrion. *FEBS Lett.* v. 476 p. 27–31.
- Koehler, C. M., 2004. New developments in mitochondrial assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 20 p. 309–335.
- Luirink, J., Samuelsson, T., and de Gier, J. W., 2001. YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* v. 501 p. 1–5.
- Shore, G. C., et al., 1995. Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Eur. J. Biochem.* v. 227 p. 9–18.

Исследования

- Donzeau, M., et al., 2000. Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* v. 101 p. 401–412.
- Voisine, C., Craig, E. A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., and Voos, W., 1999. The protein import motor of mitochondria: Unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* v. 97 p. 565–574.

3.29 Поступающие в хлоропласты белки также должны пройти через две мембраны

Обзор

- Jarvis, P., and Robinson, C., 2004. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr. Biol.* v. 14 p. R1064–R1077.
- Luirink, J., Samuelsson, T., and de Gier, J. W., 2001. YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* v. 501 p. 1–5.
- Macasev, D., Newbigin, E., Whelan, J., and Lithgow, T., 2000. How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from Arabidopsis differ from their fungal counterparts. *Plant Physiol.* v. 123 p. 811–816.
- Robinson, C., and Bolhuis, A., 2004. Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1694 p. 135–147.
- Schleiff, E., and Soll, J., 2000. Travelling of proteins through membranes: translocation into chloroplasts. *Planta* v. 211 p. 449–456.

3.30 Белки сворачиваются перед импортом в пероксисомы

Обзор

- Hettema, E. H., Distel, B., and Tabak, H. F., 1999. Import of proteins into peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1451 p. 17–34.
- Titorenko, V. I., and Rachubinski, R. A., 1998. The endoplasmic reticulum plays an essential role in peroxisome biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* v. 23 p. 231–233.

Исследования

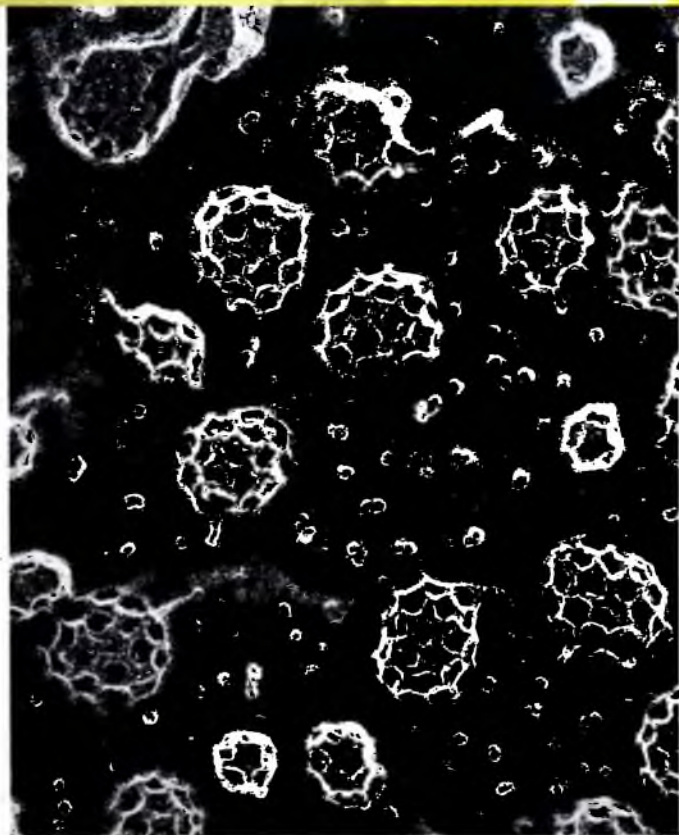
- Dammai, V., and Subramani, S., 2001. The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* v. 105 p. 187–196.
- Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P., and Tabak, H. F., 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* v. 122 p. 85–95.
- Walton, P. A., Hill, P. E., and Hill, S., 1995. Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Mol. Biol. Cell* v. 6 p. 675–683.

Перемещение белков между мембранами

Грэм Уоррен и Ира Меллман

Отдел биологии клетки, Людвиговский институт раковых исследований, медицинский факультет Йельского университета, Нью-Хейвен, КТ

Фотография в электронном микроскопе, показывающая ямки, окаймленные клатрином, которые принимают участие в захвате клеткой различных материалов из внешней среды. Фотография любезно предоставлена Джоном Хойзером, медицинский факультет университета Вашингтон



КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛАВЫ

- 4.1** Введение
- 4.2** Обзор путей экзоцитоза
- 4.3** Обзор путей эндоцитоза
- 4.4** Представления о везикулярном транспорте белков
- 4.5** Представления о сигнальном транспорте и о неизбирательном потоке белков
- 4.6** COPII-окаймленные везикулы участвуют в транспорте из ЭПР в аппарат Гольджи
- 4.7** Резидентные белки, выходящие из ЭПР, возвращаются обратно
- 4.8** COP I-окаймленные везикулы участвуют в ретроградном транспорте белков из аппарата Гольджи в ЭПР
- 4.9** Существуют две распространенные модели, описывающие прямой транспорт белков через аппарат Гольджи
- 4.10** Удержание белков в аппарате Гольджи зависит от домена, пронизывающего мембрану
- 4.11** Rab-ГТФазы и удерживающие белки представляют собой два типа белков, регулирующих адресование везикул
- 4.12** Белки SNARE, вероятно, участвуют в слиянии везикул с мембранами-мишенями
- 4.13** Обычно в эндоцитозе участвуют клатриновые везикулы
- 4.14** Адаптерные комплексы связывают клатрин и трансмембранные белки карго
- 4.15** Некоторые рецепторы рециклируют из ранних эндосом, в то время как другие разрушаются в лизосомах
- 4.16** При созревании ранние эндосомы превращаются в поздние эндосомы и лизосомы
- 4.17** В транс-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков
- 4.18** Поляризованные эпителиальные клетки транспортируют белки к апикальной и базолатеральной мембранам
- 4.19** Некоторые клетки запасают белки для последующей секреции
- 4.20** Что дальше?
- 4.21** Резюме
- Список литературы

Основные положения

- Клетки эукариот обладают развитой системой внутренних структур, окруженных мембранами, которые называются органеллами
- Каждая органелла обладает уникальным составом (глико)протеинов и (глико)липидов и выполняет определенный набор функций
- Каждая органелла содержит один или несколько компартментов, ограниченных мембранами
- Органеллы выполняют свои функции автономно или в группах
- При эндоцитозе и экзоцитозе переносимые белки (белки карго) транспортируются между компартментами через транспортные везикулы, которые образуются отпочковыванием от поверхности органеллы и затем сливаются с мембраной-мишенью акцепторного компартмента
- Транспортные везикулы могут избирательно включать переносимый материал и исключать те компоненты, которые должны оставаться в органелле, из которой везикулы образовались
- Селективное включение в везикулы обеспечивается сигналами, присутствующими в первичной структуре белка или в углеводной структуре
- Транспортные везикулы содержат белки, которые направляют их к местам назначения и связывания. В дальнейшем везикулы сливаются с акцепторным участком мембраны

Одной из характерных особенностей эукариотической клетки является присутствие в ней развитой системы внутренних структур, окруженных мембранами, которые называются **органеллы**. Для клеток эукариот характерно присутствие мембран, разделяющих их внутреннее содержимое на функционально-различные **компартменты**, тогда как все клетки живых организмов обладают наружной двухслойной мембраной. Одно из преимуществ компартментализации состоит в том,

что клетка имеет возможность создавать необходимое окружение для выполнения функций, требующих определенного химического состава среды.

На проиллюстрировано строение и разнообразие органелл, имеющих мембрану, которые обычно присутствуют в эукариотической клетке (в данном случае в типичной животной клетке) (см. также 3 *Мембранное адресование белков* и 5 *Структура ядра и процессы транспорта*). Каждая органелла содержит один или несколько компартментов. Например, **эндоплазматический ретикулум (ЭПР)** представляет собой один компартмент; напротив, **аппарат Гольджи** состоит из нескольких окруженных мембранами компартментов, обладающих определенными биохимическими функциями. Для митохондрии характерны два компартмента, матрикс и межмембранное пространство, содержащие набор определенных макромолекул.

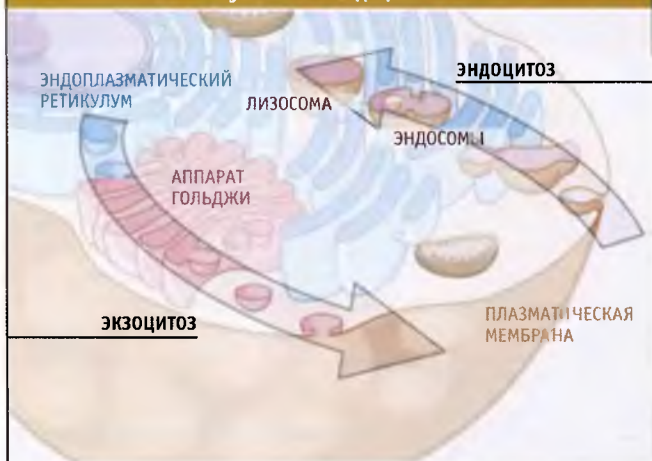
Цитозоль может считаться одним компартментом, ограниченным **плазматической мембраной** и находящимся в контакте с наружной частью мембраны всех внутриклеточных органелл. **Цитоплазма** состоит из цитозоля и органелл. Аналогичным образом, нуклеоплазма ограничена внутренней ядерной мембраной.

Каждая органелла содержит уникальный набор белков (как мембранных, так и растворимых), липидов и других молекул, необходимых для выполнения ее функций. Некоторые липиды и белки ковалентно связаны с олигосахаридами. По мере роста и деления клеток должны синтезироваться их новые компоненты, необходимые для роста, деления и окончательного распределения внутриклеточного материала между двумя дочерними клетками. При дифференцировке и развитии клетки, а также в ответ на воздействие таких внешних факторов, как стресс, происходит синтез компонентов органелл.



Компартменты, ограниченные мембранами в типичной клетке животных

Пути экзо- и эндоцитоза



Экзоцитоз и эндоцитоз. В экзоцитозе участвуют эндоплазматический ретикулум (включая ядерную оболочку) и аппарат Гольджи (представлена одна стопка цистерн). Эндоцитоз происходит с участием ранних и поздних эндосом и лизосом

Однако компоненты не всегда образуются в той органелле, где они функционируют. Обычно различные макромолекулы образуются в сайтах, специально предназначенных для их синтеза. Например, большинство белков образуются на рибосомах цитозоля, который является оптимальной средой для функционирования рибосом и синтеза белка.

Возникает следующий вопрос: каким образом компоненты органелл попадают в места их функционирования? С начала 1970-х гг. этот вопрос являлся центральным в клеточной биологии. Как следует из рис. 4.1, существует, по крайней мере, восемь основных типов органелл, каждая из которых состоит из сотен или тысяч различных белков и липидов. Все эти молекулы должны транспор-

тироваться в органеллы, в которых они выполняют свои функции. Большинство белков образуется в цитозоле, и поэтому возникает вопрос: как они доставляются в соответствующие органеллы или же выходят из клетки, если принадлежат к секретируемым белкам? Во многих случаях ответом на этот вопрос служит наличие в молекуле белка специальных сигналов, обычно называемых **сигналами сортировки** или сигналами адресования. Они представляют собой короткие последовательности аминокислот, присутствующие в первичной структуре тех белков, которые должны быть локализованы не в цитозоле (подробнее см. 4.5 Представления о сигнальном транспорте и о неизбифательном потоке белков). Каждый адрес назначения белковой молекулы связан с одним или несколькими различными видами сигналов (подробнее о доставке липидов см. 3.22 Липиды должны перемещаться с ЭПР на мембраны других органелл).

Сигналы сортировки узнаются специальными системами клетки по мере продвижения белка к месту назначения. Как показано на рис. 4.2, существует два основных транспортных механизма: **экзоцитоз** (или секреторный путь) и **эндоцитоз**, при котором материал (**карга**) транспортируется из клетки и в клетку соответственно (подробнее см. 4.2 Обзор путей экзоцитоза и 4.3 Обзор путей эндоцитоза). Для всех вновь синтезированных белков, предназначенных для секреции из клетки, или для поступления в органеллы путем экзо- или эндоцитоза на мембране ЭПР существует общая точка входа. Сигналами к транслокации белка через мембрану ЭПР служат сигнальные последовательности (см. 3 Мембранное адресование белков). В настоящей главе мы рассмотрим сигналы сортировки, которые направляют белки к местам их назначения.

Находясь в ЭПР, белок не может транспортироваться через цитоплазму, и единственным путем его попадания в другие органеллы, окруженные мембранами, является **везикулярный транспорт**. **Транспортные везикулы** в основном состоят из белков и липидов и, как говорят,

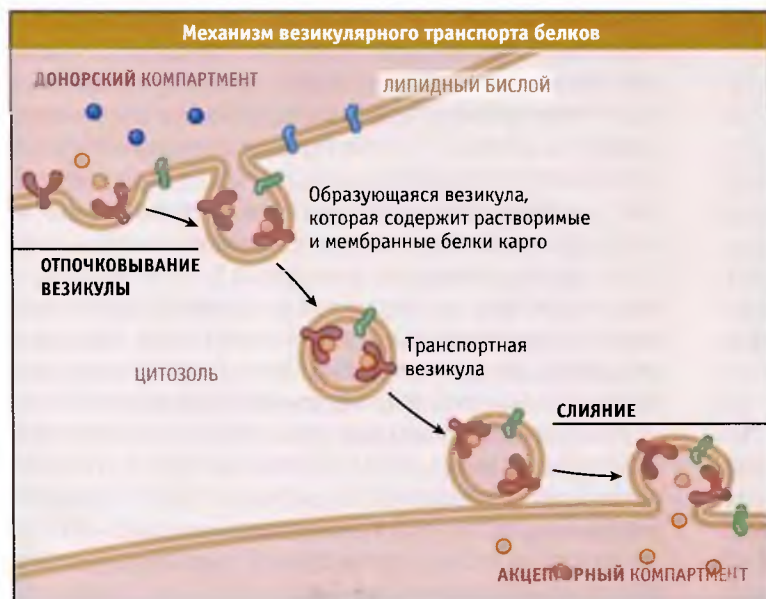


Рис. 4.1. При везикулярном транспорте везикула отпочковывается от мембраны одного компартмента и сливается с мембраной другого компартмента

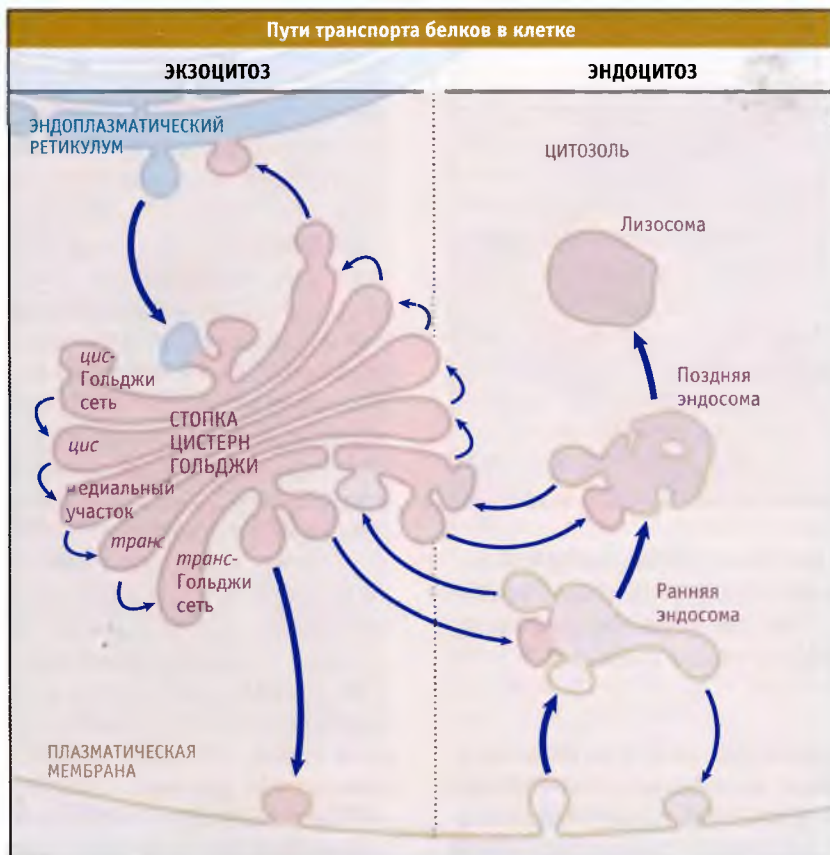


РИС. 4.4. Пути транспорта белков в типичной животной клетке. Почти все транспортные потоки могут осуществляться в двух направлениях

«отпочковываются» от мембраны (рис. 4.3). (Подробнее см. 4.4 *Представления о везикулярном транспорте белков*.) После того как везикула отпочковалась, она сливается со следующим компартментом, находящимся на ее пути. Компартмент, из которого возникла везикула, обычно называется **донорский компартмент** (или исходный компартмент), а компартмент назначения (или целевой) обычно называется **акцепторный компартмент**.

Транспортные везикулы прямым или непрямым путем переносят белки из ЭПР ко всем остальным компартментам на пути экзо- или эндоцитоза (рис. 4.4). При эндоцитозе везикулы образуются на плазматической мембране. Эти везикулы транспортируют заключенный в них материал в эндосомы, из которых образуются другие везикулы, переносящие материал в другие компартменты. Таким образом, состав транспортных везикул различается в зависимости от их происхождения и компартмента назначения.

Везикулярный транспорт создает проблему для органелл, с которыми обмениваются везикулы. Для нормального функционирования должен поддерживаться определенный внутренний состав органелл. Однако каким образом этого можно достичь, если везикулы все время изменяют этот состав? Масштаб проблемы становится очевидным при расчете эф-

фективности транспорта. По пути эндоцитоза количество мембранных белков и липидов, эквивалентное их общему содержанию в плазматической мембране, способно транспортироваться через органеллы менее чем за час. Если сравнить со временем, необходимым для синтеза новой органеллы (обычно один день), то такая скорость впечатляет.

Решение этой проблемы связано с селективностью транспортного процесса. При отпочковывании в везикулу проходят только те белки, которые необходимо транспортировать. Резидентные белки органеллы в везикулу не попадают. Везикула удерживает эти белки и передает их следующей, находящейся на пути везикуле. Для поддержания гомеостаза между органеллами, по своей природе везикулярный транспорт всегда должен быть двунаправленным (см. рис. 4.4), т. е. компоненты донорского компартмента не должны непрерывно переноситься в акцепторный компартмент. Механизм рециклирования возвращает некоторые компоненты везикул в донорский компартмент для их повторного использования. Поскольку селективность отбора белков несовершенна, специальный механизм утилизации возвращает назад резидентные белки, случайно попавшие в везикулу из донорского компартмента (см. подробно 4.7 *Резидентные белки, выходящие из ЭПР, возвращаются обратно*).

4.2 Обзор путей экзоцитоза

Основные положения

- Во всех эукариотических клетках на пути экзоцитоза находятся одни и те же основные компартменты: эндоплазматический ретикулум, компартменты аппарата Гольджи и транспортные везикулы, осуществляющие дальнейший перенос от аппарата Гольджи
- Количество и строение органелл экзоцитоза варьируют от организма к организму и от клетки к клетке
- Каждая органелла на пути экзоцитоза обладает специализированной функцией
- Эндоплазматический ретикулум является местом синтеза и сворачивания белков
- В аппарате Гольджи происходит модификация, сортировка и дальнейший перенос белков к месту назначения с помощью транспортных везикул
- Транспорт карго к плазматической мембране происходит или непосредственно, за счет конститутивного процесса, или опосредованно, за счет регулируемого процесса, который включает временное хранение белков в секреторных гранулах до момента получения клеткой соответствующего сигнала

Экзоцитоз представляет собой один из путей перемещения белков, предназначенных для плазматической мембраны или на экспорт во внеклеточное пространство. Ранее этот путь назывался секреторным, поскольку впервые был обнаружен в специализированных клетках, названных панкреатическими ацинарными клетками, которые секретируют пищеварительные ферменты. Ферменты составляют большую часть секретируемых белков. Этот факт был использован Паладом с сотрудниками для того, чтобы проследить маршрут этих белков. Ими были проведены пульс-чейз эксперименты, в которых срезы ткани поджелудочной железы инкубировали с радиоактивно меченными аминокислотами, и в течение определенного времени регистрировали положение радиоактивных белков методом радиоавтографии. Исследователи показали, что пищеварительные ферменты синтезируются в ЭПР и транспортируются оттуда в аппарат Гольджи (рис. 4.5). Затем ферменты обнаруживаются в уплотняющихся гранулах, которые после созревания становятся зимогеновыми гранулами. Эти гранулы локализованы поблизости от участка плазматической мембраны, выстилающего проток, по которому ферменты поступают в тонкий кишечник. Высвобождение ферментов происходит только в процессе **регулируемой секреции**, когда клетка получает соответствующий стимул, например воздействие гормона, который высвобождается в пищеварительный тракт под действием пищи (подробнее о регулируемой секреции см. 4.19 *Некоторые клетки запасают белки для последующей секреции*). В отличие от регулируемой, **конститутивная секреция** представляет собой процесс, при котором секреция белков происходит непрерывно. Эта форма преобладает в клетках, для которых нехарактерна регулируемая секреция. Например, клетки печени постоянно секретируют белки в плазму крови (альбумин). При регулируемой и конститутивной секреции содержащие белок везикулы сливаются

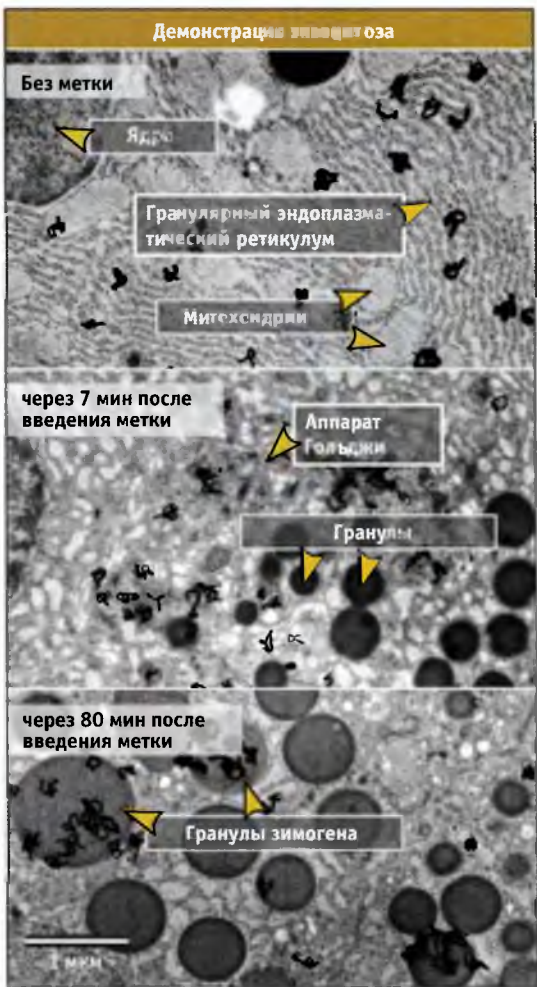


Рис. 4.5. Механизм секреторного транспорта был выяснен при исследовании биогенеза гранул зимогена. Срезы поджелудочной железы импульсно метили H^3 лейцином, инкубировали в течение 0, 7 и 80 мин и фиксировали. После фиксации готовили препараты для электронной микрофотографии. Темные зерна, соответствующие вновь синтезированным секреторным белкам, вначале локализуются над ЭПР (верхний снимок), затем над аппаратом Гольджи (средний снимок), и потом над секреторными/зимогеновыми гранулами (нижний снимок). Верхний снимок: из *The Journal of Cell Biology*, 1967, vol. 34, p. 597. © Rockefeller University Press; нижний снимок: из *The Journal of Cell Biology*, 1971, vol. 48, p.503. © Rockefeller University Press. Все фотографии любезно предоставлены Джеймсом Д. Джамисоном, медицинский факультет Йельского университета

с плазматической мембраной в результате процесса, называемого **экзоцитоз** (рис. 4.6).

Организация пути экзоцитоза в ацинарных клетках поджелудочной железы показана на рис. 4.7. ЭПР представлен единственным компартментом с четко выраженными доменами, среди которых наиболее важную роль в секреции играет гранулярный, или шероховатый, ЭПР (ГРЭПР). «Шероховатость» его обусловлена связанными рибосомами, синтезирующими



РИС. 4.6. Фотография в трансмиссионном электронном микроскопе, показывающая гранулы зимогена, сливающиеся с плазматической мембраной. Содержимое гранул высвобождается в проток поджелудочной железы. Фотография любезно предоставлена Лелио Орци, Женевский Университет, Швейцария

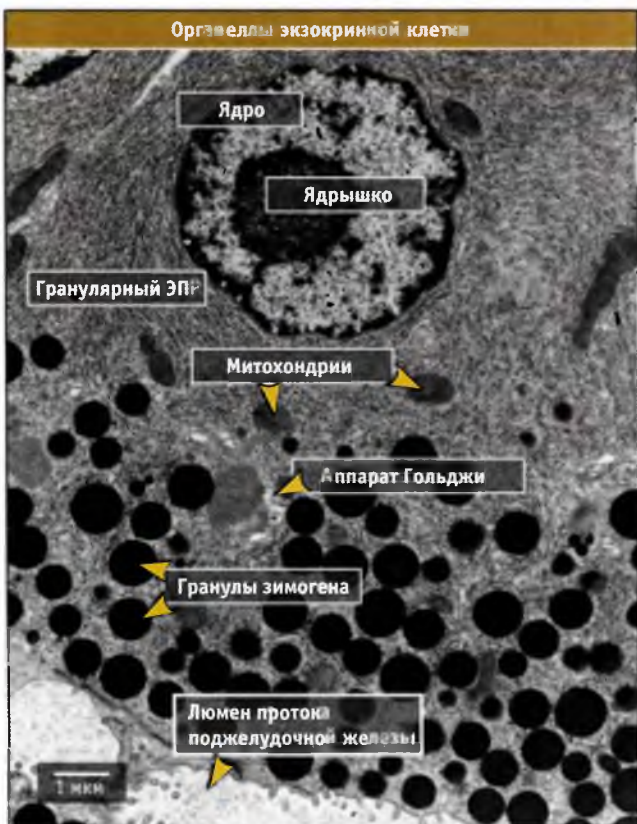


РИС. 4.7. Фотография в трансмиссионном электронном микроскопе, показывающая органеллы в ацинарной клетке поджелудочной железы. В экзоцитозе участвует гранулярный эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и гранулы зимогена. В этих клетках особенно развит гранулярный ЭПР и много гранул зимогена. Фотография любезно предоставлена Лелио Орци, Женевский университет, Швейцария

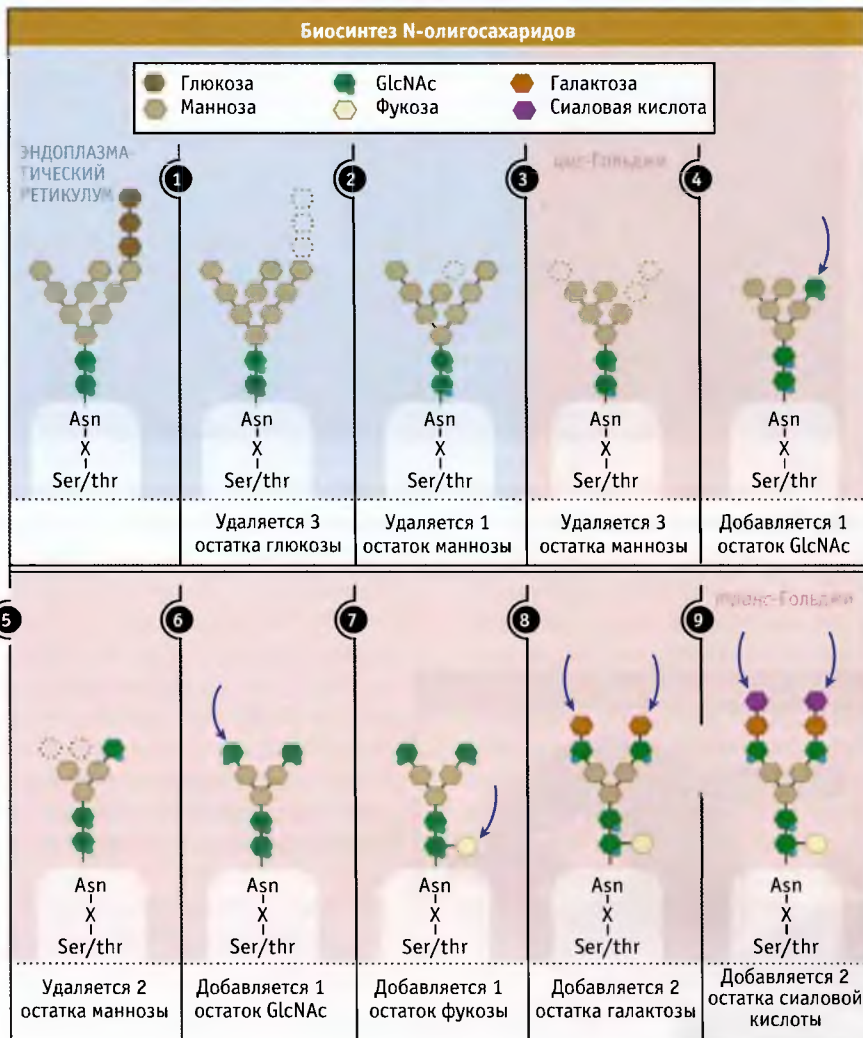
секреторные белки, которые переносятся через липидный бислой в люмен ЭПР (см. 3 *Мембранное адресование белков*). Уплотненные цистерны ЭПР упакованы вместе и занимают базальную часть клетки. Большое количество элементов ЭПР в клетках поджелудочной железы обеспечивает достаточное количество рибосомальных сайтов связывания и транслокации для 10 млн пищеварительных ферментов, которые синтезируются в них каждую минуту. В большинстве клеток эукариот мембраны ЭПР представляют собой наиболее распространенные внутриклеточные мембраны. Даже в клетках, не специализированных на секрецию белков, на мембраны ЭПР обычно приходится около 50% от всех клеточных мембран.

Вновь синтезированные секреторные белки переносятся от ЭПР в аппарат Гольджи, который представляет собой органеллу, содержащую множество компартментов (см. рис. 4.4). Характерной особенностью органеллы является наличие **стопок Гольджи**, или диктиосом, представляющих собой вертикальные ряды уплотненных цистерн, напоминающих стопки пита хлеба (плоский круглый хлеб с кармашком внутри, который можно заполнить любой начинкой). Стопка Гольджи обладает полярностью и состоит из *цис*-, *медиа*- и *транс*-цистерн. *Цис*-цистерна расположена со стороны входа в аппарат Гольджи, а *транс*-цистерна находится у выхода из нее. Расширенные края цистерн представляют собой места, откуда отпочковываются транспортные везикулы, и с которыми происходит их слияние.

Цистерны Гольджи содержат различные ферменты, которые осуществляют посттрансляционные модификации большинства транспортируемых белков. Лучше всего охарактеризованы ферменты, которые модифицируют О- и Н-олигосахариды, связанные с белками. Эти олигосахариды выполняют много функций, включая адресование в лизосомы вновь синтезированных лизосомальных ферментов (подробнее см. 3.14 *В процессе переноса ко многим белкам добавляются сахарные остатки* и 4.17 *В транс-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков*).

Как показано на РИС. 4.8 для Н-олигосахаридов, модификация **остатков, содержащих много маннозы** и присоединенных к ЭПР, происходит ступенчатым образом и приводит к постепенному превращению «незрелых» олигосахаридов, содержащих много маннозы, в сложные, богатые сиаловыми кислотами структуры. Считается, что ферменты, ответственные за эти этапы, расположены друг за другом вдоль стопки цистерн. Ферменты, принимающие участие на ранних этапах этого процесса, вероятно, находятся на входящей стороне аппарата Гольджи, которая первая получает белки, экспортированные из ЭПР. Ферменты, которые действуют позже (например, осуществляющие добавление остатков сиаловых кислот), обнаруживаются на стороне выхода, откуда секретиремые белки покидают аппарат Гольджи.

Стопки Гольджи с каждой стороны ограничены ретикулотубулярной сетью. **Цис-Гольджи сеть (CGN)**,



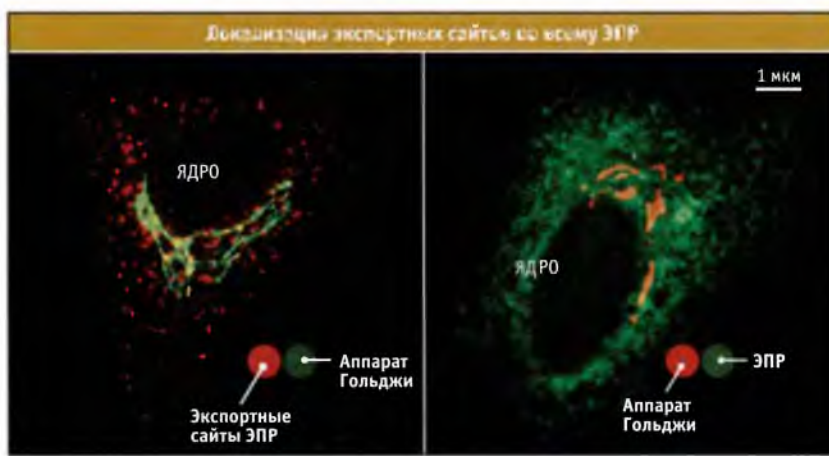
Этапы образования N-олигосахаридов; везикулярный транспорт гликопротеинов между компартментами не показан

расположенная с входной стороны аппарата Гольджи, получает белки, выходящие из экспортных сайтов ЭПР. Она осуществляет функции контроля качества и возвращает на место резидентные белки, которые вышли из ЭПР (см. 4.7 Резидентные белки, выходящие из ЭПР, возвращаются обратно). **Транс-Гольджи сеть (TGN)**, со стороны выхода, распределяет белки по разным направлениям. В ацинарных клетках поджелудочной железы большинство белков в TGN представляют собой секреторные белки конденсирующихся вакуолей, которые созревают в зимогеновые гранулы. Также в TGN лизосомальные белки отделяются от белков плазматической мембраны и постоянно секретируемых белков. Первые транспортируются в лизосомы (по эндосомальному пути), а вторые направляются к клеточной поверхности. В клетках, не осуществляющих функцию регулируемой секреции, образуются только лизосомальные белки и белки плазматической мембраны.

Хотя для аппарата Гольджи характерна *цис-, транс-*полярность, отражающая направление транспорта, в ЭПР она отсутствует. Вновь синтезированные секреторные

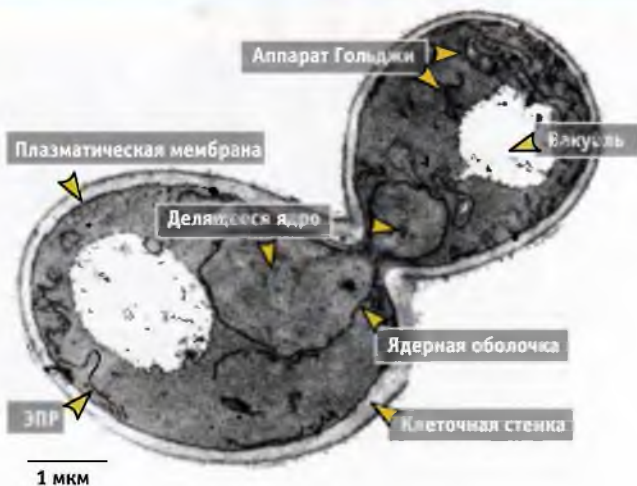
белки направляются к экспортным сайтам ЭПР, т. е. к регионам, в которых происходит образование транспортных везикул. В клетках млекопитающих эти экспортные сайты локализованы по всему ГРЭПР и не всегда связаны с аппаратом Гольджи. В клетках, в которых регулируемая секреция отсутствует, экспортные сайты ЭПР часто расположены на значительном расстоянии от аппарата Гольджи. Как показано на рис. 4.3, сеть ЭПР распространена по всей цитоплазме, и в ней случайным образом располагаются порядка сотни экспортных сайтов. Напротив, аппарат Гольджи обычно расположен поблизости от ядра. Поэтому некоторые везикулы, переносящие секреторные белки от ЭПР, прежде чем достигнуть аппарата Гольджи, должны преодолеть расстояние в несколько микрон.

Так же как ацинарные клетки поджелудочной железы являются идеальным объектом для исследования роли секретируемых белков методами микроскопии и биохимического фракционирования, и почкующиеся дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* оказались подходящей генетической системой для изучения молекулярных ме-



Локализация белков в эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и в экспортных сайтах ЭПР по данным иммунофлуоресцентной микроскопии. Показаны две разных клетки. Фотография любезно представлена Лоуренсом Пеллетье, Йельский университет

Морфология мембран дрожжевой клетки



Фотография в трансмиссионном электронном микроскопе, показывающая почкующуюся дрожжевую клетку. Фотография любезно предоставлена Френсисом Барром, МПИ, Мюнхен

ханизмов перемещения белков. Как следует из , почкующиеся дрожжи обладают набором органелл, необходимых для экзоцитоза и по функциям, напоминающим соответствующие структуры клеток млекопитающих. Однако по организации они несколько отличаются. В клетках дрожжей ЭПР выглядит менее плотным и в основном локализован непосредственно у плазматической мембраны и вокруг ядра, ЭПР не содержит явных экспортных сайтов, и транспортные везикулы, вероятно, образуются из любых мест мембраны ЭПР. Аппарат Гольджи не формирует стопок цистерн и не сосредоточен у ядра. У дрожжей отсутствуют секреторные гранулы, и для них нехарактерен регулируемый экзоцитоз. Несмотря на эти различия, основной транспортный механизм у дрожжей гомологичен соответствующему механизму в клетках животных и является достаточно консервативным в клетках эукариот.

4.3 Обзор путей эндоцитоза

Основные положения

- Для захвата материала из окружающей среды клетка использует несколько различных механизмов
- В последующих превращениях захваченного материала важную роль играют ферменты деградации и низкое значение pH в эндосомах и лизосомах

Эндоцитоз — процесс, при котором эукариотическая клетка захватывает материал из окружающей среды при образовании везикул на плазматической мембране. Во многом являясь противоположностью экзоцитоза, эндоцитоз обладает несколькими функциями:

- поглощение питательных веществ;
- регуляция экспрессии белков на клеточной поверхности, например рецепторов гормонов и перенос-

чиков глюкозы, что дает возможность клетке контролировать процесс захвата лигандов;

- захват и деградация внеклеточного дебриса;
- восстановление мембраны, встроенной в плазматическую мембрану при секреции.

Наряду с этим, процесс эндоцитоза используется для проникновения в клетку патогенными организмами, такими как бактерии, простейшие и вирусы.

При эндоцитозе образующиеся на плазматической мембране везикулы сливаются с органеллами (рис. 4.18). Эти органеллы обладают двумя важными особенностями: в люмене у них поддерживается кислая среда, и находятся протеолитические ферменты, оптимальная активность которых проявляется при кислых значениях pH. Органеллы характеризуются различной степенью кислотности среды и различным содержанием ферментов деградации. Они подразделяются на **ранние и поздние эндосомы** и **лизосомы**, которые обладают широким спектром протеолитической активности соответственно от минимального в эндосомах до максимального в лизосомах. В лизосомах находятся ферменты деградации, активные по отношению практически ко всем биополимерам (белкам, липидам, углеводам, РНК, ДНК), попадающим в них путем эндоцитоза. Хотя в течение долгого времени лизосомы рассматривались как терминальные органеллы на пути эндоцитоза, существуют данные о том, что они иногда могут сливаться с плазматической мембраной.

Протонный насос, функционирующий за счет энергии АТФ, называется вакуолярной АТФазой (v-АТФаза) и переносит ионы H^+ из цитозоля в люмен определенных

органелл. При этом pH внутри органелл, по сравнению с цитозолем, уменьшается. Значение pH цитозоля составляет 7,4. Внутри ранних эндосом поддерживается слегка кислое значение pH (6,5–6,8), а в поздних эндосомах и в лизосомах значение pH достигает 4,5. Величина pH в различных эндосомальных компартментах регулируется разными факторами, такими как содержание и активность v-АТФазы, а также ионной проводимостью и свойствами других транспортных АТФаз, присутствующих в мембранах различных эндосом. Важно отметить, что pH в каждом компартменте зависит от выполняемой им функции (подробнее см. 4.15 *Некоторые рецепторы рециклируют из ранних эндосом, в то время как другие разрушаются в лизосомах*). (Подробнее о v-АТФазах см. 2.21 *H^+ -АТФазы переносят протоны из цитозоля*.)

Исторически сложилось так, что эндоцитоз стали подразделять на **фагоцитоз** («поедание клеткой») и **пиноцитоз** («впитывание клеткой»), что отражает объем попадающего в клетку материала (рис. 4.19). Специализированный фагоцит, например макрофаг, может заключать материал в везикулу, диаметром до 10 мкм. Сходство с процессом поглощения пищи подчеркивается также сильно кислой внутренней средой фагосом, оптимальной для активности ферментов, расщепляющих поглощенные белки, липиды и углеводы.

Почти все клетки обладают способностью к фагоцитозу, однако этот процесс наиболее характерен для специализированных клеток иммунной системы, таких как макрофаги и дендритные клетки, поглощающих патогенные микроорганизмы и помогающих формировать



Среди органелл, участвующих в эндоцитозе, существует градиент pH и активности ферментов деградации. При эндоцитозе макромолекулы или рециклируют в плазматическую мембрану, или разрушаются

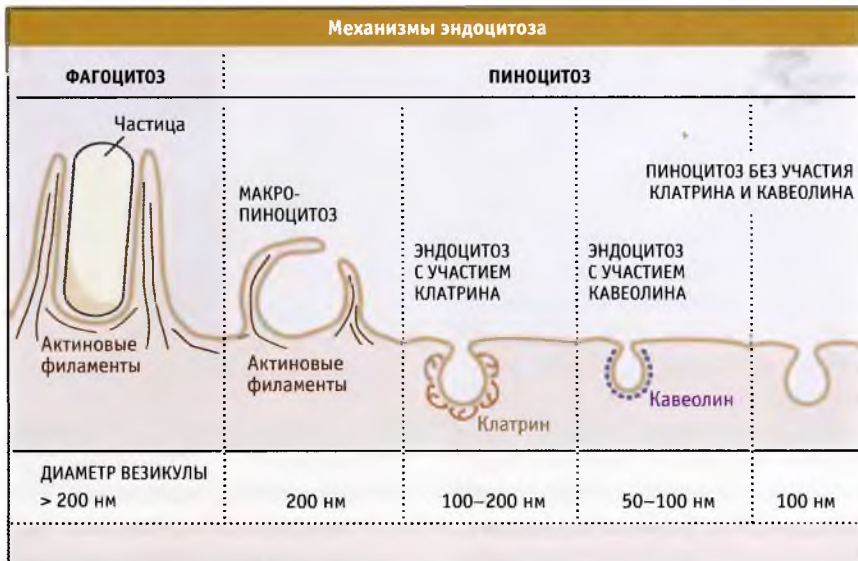
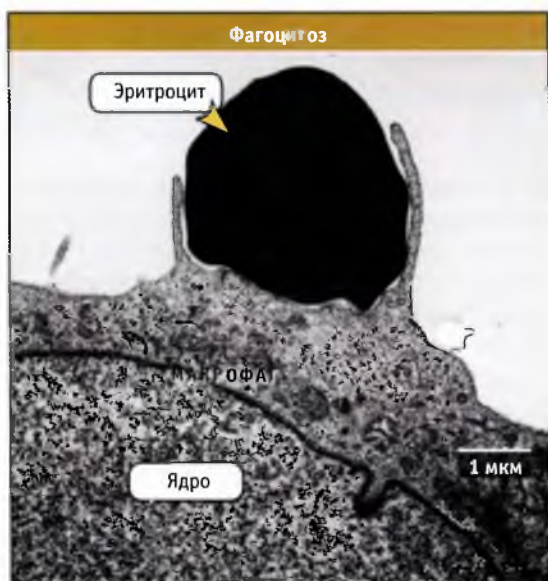


Рис. 4.11 Существует несколько механизмов эндоцитоза. По Conner, S. D. and Schmid, S. L. *Nature*. 2003. 422: 34–44

ся защитной реакции у организма хозяина. Макрофаги также участвуют в очистке организма от стареющих или апоптотических клеток путем фагоцитоза, происходящего даже в отсутствие инфекции (рис. 4.13). Поскольку настоящие фагоциты обладают специфическими рецепторами, запускающими фагоцитоз, они более эффективны в захвате частиц по сравнению с другими клетками. Например, макрофаги и некоторые другие фагоцитирующие клетки экспрессируют рецепторы для молекул антител.



4.13. Электронная микрофотография макрофага, поглощающего эритроцит. Фотография любезно предоставлена Джоном М. Робинсоном, Университет Огайо

Пиноцитоз представляет собой общий термин, включающий несколько механизмов захвата. Обычно при этом образуется небольшая эндоцитозная везикула, достигающая 0,1–0,3 мкм в диаметре. Наиболее полно изученной разновидностью пиноцитоза является **эндоцитоз, опосредуемый рецепторами**. В ранних исследованиях по захвату липопротеинов низкой плотности (ЛНП) соответствующими рецепторами было получено много концептуальных сведений, способствующих нашему пониманию механизмов эндоцитоза (см. EXP:4-0001). Большое количество рецепторов, расположенных на поверхности клеток, связывает лиганды, к числу которых относятся питательные вещества, ростовые факторы, гормоны, антитела или антигены. Комплексы «рецептор-лиганд» поглощаются, накапливаясь в специфических областях плазматической мембраны, которые называются «окаймленные ямки» (подробнее см. 4.13 Обычно в эндоцитозе участвуют клатриновые везикулы). Окаймленные ямки отпочковываются, образуя везикулы, которые сливаются с ранними эндосомами. В кислой среде внутри эндосом связь некоторых лигандов с рецепторами разрывается, причем рецепторы направляются назад, на поверхность клетки, а лиганды — в поздние эндосомы и потом в лизосомы. Некоторые комплексы рецептора и лиганда в ранних эндосомах не диссоциируют, а вместо этого, так же как свободные лиганды, направляются в лизосомы (см. 4.15 Некоторые рецепторы рециклизуют из ранних эндосом, в то время как другие разрушаются в лизосомах).

Существует несколько вариантов основного пути эндоцитоза. Некоторые клетки содержат лизосомы, в которых происходит лишь частичная деградация поглощенного материала, что существенно для выработки иммунного ответа на захваченные патогены. Хорошим



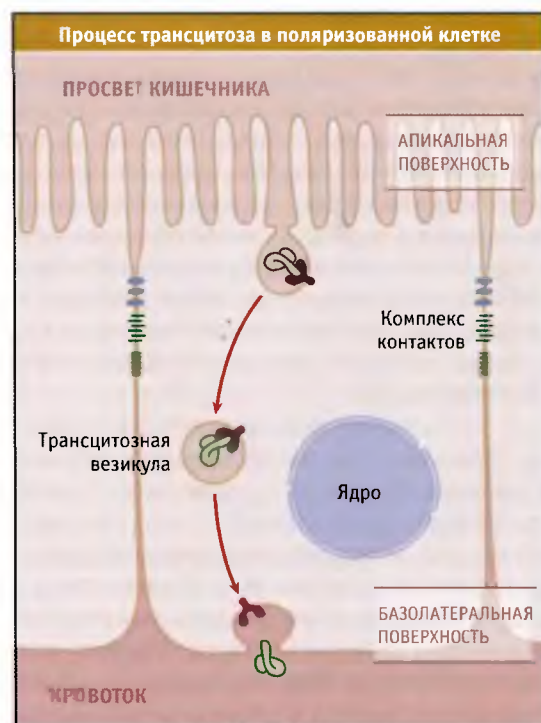
В клетках иммунной системы специализированные лизосомы разрушают захваченные белковые антигены, образуя пептиды, которые связываются с молекулами МНС класса II. Комплексы пептид-МНС класса II транспортируются в плазматическую мембрану для представления антигена эффекторным клеткам

примером являются дендритные клетки, представляющие собой клетки лейкоцитарного происхождения, присутствующие в крови и во всех тканях организма. Они инициируют почти все иммунные реакции, что обусловлено их уникальной способностью стимулировать В- и Т-лимфоциты, узнающие и уничтожающие патогены. Дендритные клетки захватывают циркулирующие антигены или патогенные микроорганизмы и доставляют их в специальный компартмент лизосом. Эти лизосомы не обладают способностью к полному перевариванию белков, что благоприятствует образованию коротких пептидов (10–15 остатков аминокислот), связывающихся с белками главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС). Еще одна особенность этих лизосом позволяет комплексам пептидов и МНС класса II выходить из них за счет образования длинных трубочек, по которым содержимое транспортируется к плазматической мембране (рис. 4.15). Затем комплексы пептида и МНС класса II выходят на поверхность мембраны, где они стимулируют эффекторные клетки.

Еще один вариант эндоцитоза предполагает, что поглощенный клеткой материал полностью минует лизосомный путь. Этот процесс носит название **транцитоз**, он характерен для специализированных эпителиальных клеток, выстилающих полости тела, например внутреннюю поверхность кишечника. Функция эпителиальных клеток состоит в регуляции транспорта материалов между организмом и окружающей средой. Эти клетки тесно примыкают друг к другу и образуют непрерывный слой. Они полярны, причем «**апикальная**» поверхность обращена в сторону люмена кишки, а «**базальная**» — в противоположную сторону, к крови. Обычно транцитоз начинается с образования покрытой клатрином везикулы на апикальной или базолатеральной мембране. Эта везикула сливается с ранней эндосомой, что приводит к образованию транцитозной везикулы, принадлежащей к типу рециклирующих везикул. Транцитозная везику-

ла переносится на противоположную поверхность клетки и сливается с мембраной.

При всасывании в кишечнике питательных веществ некоторые транспортные везикулы, которые образуются при эндоцитозе на апикальной поверхности, продвигаются прямо на базальную сторону и таким образом доставляют интернализированные компоненты без риска их разрушения в лизосомах (рис. 4.15). Еще



4.15 В полярной клетке процесс транцитоза протекает таким образом, что материал, транспортируемый по механизму эндоцитоза из одного мембранного домена, проходит через клетку и путем экзоцитоза выходит через другой мембранный домен

Основные положения

- Транспортные везикулы перемещают белки и другие макромолекулы из одного ограниченного мембраной компартмента в другой, по механизму экзоцитоза и эндоцитоза
- Окаймление из цитоплазматических белковых комплексов помогает образовываться транспортным везикулам и отбирать белки, которые должны быть перенесены
- Белки, предназначенные для транспорта в какой-либо компартмент, отсортировываются от резидентных белков и белков, предназначенных для транспорта в другие компартменты
- Транспортные везикулы используют фиксаторы и SNARE для причаливания и слияния с очередными компартментами на пути транспорта
- Антероградный (прямой) транспорт везикул компенсируется их ретроградным (обратным) транспортом. Транспортируемые везикулы при ретроградном транспорте содержат рециклируемые и сохранившиеся интактными белки

одним примером трансцитоза является перенос факторов гуморального иммунитета от матери к новорожденному. Иммуноглобулины, присутствующие в материнском молоке, в кишечнике ребенка захватываются апикальными рецепторами, которые транспортируют их на другую сторону эпителия и доставляют в плазму крови.

Наряду с переносом через окаймленные ямки, на плазматической мембране образуются другие типы эндоцитозных везикул (см. рис. 4.12). Кавеолы представляют собой небольшие инвагинации в поверхности мембран, покрытые кавеолином. По-видимому, в кавеолах накапливаются некоторые рецепторы и мембранные липиды, которые не переносятся через окаймленные ямки. Эти рецепторы и липиды попадают в клетку, когда кавеола отпочковывается, образуя везикулу. Плазматическая мембрана также образует более крупные гетерогенные структуры, которые называются макропиносомы. Обычно они образуются в ответ на действие факторов роста и представляют собой большие вакуоли, похожие по размеру на фагосомы. В них могут содержаться крупные капли внеклеточной жидкости. Материал, попавший в клетку с помощью кавеол и макропиносом, достигает тех же эндосом и лизосом, так же как и материал, поглощенный через окаймленные ямки. В некоторых случаях содержимое кавеол может храниться в специальной эндосоме, которая называется кавеосомой. Наконец, некоторые метаболиты попадают в клетку вместе с мелкими пиноцитозными везикулами, которые образуются в отсутствие известных типов оболочек (окаймления).

Интересно, что некоторые вирусы животных используют кислые значения pH, характерные для эндоцитоза, для проникновения в цитоплазму клетки, где они проходят цикл репликации. Так, вирусы везикулярного стоматита и леса Семлики проникают в клетку через кислое окружение люмена эндосом; при этом активируются гликопротеины «шипов» на поверхности вирусной частицы и запускается процесс слияния мембран вируса и эндосомы. При этом происходит попадание в цитоплазму клетки вирусного генома и начинается распространение инфекции.

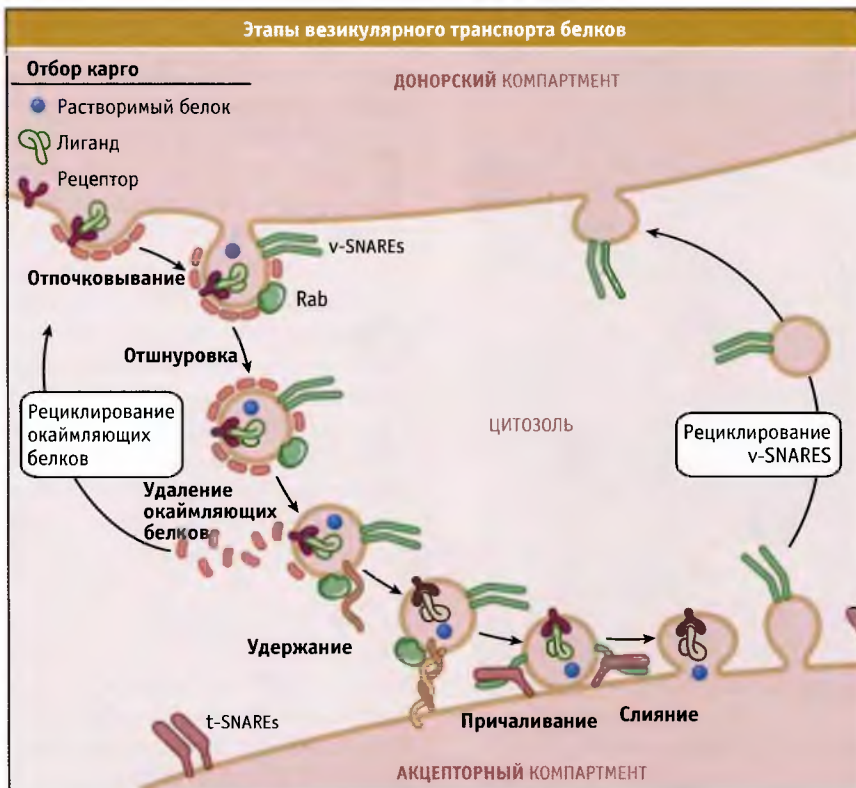
В клетках почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* происходит пиноцитоз, но не фагоцитоз. Это не вызывает удивления, поскольку дрожжевая клетка обладает толстой клеточной стенкой. У этих клеток плохо различимы органеллы, принимающие участие в эндоцитозе, поскольку их очень мало. Однако вакуоли, которые представляют собой аналоги лизосом, хорошо видны в электронном микроскопе (см. рис. 4.10). До недавних пор генетические исследования эндоцитоза на дрожжах отставали от исследований экзоцитоза, и лишь в последнее время они стали особенно важны для понимания роли убиквитинирования белков в процессе их деградации (подробнее см. 4.16 При созревании ранние эндосомы превращаются в поздние эндосомы и лизосомы).

Мы уже отмечали выше, что клетки эукариот содержат множество компартментов, ограниченных мембранами, каждый из которых характеризуется своим составом и функциями. Эти компартменты часто обмениваются компонентами, особенно при эндоцитозе и экзоцитозе. Поскольку обычно белки и липиды свободно диффундируют вдоль липидного бислоя, любое прямое физическое взаимодействие между разнородными мембранными системами создает хаотичность. Мы выдвинули представление, согласно которому обмен компонентами происходит при участии транспортных везикул (см. рис. 4.3), и для поддержания постоянства состава компартмента везикулы должны содержать только отобранные компоненты. В этом разделе мы представим механизм везикулярного транспорта.

Везикулярный транспорт может быть представлен в виде последовательности нескольких процессов (рис. 4.13). Эти процессы включают выбор груза (карго), образование везикулы и ее отпочковывание, удаление (окаймления) белкового покрытия, удержание везикулы и ее причаливание (прикрепление), слияние и рециклизацию белков слияния.

Вначале транспортируемые белки должны быть отобраны. На цитоплазматическом конце молекул мембранных белков, например рецепторов, находятся различные сигналы сортировки. Растворимые белки или отбираются соответствующим рецептором, или неизбежно диффундируют в образующуюся везикулу (см. 4.5 Представления о сигнальном транспорте и о неизбежном потоке белков). Процедуру отбора проходят также белки, используемые на поздних стадиях транспорта. Некоторые резидентные белки, включая мембранные и растворимые, обладают специфическими последовательностями, определяющими их местонахождение в конкретном компартменте. Эти последовательности исключают возможность отбора белков или их заключения в образующуюся транспортную везикулу.

Выбор карго происходит при связывании с сигналами сортировки особых цитоплазматических белков, на-



16. Процесс везикулярного транспорта состоит из нескольких этапов, обеспечивающих селективное включение белков карго в транспортные везикулы и их селективное слияние с мембраной-мишенью

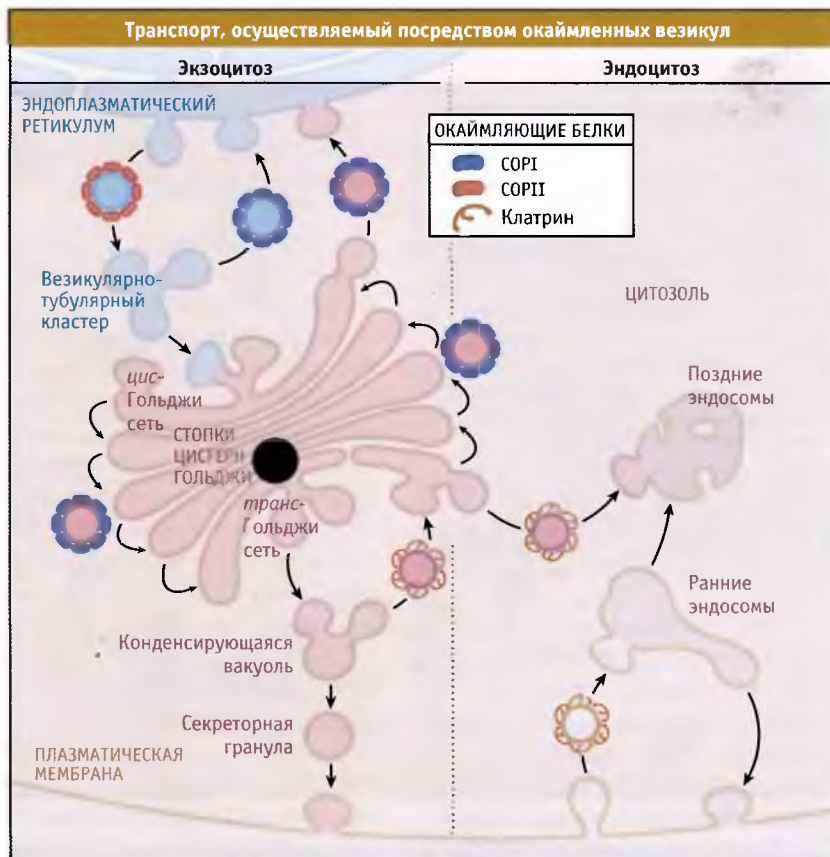
ываемых **белки окаймления**. Эти белки связываются с сигналами сортировки непосредственно или через адаптерный комплекс, который связывает белок карго с комплексом окаймляющего белка. Последний определяет тип транспортной везикулы. В различных механизмах транспорта участвуют различные белки. Например, белки COP I и COP II принимают участие в экзоцитозе, а клатриновые везикулы представляют собой единственный тип везикул, участвующих в эндоцитозе (рис. 4.16). Состав везикул, которые обеспечивают транспорт между компартментами, отражает лежащий в его основе принцип селективного переноса. Отличаются друг от друга не только карго белки, но также система их отбора, отпочковывания везикулы, ее причаливания и слияния. Все это определяется донорским и акцепторным компартментами (подробнее см. 4.6 *COP II-окаймленные везикулы участвуют в транспорте из ЭПР в аппарат Гольджи*, 4.8 *COP I-окаймленные везикулы участвуют в ретроградном транспорте белков из аппарата Гольджи в ЭПР*, и 4.13 *Обычно в эндоцитозе участвуют клатриновые везикулы*).

Для образования везикулы мембрана органеллы должна образовать выпячивание наподобие почки (рис. 4.16). В этом процессе принимают участие окаймляющий и адаптерный комплексы, вероятно, связываясь с фосфолипидами, содержащими фосфоинозитол. После образования почки белки «отшнуровки» высвобождают окаймленную белком везикулу, содержащую поглощен-

ный материал. Процесс отшнуровки везикулы требует замыкания мембраны, в результате которого везикула отделяется от донорского компартмента. Механизмы, вызывающие выпячивание мембраны и отшнуровку везикулы, остаются неизвестными. По сравнению с другими типами везикул, процессы образования и отшнуровки клатриновых везикул исследованы гораздо лучше.

После образования везикулы белки окаймления удаляются (процесс называется «раздеванием») и используются в повторных циклах отпочковывания новых везикул. Освобождение везикулы от окаймляющего белка, по-видимому, необходимо для ее взаимодействия с мембраной реципиентного компартмента.

Присоединение везикулы к реципиентному компартменту происходит в два этапа: первый этап называется удержание, второй — причаливание (прикрепление). Предполагается, что удержание дает возможность везикуле протестировать мембрану, для того чтобы определить, является ли она правильной мишенью. При причаливании мембраны вступают в тесный контакт, обеспечивающий их слияние. В удержании везикулы участвуют небольшие ГТФазы семейства Rab и специальные удерживающие белки, образующие белковые комплексы. Эти комплексы специфичны для каждой пары: транспортная везикула—органелла назначения и таким образом, играют вспомогательную роль в обеспечении адресной доставки материалов (подробнее см. 4.11 *Rab-ГТФазы*



Три основных типа покрытий, характерных для процесса везикулярного транспорта, представляют собой COPI, COPII и клатриновое окаймление

и удерживающие белки представляют собой два типа белков, регулирующих адресование везикул).

При удержании белки SNARE, находящиеся на везикуле, образуют комплекс с белками поверхности реципиентной органеллы. Этот комплекс «прикрепляет» везикулу и играет существенную роль в слиянии, которое необходимо для того, чтобы везикула полностью выполнила свою задачу по доставке мембранных компонентов и растворимых молекул к месту назначения. Только при слиянии мембран содержимое двух компартментов может войти в контакт. Многочисленные события слияния мембран, происходящие при экзоцитозе и эндоцитозе, определяются различными комбинациями белков SNARE. В дальнейшем АТФаза NSF и связывающий белок SNAP разрушают комплексы SNARE, которые образовались при слиянии мембран. Затем из донорской мембраны SNARE поступают в отпочковывающиеся транспортные везикулы и опять возвращаются в донорскую мембрану. (Подробнее см. 4.12 Белки SNARE, вероятно, участвуют в слиянии везикул с мембранами-мишенями.)

Исследования молекулярных механизмов везикулярного транспорта во многом способствовали выработке новых взглядов по всем аспектам мембранного транспорта. Использование методов реконструкции процессов транспорта или слияния органелл позволило идентифицировать и выделить индивидуальные белки (напри-

мер, SNARE, NSF, SNAP). (Подробнее см. EXP:4-0002 и EXP:4-0003.) Выделение мутантов дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), дефектных по процессу секреции белка, подтвердило физиологическую значимость этих белков и позволило открыть многие другие белки. В результате проведения исследований по сайт-специфическому мутагенезу и поиску по базам данных были выяснены сигналы сортировки, которые направляют белки в специфические транспортные везикулы.

4.5 Представления о сигнальном транспорте и о неизбирательном потоке белков

Основные положения

- Для растворимых секреторных белков, особенно секретирующихся в больших количествах, не всегда нужны специфические сигналы экзоцитоза
- Необходимость сигналов сортировки может ограничиваться мембранными белками и рецепторами, особенно теми, которые направляются к некоторым органеллам, например в лизосомы
- Некоторые растворимые белки несут сигналы, позволяющие взаимодействовать с рецепторами, которые участвуют в транспорте этих белков в лизосомы

Существуют два представления о путях транспорта белков по механизму эндоцитоза и экзоцитоза. Это сигнальный транспорт и неизбирательный поток (рис. 4.18). При сигнальном транспорте каждый белок-карго содержит одну или несколько коротких последовательностей, определяющих его местоположение на пути транспортировки. Наличие или отсутствие этих «последовательностей сортировки» (также называемых сигналами сортировки) определяет, остается ли белок в составе данной органеллы в качестве резидентного компонента, или транспортируется в везикуле в следующую органеллу, в которой он может остаться или следовать дальше по назначению. Если на каждом этапе требуется особый сигнал, то каждый белок должен содержать несколько последовательностей соответственно числу транспортных этапов, которые он должен преодолеть, чтобы дойти до пункта назначения (например, до плазматической мембраны при экзоцитозе или до лизосомы при эндоцитозе).

Для растворимых белков, находящихся в люмене везикулы и в компартментах, проблема транспорта стоит более остро, чем для мембранных белков. С точки зрения топологии растворимые белки находятся «вне клетки». Для того чтобы их транспорт полностью определялся сигналом, они должны связываться с мембранными рецепторами, которые, в свою очередь, связаны с компонентами окаймления, участвующими в селективном накоплении карго в везикулах. Если каждому классу растворимых белков на определенном этапе транспорта необходим свой рецептор, то в каждый момент времени для транспорта белков потребовались бы десятки и сотни рецепторов.

Второе представление является альтернативой первому и упрощает проблему. Модель неизбирательного потока определяет «пути по умолчанию» как не требующие существования у белков сигналов сортировки для транспорта между компартментами. Экзоцитоз и эндоцитоз должны рассматриваться как пути по умолчанию. Например, для поступления в везикулы при экзоцитозе секретиромые белки или белки плазматической мембраны не нуждаются в сигнале сортировки. Эти белки должны присутствовать в отпочковывающихся от ЭПР везикулах в той же концентрации, что и в люмене ЭПР. Механизм неизбирательного потока не включает сигнала сортировки, который используется для концентрации белка в формирующейся везикуле. Сигнал требуется только в том случае, когда необходимо приостановить движение белка по пути экзоцитоза (например, при его удержании в аппарате Гольджи) или перевести его на другой путь (например, на путь транспорта в лизосомы).

Модель неизбирательного потока объясняет, каким образом бактериальный белок β -лактамаза, введенный в ооцит *Xenopus*, транспортируется из ЭПР на поверхность клетки. У бактерий отсутствуют внутренние мембраны, подобные тем, которые находятся в клетках эукариот. Поэтому бактериальные белки, по-видимому, не имеют сигнала экспорта из ЭПР. Неизбирательным потоком также объясняется высокая скорость экспорта

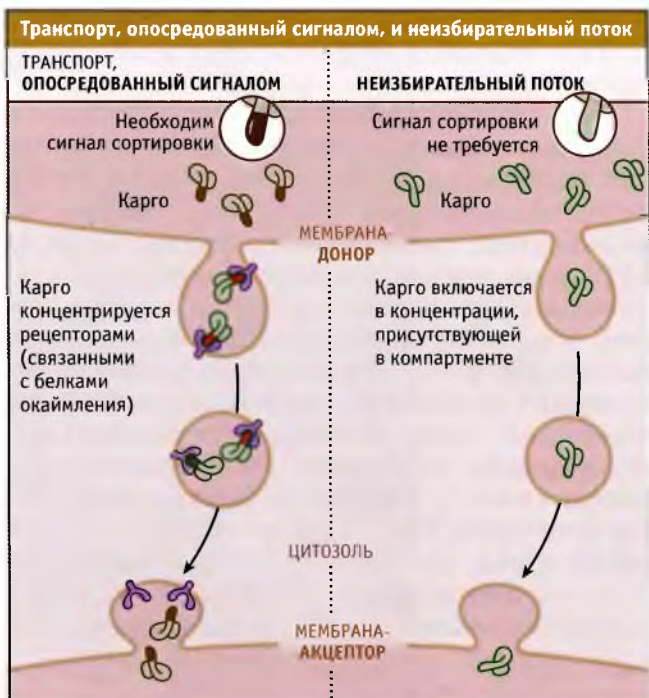


РИС. 4.18. Молекулы карго или концентрируются в везикулах с участием рецепторов, которые связываются с сигналом сортировки на карго (транспорт, опосредованный сигналом), или включаются в везикулы в той концентрации, в которой они находятся в компартменте или мембране (неизбирательный поток)

белков из специализированных секреторных клеток, таких как ацинарные клетки поджелудочной железы. Скорость секреции и многообразие секретируемых белков должны были бы превышать возможности клетки обеспечить рецептором каждый белок на каждом этапе транспорта.

Транспорт белков происходит по механизму как сигнального транспорта, так и неизбирательного потока. Механизм неизбирательного потока впервые был предложен для описания экзоцитоза. Для многих белков, выходящих из ЭПР к клеточной поверхности через аппарат Гольджи, сигналы, по-видимому, не нужны. Однако существуют данные, что некоторые мембранные и секреторные белки, выходящие из ЭПР, несут сигналы экспорта или используют дополнительные белки, которые допускают их селективный выход (подробнее см. 4.6 *СОPII-окаймленные везикулы участвуют в транспорте из ЭПР в аппарат Гольджи*).

Данные, имеющиеся в отношении белков, которые транспортируются по пути эндоцитоза, позволяют предполагать, что для некоторых этапов этого процесса основным механизмом является сигнальный транспорт. Например, сигналы сортировки, расположенные на цитоплазматическом участке мембранных белков, обеспечивают их интернализацию в плазматическую мембрану (подробнее см. 4.13 *Обычно в эндоцитозе участвуют клатриновые везикулы*). Однако интернализованные растворимые макромолекулы транспортируются из

эндосомы в лизосомы, не связываясь с рецепторами (см. 4.16 При созревании ранние эндосомы превращаются в поздние эндосомы и лизосомы).

Если концентрация молекул небольшая, то сигналы увеличивают эффективность интернализации. Небольшие молекулы, добавленные к среде, окружающей нефагоцитирующие клетки в культуре, интернализуются в жидкую фазу (т. е. не связанную с рецепторами) менее эффективно, чем при связывании с мембранными рецепторами. Связывание сигналов поглощения с рецепторами существенно увеличивает эффективность захвата белков (в 1000 раз) за счет концентрирования молекул в везикулах. Однако при высокой концентрации молекул значительные количества белков интернализуются даже без связывания с рецепторами. Эти соображения также относятся к экспорту белков из ЭПР. Неселективный поток растворимых белков тоже достигает значительной величины, когда транспортные везикулы обладают большим диаметром, например при макропиноцитозе, происходящем с участием плазматической мембраны.

4.6 СОРІІ-окаймленные везикулы участвуют в транспорте из ЭПР в аппарат Гольджи

Основные положения

- СОРІІ везикулы представляют собой единственный тип транспортных везикул, которые происходят из эндоплазматического ретикулума
- Для сборки СОРІІ окаймляющих белков на экспортных сайтах в эндоплазматическом ретикулуме необходима ГТФаза и структурные белки
- Сигналы для экспорта мембранных белков эндоплазматического ретикулума обычно находятся в их цитоплазматическом участке
- После отшнуровывания СОРІІ везикулы образуют кластеры, сливаются и мигрируют по микротрубочкам в цис-участок аппарата Гольджи

В ЭПР происходит синтез и структурирование секреторных и других белков, предназначенных для различных компартментов экзо- и эндоцитоза. Белок выходит из ЭПР после того, как сформировалась его нативная структура, а в случае белковых комплексов, состоящих из субъединиц, только после их окончательной сборки (см. 3 Мембранное адресование белков). Белки, предназначенные на экспорт, собираются на сайтах ЭПР, в которых образуются везикулы, транспортирующие вновь синтезированные белки в аппарат Гольджи (см. рис. 4.9). (В секреторных клетках экспортные сайты ЭПР определяются как сайты, в которых происходит интенсивный процесс отшнуровывания везикул, которые называются «переходные элементы».)

Транспортные везикулы называются везикулы СОРІІ (англ. *coat protein* — белок окаймления, СОР). Они представляют собой единственный путь везикулярного экспорта материалов из ЭПР. Компоненты СОРІІ

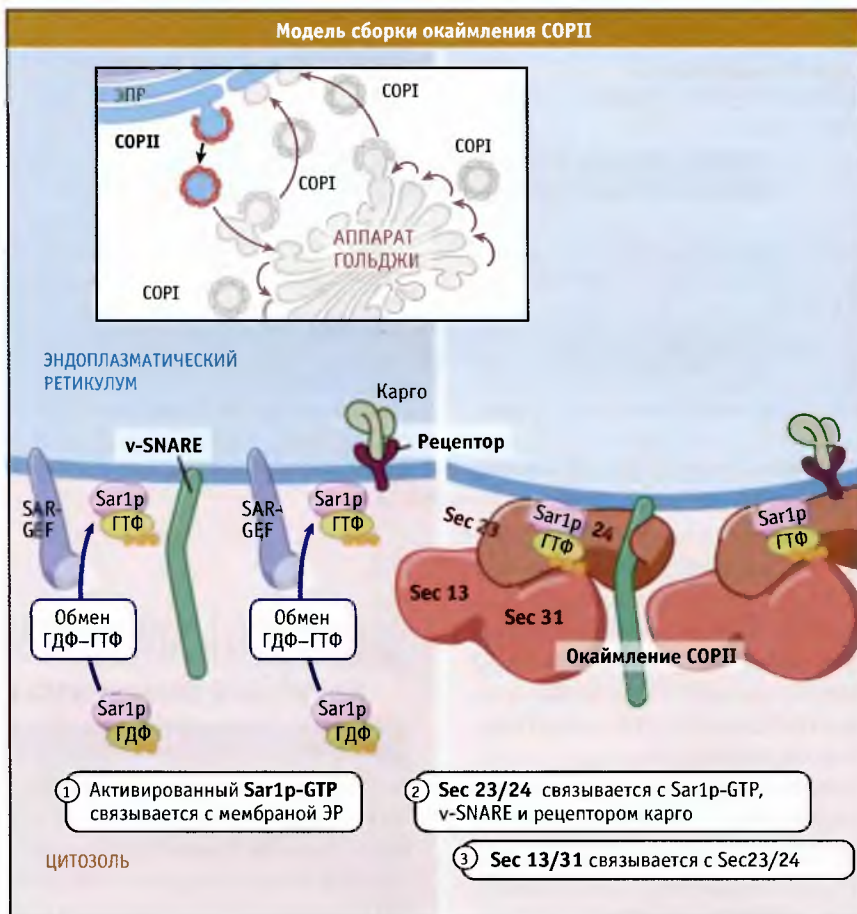
способствуют выпячиванию мембраны, необходимому для образования везикулы, и могут взаимодействовать специфически с некоторыми трансмембранными карго-белками для их отбора на экспорт. Основные закономерности образования везикул СОРІІ такие же, как и для других окаймленных везикул (см. 4.4 Представления о везикулярном транспорте белков).

Процесс образования везикулы СОРІІ представлен на рис. 4.19. Образование везикулы начинается с последовательного отбора растворимых цитозольных компонентов СОРІІ, Sar1p, Sec23/Sec24 и Sec13/31. Sar1p представляет собой небольшую ГТФазу, которая находится в цитозоле в неактивной, связанной с ГДФ форме. Она связывается с мембранами ЭПР, взаимодействуя с фактором обмена гуаниловых нуклеотидов, Sec12p (иначе называемый Sar-GEF), который представляет собой интегральный мембранный белок. Sec12p активирует Sar1p, обменивая ГДФ на ГТФ.

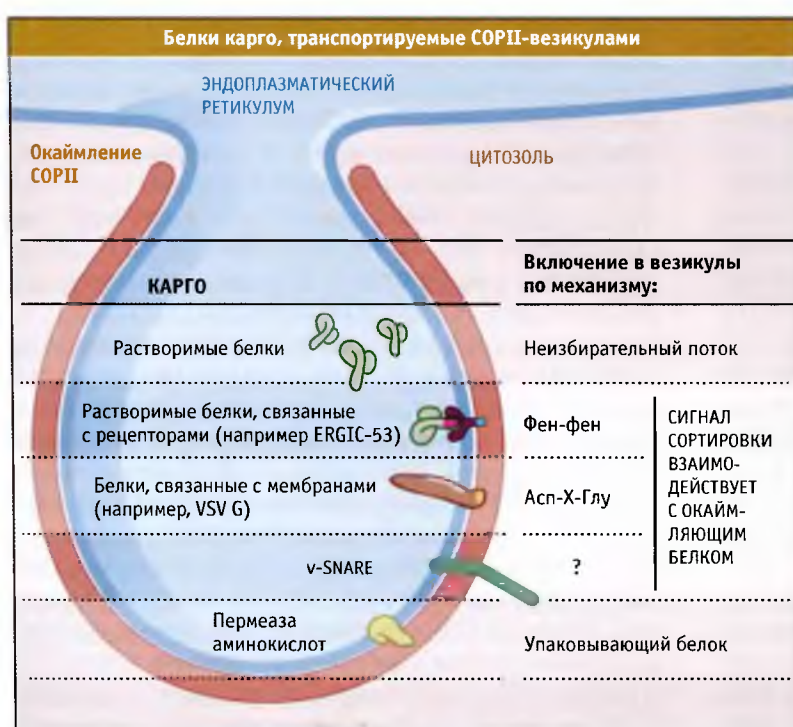
Связывание Sar1p-ГТФ с мембраной активирует два структурных компонента белкового окаймления, гетеродимеры Sec23/Sec24 и Sec13/Sec31. По форме кристаллическая структура комплекса Sar1p-ГТФ-Sec23/24 напоминает галстук-бабочку и хорошо подходит к искривленной поверхности везикулы СОРІІ. Поэтому полимеризацией этих комплексов с Sec13/31 можно объяснить деформацию и отпочковывание везикулы. Sec24 связывается с белком карго, заключенным в везикулу СОРІ. Наличие большого количества молекул карго, способных включиться в везикулу, можно объяснить присутствием множественных перекрывающихся сайтов связывания. Sec23 связывается непосредственно с Sar1p и стимулирует гидролиз связанного ГТФ при образовании везикулы или сразу после этого. Поэтому Sec23 действует как белок, активирующий ГТФазу (GAP), разрывающий везикулу и высвобождающий субъединицы окаймляющих белков для следующих циклов образования новой везикулы.

Большинство белков карго включаются в везикулы СОРІІ либо за счет неизбирательного потока, либо используя сигналы сортировки (рис. 4.20). По механизму неизбирательного потока включается большинство растворимых секреторных белков, которые синтезируются в секреторных клетках в больших количествах (см. 4.5 Представления о сигнальном транспорте и о неизбирательном потоке белков и 4.19 Некоторые клетки запасают белки для последующей секреции).

Сигналы на экспорт белков из ЭПР обычно представляют собой короткие последовательности аминокислот, расположенные в цитоплазматическом участке молекулы мембранных белков (рис. 4.21). Из всех сигналов сортировки белков сигналы экспорта из ЭПР охарактеризованы наименее полно. Одним из примеров является последовательность, состоящая преимущественно из дикарбоновых аминокислот, присутствующая, например, в VSV G белке — гликопротеине оболочки вируса везикулярного стоматита, который широко использовался в исследованиях по биогенезу плазматической мембраны. Наличие экспортного дикарбонового сигнала увеличи-



Модель, описывающая последовательность этапов сборки COPII везикул, с участием белков окаймливания и молекул карго (v-SNARE и рецептор карго)



4.2C. Белки карго включаются в образующиеся COPII-везикулы по разным механизмам



РИС. 4.21. Сигнал экспорта из ЭПР включает последовательности, содержащие остатки дикарбоновых аминокислот или два остатка фенилаланина

вает эффективность экспорта белков из ЭПР, поскольку он связывается с компонентом Sec24 окаймляющего комплекса COPII. Экспорт мутантного VSV G белка, в котором этот сигнал отсутствует, происходит в 2–3 раза медленнее, чем экспорт белка дикого типа.

Другим примером сигнала экспорта из ЭПР служит трансмембранный белок ERGIC-53 (ER, Golgi, белок промежуточного компартмента, с мол. массой 53 кДа). Предполагается, что этот белок переносит растворимые гликопротеины из ЭПР в аппарат Гольджи. Цитоплазматический участок молекулы белка содержит сигнал, представленный двумя остатками фенилаланина, который взаимодействует с компонентом Sec23/24 комплекса COPII. Существование этого сигнала необходимо для того, чтобы ERGIC-53 мог выйти из ЭПР.

Растворимые белки карго также могут использовать сигналы экспорта, однако непосредственно с ними не связываются. Вместо этого они связываются с рецепторами, которые находятся на COPII везикулах (рис. 4.19). Такой сигнал содержат растворимые белки, которые переносятся ERGIC-53 от ЭПР в аппарат Гольджи. Домен ERGIC-53, расположенный со стороны люмена, связывается с этими белками через богатые маннозой олигосахариды, которые находятся в большинстве гликопротеинов, выходящих из ЭПР. Однако, поскольку ERGIC-53 не связывает все гликопротеиды с повышенным содержанием маннозы, сигнал содержит и другие компоненты. У больных с дефицитом белка ERGIC-53 развивается повышенная кровоточивость, связанная с пониженным содержанием факторов свертывания крови V и VIII. Или ERGIC-53 способен лишь к ограниченному транспорту других белков, или иные белки каким-то образом компенсируют его отсутствие.

Еще один пример растворимого белка, который экспортируется из ЭПР под действием сигнала, представляет собой α -фактор — гликопротеин, секретируемый дрожжами *S. cerevisiae* и обеспечивающий их конъюгацию. Недавно идентифицирован белковый рецептор,

пронизывающий мембрану, который концентрирует α -фактор в везикулах COPII.

Другой путь включения белков карго в COPII везикулы состоит в использовании белка упаковки, который сам в везикулу не поступает. Например, в плазматической мембране дрожжей содержится пермеаза аминокислот. Новосинтезированные пермеазы транспортируются по экзоцитозному пути к клеточной поверхности. Включение этих пермеаз в COPII везикулы ЭПР требует присутствия упаковочного белка (Shr3p), хотя механизм его действия неизвестен. Так же как и экспортные сигналы, упаковочные белки, по-видимому, лишь увеличивают эффективность процессов экспорта из ЭПР, хотя сами по себе не являются для них абсолютно необходимыми.

Компоненты транспортного механизма, такие как белки SNARE, которые обеспечивают причаливание и слияние везикул с мембранами, должны также включаться в везикулы (см. 4.12 *Белки SNARE, вероятно, участвуют в слиянии везикул с мембранами-мишенями*). Каким образом SNARE, которые являются интегральными мембранными белками, включаются в везикулы COPII? Два белка из группы SNARE, участвующие в транспортных процессах из ЭПР в аппарат Гольджи (Bet1p и Bos1p), связываются с мембранными формами Sar1p и Sec23/24. Это приводит к активации белка Sec13/31, что свидетельствует о том, что белки SNARE включаются в механизм на стадии образования везикулы. Одно из предположений заключается в том, что при образовании везикулы SNARE играют роль затравки и таким образом гарантируют наличие сигналов адресования во всех образующихся везикулах COPII. Однако данные, подтверждающие это заманчивое предположение, отсутствуют.

После отшнуровывания от ЭПР везикула COPII мигрирует в аппарат Гольджи, где происходит слияние. Везикулы COPII формируют кластеры и, возможно, сливаются друг с другом в экспортных сайтах ЭПР (образование «везикулярно-тубулярных кластеров» (VTC см. рис. 4.17). Когда везикулы COPII образуются

на экспортных сайтах, удаленных от аппарата Гольджи, VTC могут перемещаться до места назначения вдоль микротрубочек. Таким образом, пространственное расположение (близость ЭПР к аппарату Гольджи) и транспорт вдоль микротрубочек сказываются на эффективности, с которой везикулы COPII находят свое окончательное местоположение.

У почкующихся дрожжей ЭПР не обладает отдельными экспортными сайтами, и везикулы COPII могут образовываться в любом месте ЭПР. В отличие от клеток млекопитающих цистерны аппарата Гольджи находятся в цитоплазме, в основном в виде отдельных дисков. Таким образом, в почкующихся дрожжах везикулы COPII могут просто выбирать кратчайшее расстояние между сайтом своего образования в ЭПР и первой ближайшей цистерной.

4.7 Резидентные белки, выходящие из ЭПР, возвращаются обратно

Основные положения

- Присутствующие в большом количестве растворимые белки эндоплазматического ретикула (ЭПР) содержат последовательности (например, такие как KDEL). За счет соответствующих рецепторов эти последовательности обеспечивают им возможность возврата из поздних компартментов
- Резидентные белки мембран и циклирующие белки возвращаются в ЭПР за счет сигнала из диаминомонокислотных кислот, который находится в цитоплазматическом участке молекулы
- Сигнал возвращения в ЭПР для трансмембранных белков типа I представлен двумя остатками лизина, а для белков типа II — двумя остатками аргинина

Содержание белков в люмене ЭПР составляет более 40 мг/мл. Эти белки представлены вновь синтезированными секреторными белками и большим количеством резидентных белков ЭПР, главным образом шаперонами, способствующими приобретению секреторными белками нативной структуры. С учетом большого количества этих белков и вероятности того, что, по крайней мере, часть экспорта из ЭПР происходит за счет неизбирательного потока, клетка постоянно рискует «потерять» из ЭПР белки, необходимые для его функционирования. Действительно, такой экспорт происходит, однако он редко приводит к выходу резидентных белков ЭПР во внеклеточную среду. Это связано с существованием эффективного «механизма возврата», благодаря которому белки, вышедшие из компартмента на путь экзоцитоза, возвращаются в ЭПР.

Наиболее полно изучен механизм возврата, связанный с существованием сигнала сортировки, состоящего из четырех аминокислотных остатков. Этот сигнал расположен на С-терминальном участке большинства растворимых резидентных белков люмена ЭПР. В клетках млекопитающих **сигнал возвращения** представляет собой после-

довательность Лиз-Асп-Глу-Лей (KDEL), которая впервые была обнаружена в шаперонах (см. EXP: 0004). Во всех остальных клетках эукариот обнаружены различные варианты этой сигнальной структуры. У почкующихся дрожжей сигнал возвращения белков в ЭПР представлен последовательностью Гис-Асп-Глу-Лей (HDEL).

Как следует из РИС 4.22, белки узнаются посредством рецептора, который связывается с сигналом возвращения. В клетках млекопитающих рецепторы KDEL сосредоточены, главным образом, в пост-ЭПР компартментах VTC (везикуло-тубулярных кластерах) и CGN (цис-Гольджи-сети), однако небольшое их количество находится в более дистальных компартментах аппарата Гольджи. Связывание рецептора KDEL с соответствующей последовательностью белка приводит к включению этого комплекса в окаймленные везикулы, называемые COPI, посредством которых комплекс возвращается назад, в ЭПР (подробнее см. 4.8 COPI-окаймленные везикулы участвуют в ретроградном транспорте из аппарата Гольджи в ЭПР). Там происходит диссоциация белка от рецептора. Этот процесс, возможно, инициируется повышенной концентрацией ионов кальция в люмене ЭПР, которая оказывается выше, чем в VTC и CGN. *In vitro* диссоциация происходит при изменении pH, однако неизвестно, насколько разные величины pH имеют ЭПР и CGN. Ненагруженные рецепторы KDEL выходят из ЭПР в везикулах COPII, направляясь в VTC и CGN, для следующих циклов возвращения.

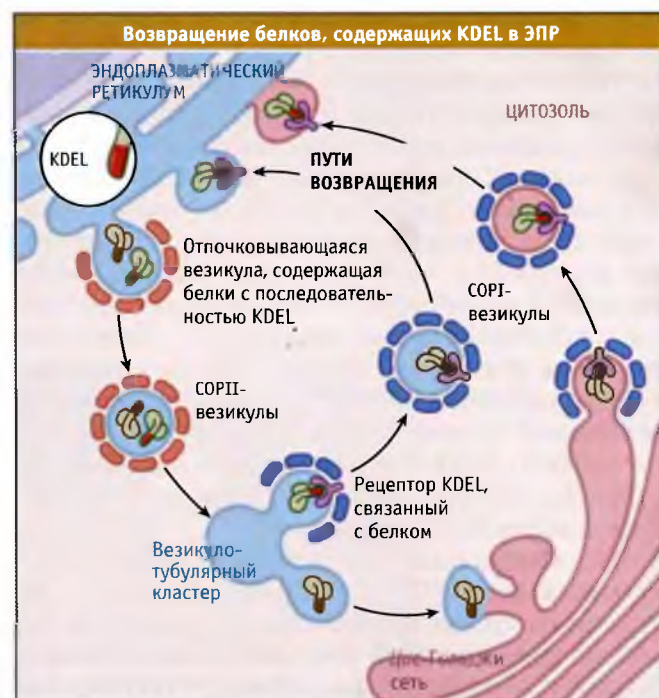


РИС. 4.22. Белки, присутствующие в люмене ЭПР в высокой концентрации, иногда выходят в везикулярно-тубулярные кластеры и в цис-компаратмент Гольджи. В структуре этих белков присутствует KDEL последовательность, узнаваемая KDEL-рецептором, который возвращает их в ЭПР

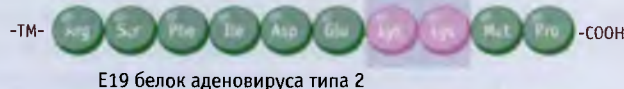
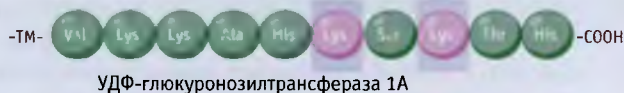
KDEL (лиз-асп-глу-лей)

РАСТВОРИМЫЕ БЕЛКИ



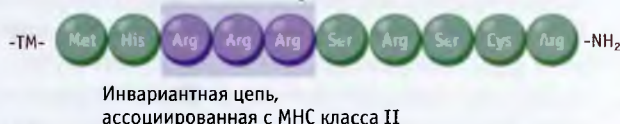
Два остатка лизина (лиз-X-лиз) или (лиз-лиз)

ТРАНСМЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ ТИПА I



Два остатка аргинина (арг-арг) или (арг-X-арг)

ТРАНСМЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ ТИПА II



Возвращение резидентных растворимых и трансмембранных белков в эндоплазматический ретикулум происходит с участием специфических сигналов

Из мембран ЭПР также могут выходить резидентные белки, которые тоже содержат в своей структуре сигналы возвращения. Эти сигналы состоят из последовательности остатков диаминомонокислот. Резидентные трансмембранные белки, относящиеся к типу I (N-терминальный участок которых находится со стороны люмена), содержат сигнал, включающий два лизиновых остатка (Лиз-X-Лиз-X-X, где X — любая аминокислота), расположенный на конце цитоплазматических участков (рис. 4.16). Этот сигнал непосредственно связывается с α -субъединицей белка окаймления COP1 (см. 4.8 *COP1-окаймленные везикулы участвуют в ретроградном транспорте белков из аппарата Гольджи в ЭПР*). Резидентные ЭПР белки, относящиеся к типу II мембранных белков (C-терминальный участок которых находится со стороны люмена), содержат другой сигнал возврата, для которого характерно наличие двух расположенных рядом остатков аргинина.

Для мембранных белков, которые обычно перемещаются между ЭПР и аппаратом Гольджи, также характерен сигнал возвращения, состоящий из основных аминокислот. В качестве примера приведем ERGIC-53, который транспортирует растворимые белки от ЭПР в аппарат Гольджи (см. 4.6 *COPII-окаймленные везикулы участвуют в транспорте из ЭПР в аппарат Гольджи*). ERGIC-53 имеет как сигнал экспорта из ЭПР, так и сигнал возвращения в ЭПР, содержащий два остатка лизина и расположенный со стороны цитоплазмы.

4.8 COP1-окаймленные везикулы участвуют в ретроградном транспорте белков из аппарата Гольджи в ЭПР

Основные положения

- Сборка комплекса белков окаймления COP1 инициируется мембранно-связанной ГТФазой, которая называется ARF. Она активирует процесс сборки коатомерных комплексов и их распад после гидролиза ГТФ
- Белки окаймления COP1 прямо или опосредованно связываются с карго-белками, которые возвращаются в эндоплазматический ретикулум из аппарата Гольджи

Подобно тому как COPII-окаймленные везикулы участвуют в транспорте вновь синтезированных нативных белков из ЭПР в аппарат Гольджи, **COP1-окаймленные везикулы осуществляют ретроградный транспорт** белков из аппарата Гольджи в ЭПР (рис. 4.17). COP1-везикулы играют важную роль в возвращении белков снова в ЭПР (см. 4.7. *Резидентные белки, выходящие из ЭПР, возвращаются обратно*). Наряду с этим они, вероятно, принимают участие в рециклировании таких важных компонентов везикул, как белки SNARE. Эти белки возвращаются из аппарата Гольджи назад, в ЭПР, а также мигрируют из *транс*-участка аппарата Гольджи на *цис*-сторону. Имеются данные о том, что COP1-везикулы могут

принимать участие в anterograde транспортных процессах в диктиосоме Гольджи, хотя их роль при этом точно не известна (см. 4.9 *Существуют две распространенные модели, описывающие прямой транспорт белков через аппарат Гольджи*).

Наиболее убедительные данные о роли COPI-везикул в ретроградном транспорте были получены в генетических экспериментах на дрожжах. Для инициации процесса конъюгации дрожжей фактор α должен связаться со своим рецептором на плазматической мембране (подробнее см. MBIO:4-0001). С использованием генетического подхода был сконструирован рецептор α фактора, который в цитоплазматическом участке содержал сигнал возвращения с двумя остатками лизина. Этот рецептор не экспрессировался на поверхности клетки, и дрожжи с таким мутантным рецептором не обладали способностью к конъюгации. Были обнаружены супрессорные мутации, которые восстанавливали способность клеток к конъюгации. Оказалось, что эти мутации происходят в генах, кодирующих компоненты белков окаймления COPI. Тем самым подтвердилась роль COPI везикул в возврате в ЭПР белков, обладающих соответствующим сигналом с двумя остатками лизина (подробнее о супрессорных мутациях у дрожжей см. GNTC:4-0001).

Для образования COPI везикул необходима сборка ГТФазы и белков окаймления на донорской мембране (рис. 4.24). Процесс сборки происходит таким же образом, как и для COPII везикул, но с использованием других белков. В случае везикул COPI на первом этапе сборки происходит ассоциация с мембраной ГТФазы, представляющей собой фактор **АДФ-рибозилирования (ARF)**. ARF охарактеризован менее подробно, чем его аналог в ЭПР, Sar1p, играющий аналогичную роль в сборке окаймляющих белков COPII (см. 4.6 *COPII-окаймленные везикулы участвуют в транспорте из ЭПР в аппарат Гольджи*). Впервые ARF был идентифицирован как кофактор, необходимый для гибели клетки при действии на нее холерного токсина.

ARF, связанный с ГДФ, представляет собой растворимый белок цитоплазмы. Как и другие небольшие ГТФазы, ARF активируется при связывании с ГТФ-ГДФ-обменивающим фактором (GEF, подробнее о нем см. MBIO:4-0002). Комплекс ARF-GEF находится на мембранах аппарата Гольджи и специфическим образом воздействует на ARF, вызывая отщепление ГДФ и связывание ГТФ. При связывании ГТФ наступают конформационные изменения, в результате которых на N-конце молекулы ARF обнажается остаток миристиновой кислоты. Этот

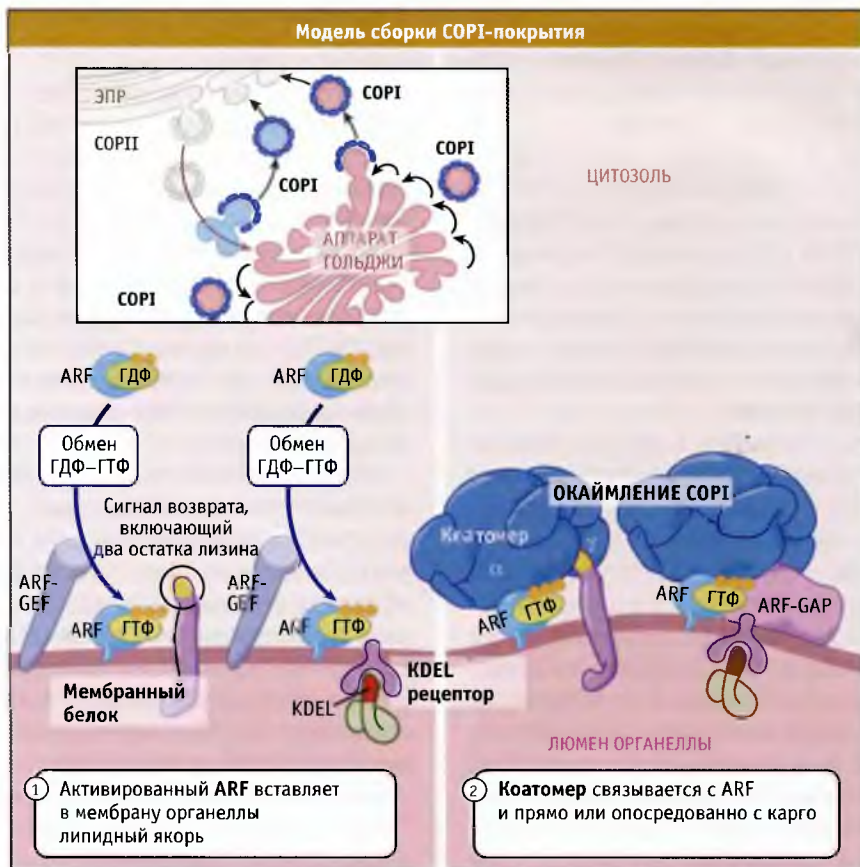


Рис. 4.24. Модель, описывающая участие окаймляющих белков и молекул карго в сборке COPI везикул. На схеме представлено возвращение молекул карго (трансмембранный белок типа I и KDEL рецептор) в эндоплазматический ретикулум

остаток способствует скреплению комплекса ARF-ГТФ с мембранами аппарата Гольджи. Комплекс является специфической мишенью для брефелдина А, фармакологического препарата, блокирующего сборку белков окаймления COPI и приводящего к разрушению аппарата Гольджи и массовому переходу его мембран в ЭПР.

Образование комплекса ARF-ГТФ приводит к мобилизации в мембране комплексов белков окаймления COPI, известных под названием **коатомеров**. Каждый коатомер представляет собой ассоциат, состоящий из семи белков, которые обозначаются следующим образом: α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - и ζ -COP. Активации мембранных комплексов способствует присутствие отрицательно заряженных мембранных липидов, которые с ними связываются. Связывание коатомеров с мембраной способствует ее деформации при образовании везикул. Таким образом, коатомеры играют в образовании везикул COPI такую же роль, как и Sec23/24 и Sec13/31 в образовании везикул COPII.

Белки окаймления COPI прямо или опосредованно связываются с белками, возвращающимися в ЭПР. Для мембранных белков типа I, γ -субъединица коатомера непосредственно связывается с возвратной последовательностью, содержащей два лизиновых остатка и расположенной со стороны цитоплазматической части (см. рис. 4.24). Белки окаймления COPI также связываются опосредованно с рецептором KDEL, вероятно за счет ARF-ГТФаза активирующего белка (ARF-GAP). Это приводит к возврату в ЭПР KDEL-содержащих растворимых белков. Комплекс ARF-GAP также стимулирует гидролиз ГТФ, связанного с ARF, что вызывает отщепление белков окаймления.

Как показано на рис. 4.22, процесс возврата белков начинается, как только при слиянии везикул COPII, отпочковавшихся от ЭПР, сформировались везикулярно-тубулярные кластеры (VTCs). Возврат продолжается по мере движения VTCs в цис-Гольджи вдоль микротрубочек (см. 4.6 COPII-окаймленные везикулы участвуют в транспорте из ЭПР в аппарат Гольджи). Возврат также происходит из CGN и, в меньшей степени, из более отдаленных участков аппарата Гольджи.

Некоторые токсины, например холерный токсин, используют механизм возврата белков из дистальных компартментов аппарата Гольджи. Токсин продуцируется холерным вибрионом *Vibrio cholera*. Он попадает в клетку путем эндоцитоза и из ЭПР транспортируется в цитоплазму, вероятнее всего по ретротранслокационному механизму (см. 3.19 Неправильно свернутые белки ЭПР поступают в цитозоль, где подвергаются деградации). На С-терминальном конце одной из субъединиц молекулы холерного токсина находится последовательность KDEL. Попавший в клетку токсин транспортируется из эндосом в транс-Гольджи-сеть, где связывается с дистальным KDEL-рецептором и по механизму ретроградного транспорта поступает в ЭПР.

До того как COPI везикулы сольются с ЭПР, они должны освободиться от белков окаймления с тем, чтобы липидный бислой транспортной везикулы мог тесно контактировать с реципиентной мембраной. Если за-

блокировать процесс освобождения от белков окаймления, то слияния везикулы с мембраной не происходит. Механизм отщепления белков окаймления исследован недостаточно, однако предполагается, что диссоциация коатомера и везикулы инициируется ARF-GAP. По-видимому, ARF-GAP стимулирует гидролиз ГТФ под действием ARF, что ведет к высвобождению из мембраны ARF-ГДФ и коатомера. В заключении комплекса ARF-GAP в везикулу может участвовать рецептор KDEL. После освобождения от белков окаймления везикулы сливаются с ЭПР при участии белков SNARE (см. 4.12 Белки SNARE, вероятно, участвуют в слиянии везикул с мембранами-мишенями).

4.9

Существуют две распространенные модели, описывающие прямой транспорт белков через аппарат Гольджи

Основные положения

- Транспорт больших белковых структур через аппарат Гольджи осуществляется посредством созревания цистерн
- Отдельные белки и небольшие белковые структуры транспортируются через аппарат Гольджи или посредством созревания цистерн, или за счет везикулярного транспорта

Аппарат Гольджи представляет собой органеллу, состоящую из многих компартментов, которые содержат упорядоченный набор ферментов. Эти ферменты могут модифицировать гликопротеины и липиды по мере их перехода от цис- к транс цистернам. Поэтому молекулы карго должны пройти через каждый компартмент органеллы, хотя механизм этого остается предметом оживленных дискуссий. На основании результатов исследований транспорта различных по размеру белков предложено две модели антероградного транспорта через аппарат Гольджи: **созревание цистерн** и везикулярный транспорт.

Модель созревания цистерн была предложена на основании наблюдений, сделанных на клетках некоторых растений, образующих чешуйки, покрывающую клеточную поверхность. Эти белковые оболочки, по-видимому, образуются в аппарате Гольджи и по размеру приближаются к размеру цистерн, которые их содержат (примерно 1–2 мкм диаметром). Движение всей цистерны, вероятно, представляет собой для чешуйки единственную возможность пройти через аппарат Гольджи. Предположили, что собирающиеся в цистернах новые чешуйки образуются на *цис*- или на входной стороне аппарата Гольджи, а зрелые чешуйки выходят на *транс*-стороне или на стороне выхода.

Эти наблюдения позволили высказать предположение о созревании цистерн: при созревании цистерна, несущая чешуйку, должна пройти всю стопку, как это иллюстрирует [Рис. 4.25](#). При созревании происходит не

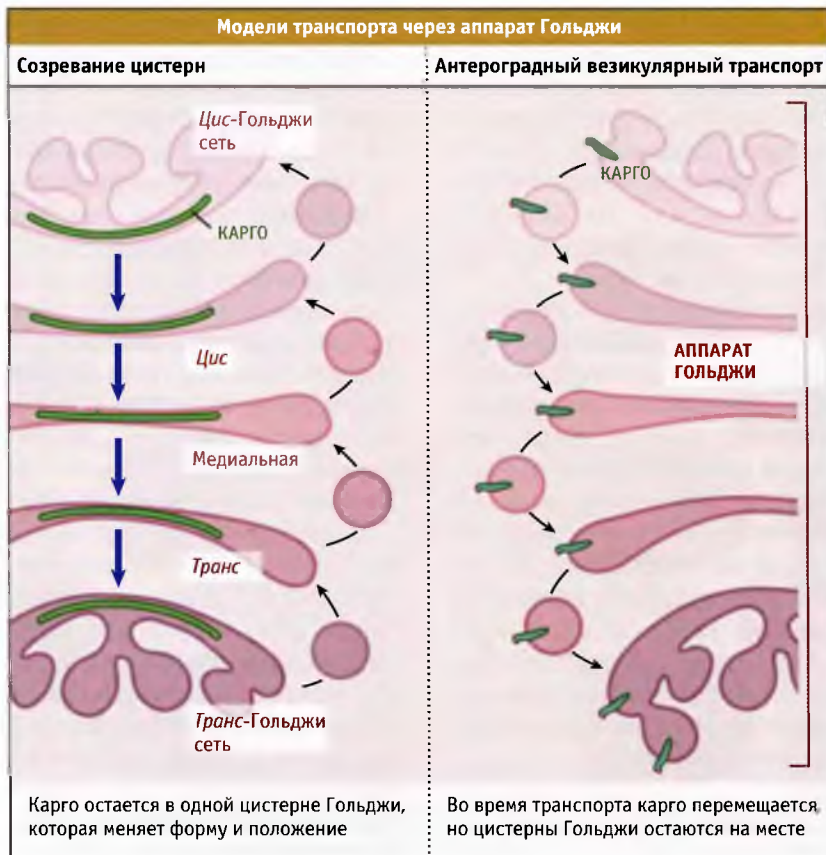


Рис. 4.25 Две модели, предложенные для описания транспорта через аппарат Гольджи: созревание цистерн и везикулярный транспорт

только физическое перемещение цистерны, но также меняется ее мембрана. Это приводит к изменению набора ферментов, действующих на созревающую чешуйку на очередном этапе ее созревания. Экспериментальная проверка этой гипотезы затрудняется непригодностью растений в качестве экспериментального объекта. Также остается неясным, ограничивается предложенный механизм транспорта чешуек только некоторыми растительными объектами или имеет более общее значение. Большинство клеточных биологов (цитологов) склоняется к первой точке зрения, хотя имеются данные, полученные и на клетках млекопитающих, о том, что некоторые большие белки, например фибриллы коллагена, транспортируются по аппарату Гольджи практически таким же образом (см. 15.3 Коллаген обеспечивает поддержку структуры тканей).

Модель везикулярного транспорта разработана на основании исследований антероградного транспорта VSV-G-белка в экспериментах по реконструкции *in vitro* с использованием мембран аппарата Гольджи (см. EXP:4-0005). Эти эксперименты показали, что COP1 везикулы содержат VSV-G-белок, и позволили предположить его транспорт между *цис*- и *транс*-цистернами Гольджи. В частности, VSV-G-белок экспрессировали в клетках, генетически дефектных по ферменту гликозилтрансферазе, который катализирует его терминальное

гликозилирование. Мембраны Гольджи от этих клеток инкубировали *in vitro* с мембранами клеток дикого типа, содержащих фермент. При этом наблюдалось терминальное гликозилирование, и появлялись COP1-везикулы, которые служили в качестве интермедиатов в транспорте между цистернами Гольджи. Прямого слияния мембран Гольджи не происходило. Эти эксперименты позволили прийти к заключению о том, что аппарат Гольджи содержит стабильную стопку цистерн и груз транспортируется от цистерны к цистерне в COP1-окаймленных везикулах (рис. 4.25).

На основании экспериментов по реконструкции везикулярного транспорта *in vitro* было показано, что COP1-везикулы участвуют в прямом транспорте секреторного белка карго от *цис*- к *транс*-участку аппарата Гольджи. Однако обнаружение участия COP1-везикул в ретроградном транспорте из аппарата Гольджи в ЭПР (см. 4.8 COP1-окаймленные везикулы участвуют в ретроградном транспорте белков из аппарата Гольджи в ЭПР) объясняет, каким образом перестройка цистерн участвует в их созревании. COP1-везикулы могут возвращать резидентные компоненты *цис*-цистерн по мере прохождения ими стопки Гольджи и в процессе «созревания» становятся *транс*-цистернами. Действительно, ферменты Гольджи были обнаружены в COP1-везикулах биохимическими методами и иммуноэлектронной мик-

роскопией. Конечно, данные о том, что COP1-везикулы осуществляют ретроградный транспорт, не исключают возможности их функционирования в качестве анте-роградных переносчиков секреторного карго от цис- к транс-цистернам. Действительно, есть данные о том, что COP1-везикулы содержат новосинтезированные карго белки, такие как VSV-G и проинсулин. Это позволяет предполагать, что существуют различные популяции COP1-везикул, переносящие различные белки.

Проще говоря, при везикулярном транспорте мембраны аппарата Гольджи остаются на месте, и карго переносится в везикулах. Напротив, при созревании цистерн карго остается на месте (в цистерне), но перестраивается окружающая его мембрана цистерны. Необходимо иметь в виду, что обе модели не исключают друг друга, и транспорт может осуществляться одновременно по двум механизмам. Если белок карго слишком велик для включения в COP1-везикулы, то он может транспортироваться через аппарат Гольджи по механизму созревания цистерн. Небольшие молекулы карго проходят через цистерны в COP1-везикулах. Это не означает, что при созревании цистерн транспортируются только большие молекулы, однако это может являться для них лучшим (если не единственным) путем транспорта.

4.10 Удержание белков в аппарате Гольджи зависит от домена, пронизывающего мембрану

Основные положения

- Для удержания белков в аппарате Гольджи достаточно домена, пронизывающего мембрану, и фланкирующих его последовательностей
- Механизм удержания белков Гольджи зависит от их способности образовывать олигомерные комплексы и от длины домена, пронизывающего мембрану

До сих пор мы рассматривали сигналы сортировки, которые обеспечивали селективный транспорт карго из одного компартмента в другой при экзоцитозе в прямом или обратном направлении. Однако существует другой важный механизм, который обеспечивает адресную локализацию индивидуальных белков. Это механизм селективного удержания. Он позволяет определенному белку закрепляться на достигнутом месте и предотвращает его дальнейший неизбирательный или сигнал-зависимый транспорт. Аппарат Гольджи является одним из мест в клетке, где реализуется механизм селективного удержания белков.

В аппарате Гольджи содержится много ферментов, которые модифицируют олигосахаридные цепи. Их эффект в отношении N-олигосахаридов показан на рис. 4.8. В различных участках стопки цистерн (*цис*-, *транс*- или в середине) могут локализоваться различные ферменты. В общем, ферменты Гольджи относятся к трансмембранным белкам типа II с коротким N-терминальным участком,

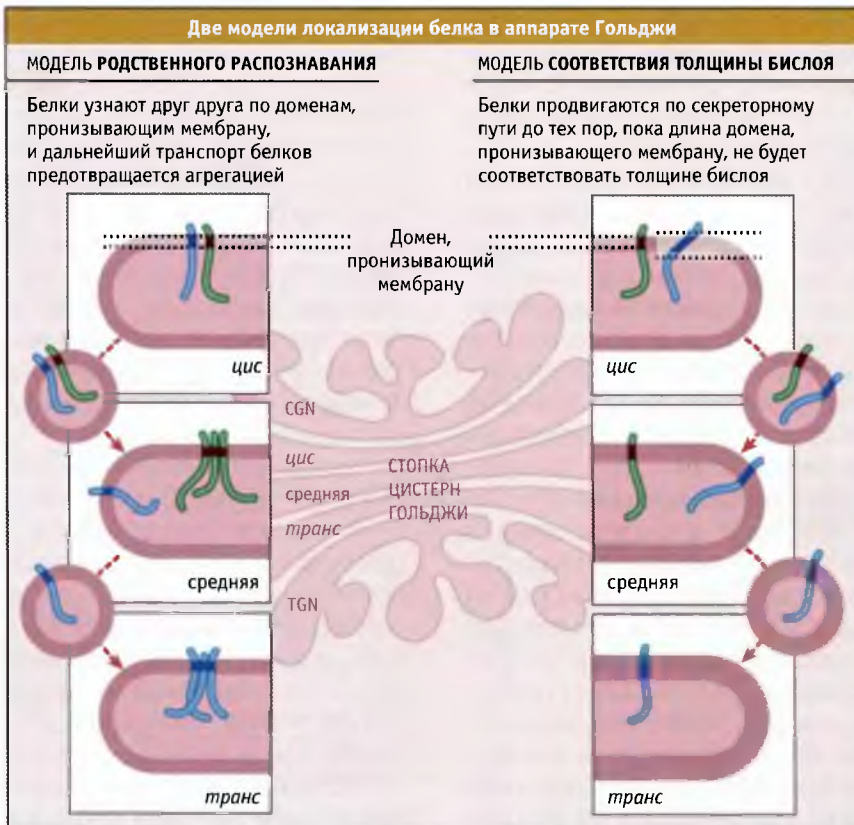
обращенным в сторону цитоплазмы, и с С-терминальным, каталитическим доменом, обращенным в люмен.

Домен, пронизывающий мембрану, представляет собой сигнальный якорь, который сначала направляет вновь образованный фермент Гольджи в ЭПР (см. 3 *Мембранное адресование белков*). Аминокислоты, расположенные по бокам этого домена, обеспечивают надлежащую топологию фермента в мембране. Фермент удерживается в аппарате Гольджи, главным образом, за счет домена и фланкирующих его аминокислот. Если к белку-репортеру, который обычно не локализован в аппарате Гольджи, присоединить пронизывающий мембрану домен и фланкирующие аминокислоты, то этого оказывается достаточно для того, чтобы белок остался локализованным в аппарате Гольджи. Поэтому эти последовательности называются **сигналы удержания**.

Предложено две модели, объясняющие удержание мембранных белков в аппарате Гольджи: модель родственного распознавания и модель соответствия толщины бислоя (рис. 4.26). Модель родственного распознавания предполагает, что ферменты, расположенные в одной и той же цистерне аппарата Гольджи, узнают друг друга по своим доменам, пронизывающим мембрану. Если концентрация ферментов достигает некоего критического уровня, то при узнавании образуются настолько большие агрегаты, что они не могут поместиться в COP1-везикулы. Поэтому ферменты не транспортируются ни в прямом, ни в обратном направлении. Согласно этой модели, удержание белка в аппарате Гольджи не связано с наличием специальных рецепторов (в отличие от возвращения белков, обусловленного, например, рецептором KDEL) (см. 4.7 *Резидентные белки, выходящие из ЭПР, возвращаются обратно*). Таким образом, удержание белков в аппарате Гольджи по данной модели представляет собой процесс, который не характеризуется насыщением.

Модель родственного распознавания поддерживается результатами экспериментов по искусственному удержанию ферментов Гольджи в ЭПР. При этом остальные ферменты, обычно расположенные в тех же цистернах, перемещаются в другие места. В этих экспериментах в клетке гиперэкспрессировался фермент Гольджи, который в цитоплазматическом домене содержал сигнал удержания в ЭПР. Молекулы такого мутантного фермента были обнаружены в ЭПР в составе комплекса с молекулами фермента дикого типа. Таким образом, под влиянием мутантного фермента его дикая форма переместилась из аппарата Гольджи в ЭПР.

Модель соответствия толщины бислоя предполагает, что в удержании белка в аппарате Гольджи важную роль играет размер домена, пронизывающего мембрану, а не его аминокислотный состав. В основе модели лежит факт увеличения содержания холестерина в мембранах по пути экзоцитоза от места его синтеза в мембране ЭПР к плазматической мембране. Поскольку *in vitro* увеличение содержания холестерина ведет к увеличению толщины липидного бислоя, ожидается, что в направлении от ЭПР к плазматической мембране должен существовать градиент его толщины. По сравнению с ферментами



Две модели, описывающие возвращение трансмембранных белков в аппарат Гольджи: модель родственного распознавания и модель соответствия толщины бислоя

плазматических мембран, ферменты аппарата Гольджи обладают более короткими мембранными доменами, поэтому они будут транспортироваться до того момента, пока размер домена не станет соответствовать толщине бислоя. Для дальнейшего транспорта белка необходимо включение заряженных фланкирующих аминокислот в гидрофобный бислой, что затруднено энергетически.

Модель соответствия толщины бислоя подтверждается экспериментами, в которых в одном из ферментов Гольджи домен, пронизывающий мембрану, был замещен последовательностью, состоящей из нескольких остатков лейцина, который представляет собой гидрофобную аминокислоту, соответствующую окружению внутри липидного бислоя. Фермент, содержащий короткую последовательность лейциновых остатков, удерживался в аппарате Гольджи, в то время как фермент с более длинным доменом транспортировался в плазматическую мембрану.

Следует отметить, что предложенные модели не исключают друг друга, и обе могут принимать участие в локализации ферментов в индивидуальных цистернах аппарата Гольджи. Агрегированные ферменты Гольджи выходят из цистерн с меньшей вероятностью, поскольку энергетические затраты при несовпадении домена, пронизывающего мембрану, и толщины бислоя в этом случае оказываются гораздо выше, чем для индивидуальных ферментов.

4.11 Rab-ГТФазы и удерживающие белки представляют собой два типа белков, регулирующих адресование везикул

Основные положения

- Так же как и мономерные ГТФазы из семейства Sar/ARF участвуют в образовании белков окаймления транспортных везикул, семейство Rab-ГТФаз участвует в адресовании этих везикул в мембраны-реципиенты
- На каждом этапе везикулярного транспорта участвуют различные представители семейства Rab
- Белки, которые отбираются или активируются системой Rab, называются даунстрим-эффекторами. Они включают такие удерживающие белки, как длинные фибриллы и большие мультипротеиновые комплексы
- С помощью удерживающих белков везикулы присоединяются к мембранным компартментам, а компартменты друг к другу

Когда произошел отбор белков карго, и они включились в транспортную везикулу, должно произойти ее слияние с мембраной следующего на пути компартмента (рис. 4.16). Это не простая задача, принимая во внимание существующее богатство выбора внутриклеточных мембран. Клетка располагает по крайней мере двумя независимыми группами белков, Ras-подобными

ГТФазами, которые называются **Rabs**, и **удерживающими белками**. Эти белки должны обеспечивать точность процесса адресования до момента слияния мембран (4.12 Белки SNARE, вероятно, участвуют в слиянии везикул с мембранами-мишенями).

ГТФазы, относящиеся к семейству Ras, представляют собой первые из идентифицированных белков, участвующих в адресовании. Они были обнаружены в ходе отбора мутантов, при изучении секреции белков у дрожжей. Например, для транспорта из ЭПР в аппарат Гольджи требуется белок Ypt1p, а для транспорта из аппарата Гольджи в плазматическую мембрану — белок Sec4p. В отсутствие функционально полноценного белка Sec4p, транспортные везикулы, образующиеся в аппарате Гольджи, не могут сливаться с плазматической мембраной. Гомологи этих белков в клетках млекопитающих были обнаружены при скрининге библиотек кДНК головного мозга крысы и отсюда известны под названием белки Rab («rat brain»).

В настоящее время в почкующихся дрожжах обнаружено около двенадцати, а в клетках млекопитающих около 60 белков, относящихся к семейству Rab/Ypt. Учитывая количество отдельных этапов транспорта при эндоцитозе и на секреторном пути, существует, вероятно, достаточное количество Rab-белков для того, чтобы за каждый отдельный этап отвечал по крайней мере один белок. В общем, Rab-белки локализируются в тех органеллах, где они функционируют (рис. 4.27).

Так же как и другие мономерные ГТФазы, белки Rab/Ypt могут быть в неактивной, связанной с ГДФ, и активной, связанной с ГТФ форме (MBIO:4-0003). Белок Rab, связанный с ГДФ, находится в цитозоле, а форма его, связанная с ГТФ, ассоциирована с мембранами. Так же как и белки Ras, каждый белок семейства Rab/Ypt содержит каталитический домен ГТФазы и липидный якорь, расположенный на С-терминальном участке молекулы. Якорь состоит из двух прениловых (геранил-гераниловых) цепей, содержащих по 20 углеродных атомов, и помогает белку закрепиться на мембране. Последовательность, расположенная на С-терминальном конце, определяет компартмент (или компартменты), с которым связывается Rab-белок.

Ассоциация Rab-белков с мембранами представляет собой регулируемый процесс. На рис. 4.28 представлена одна из моделей, предложенных для описания локализации белков Rab/Ypt. Белок Rab в форме, связанной с ГДФ, присутствует в цитозоле в виде комплекса с ингибитором отщепления гуаниловых нуклеотидов (GDI). При блокировании функции прениловой группы, которая способствует ассоциации с мембраной, GDI препятствует образованию мембранно-связанной формы Rab, переводя ее в растворимое состояние.

На подходящей мембране-доноре Rab-ГДФ освобождается от GDI и происходит замена ГДФ на ГТФ под действием мембранно-связанного GEF (см. рис. 4.28).

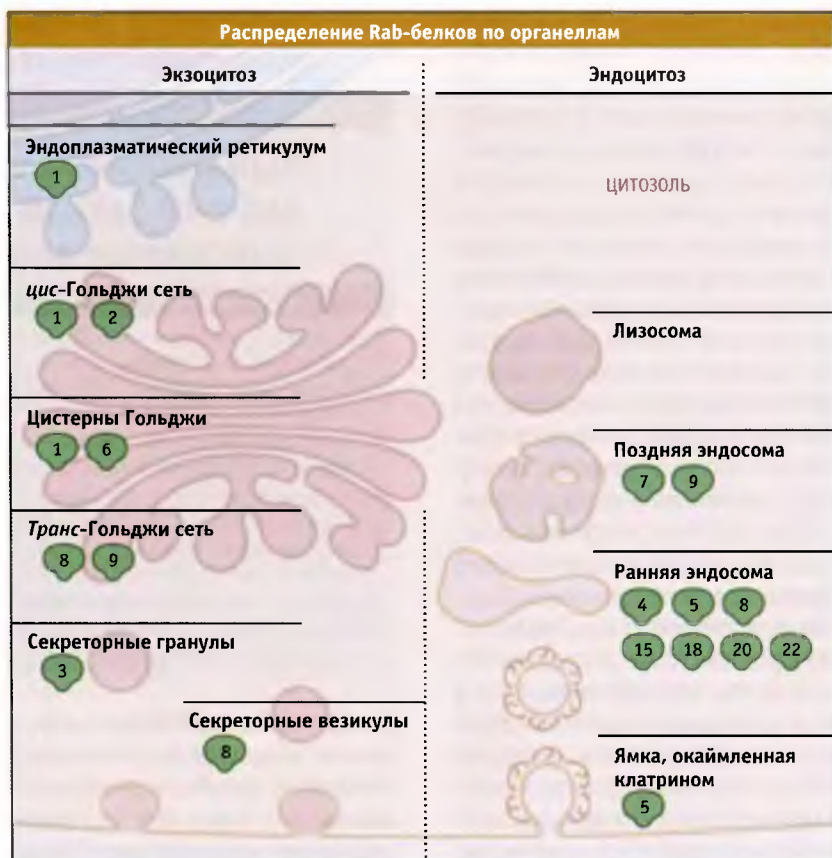
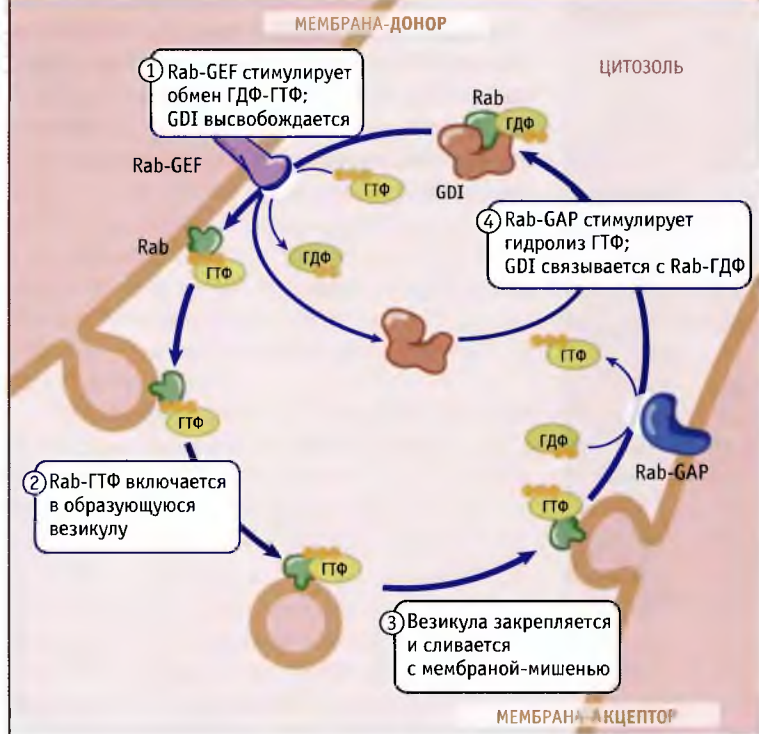


рис. 4.27. Локализация некоторых Rab-белков млекопитающих на органеллах



Однако остается неизвестным, каким образом Rab-белок узнает мембрану. Возможно, что роль «рецепторов» Rab выполняют связанные с мембраной GEF. Так или иначе, активированный Rab-ГТФ включается в образующуюся везикулу.

Rab-ГТФ (и удерживающие белки) позиционируют везикулу на акцепторной мембране. После этого под действием активирующего белка, обладающего ГТФазной активностью и специфичного для Rab (Rab-GAP), происходит гидролиз ГТФ (рис. 4.28). Образующийся Rab-ГДФ затем связывается с GDI и возвращается в исходный компартмент.

С использованием методов генетики и биохимии было обнаружено много **эффекторов Rab**, представляющих собой белки, которые преимущественно связываются с ГТФ-содержащей формой Rab и выполняют свои дальнейшие функции. Одна группа таких эффекторов представлена белками, имеющими форму спирализованных фибрилл, которые выполняют роль удерживающих белков и образуют начальную связь между транспортной везикулой и мембраной-мишенью. В данном разделе описываются удерживающие белки, связывающие транспортные везикулы с мембранами аппарата Гольджи. (Удерживающие белки, которые связывают транспортные везикулы с эндосомальными мембранами, рассматриваются ниже, в 4.15 *Некоторые рецепторы рециклируют из ранних эндосом, в то время как другие разрушаются в лизосомах.*)

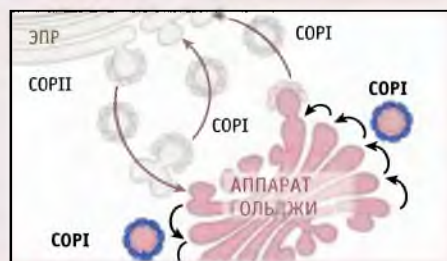
Белок Rab1 представляет собой гомолог дрожжевого белка Ypt1p у млекопитающих и участвует в транс-

портных процессах из ЭПР в аппарат Гольджи, а также в самом аппарате Гольджи. Rab1-ГТФ связывается с p115, биспиральным белком, являющимся эффектором Rab. Одна из функций белка p115 состоит в удержании везикул COPI на мембранах аппарата Гольджи. Эту же функцию также выполняют еще два биспиральных белка, джантин и GM130. В экспериментах с использованием рекомбинантных белков *in vitro* впервые было продемонстрировано взаимодействие джантина и GM130 с Rab1.

Как показано на рис. 4.29, джантин закрепляется на мембране COPI-везикул с помощью домена, пронизывающего мембрану, в то время как GM130 фиксируется на мембранах Гольджи с помощью миристилированного белка GRASP65. Rab1 связывается с джантином, GM130 и p115, однако роль этого связывания в процессе удержания везикулы остается неясной. Очевидно, что комплекс, образующийся под действием Rab1, удерживает COPI-везикулу на мембране Гольджи, хотя остается непонятным, важно ли это удержание для прямого или обратного транспорта.

Наряду с удерживающими белками, обладающими фибриллярной структурой, существует семейство больших мультипротеиновых комплексов, которые также участвуют в ранних стадиях адресования везикул. К числу их относится комплекс TRAPP, расположенный с входной стороны аппарата Гольджи, комплекс COG, участвующий в транспортных процессах внутри органеллы, и комплекс экзоцист, расположенный на плазматической мембране.

Модель, описывающая механизм удержания COPI-везикул на мембранах аппарата Гольджи



АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

ЦИТОЗОЛЬ

p115

GRASP 65

ДЖИАНТИН

GM130

Белки
окаймления COPI

COPI-везикулы удерживаются на мембранах Гольджи спирализованными белками. В данной модели движение COPI-везикул ограничивается этими белками, которые помогают выбрать мембраны цистерн, между которыми продвигаются везикулы. Rab1 связывается с GM130, p115 и с джиантином, однако точное строение комплексов неизвестно и поэтому не показано

У дрожжей **экзоцист** представляет собой комплекс, состоящий из семи белков, который способствует взаимодействию везикул, прошедших аппарат Гольджи, с плазматической мембраной на конце растущего дочернего пузырька (). В клетках эпителия млекопитающих гомолог экзоциста находится в месте контакта апикального и базолатерального доменов (подробнее о транспорте белков в поляризованных клетках см. 4.18 Поляризован-

ные эпителиальные клетки транспортируют белки к апикальной и базолатеральной мембранам). Нарушение функции экзоциста за счет мутации или при введении антител приводит к замедлению или полному блокированию секреции белков. По-видимому, этот эффект является следствием нарушения способности транспортных секреторных везикул позиционироваться на местах последующего слияния с плазматической мембраной.

Экзоцист является комплексом, обеспечивающим удержание везикул



4.12 Белки SNARE, вероятно, участвуют в слиянии везикул с мембранами-мишенями

Основные положения

- Присутствие белков SNARE является необходимым и достаточным для специфического слияния мембран *in vitro*. Однако для протекания этого процесса *in vivo* также могут потребоваться другие белки
- Белок v-SNARE, находящийся на транспортной везикуле, взаимодействует со своим аналогом t-SNARE, который локализован на мембране-мишени
- По-видимому, взаимодействие между белками v- и t-SNARE приводит к тесному контакту мембран, при котором их слияние становится возможным
- После слияния АТФаза NSF разрушает контакт между v- и t-SNARE, и v-SNARE возвращается в исходный мембранный компартмент

Вначале Rab и удерживающие белки обеспечивают контакт между везикулой и мембраной, с которой она должна объединиться (см. 4.11 Rab-ГТФазы и удерживающие белки представляют собой два типа белков, регулирующих адресование везикул). Хотя две мембраны располагаются в тесном контакте друг с другом,

Экзоцист представляет собой комплекс белков цитозоля, которые обеспечивают удержание секреторных везикул на плазматической мембране

само по себе это не приводит к их слиянию. Слияние мембран в значительной степени определяется белками **SNARE**, которые относятся к семейству мембранных белков и являются специфичными по отношению к клеточным органеллам. Слияние регулируется на двух различных уровнях. Для удержания везикулы в компартменте назначения необходимы Rab и комплексы удержания. Они обеспечивают по крайней мере начальный уровень специфичности взаимодействия везикул с мембраной. Посредством белков SNARE достигается причаливание и еще большая специфичность, и мембраны вступают в тесный контакт, необходимый для их слияния. Почему требуются два уровня регуляции, остается неизвестным.

SNARE представляют собой интегральные мембранные белки, снабженные мембранным (или иногда липидным) якорем, расположенном на С-концевом участке. N-терминальный домен этих белков открывается в цитоплазму. Эти белки подразделяются на v-SNARE и t-SNARE, в зависимости от их локализации в везикуле или в мембране-мишени соответственно. Белки v-SNARE включаются в транспортные везикулы (например, см. 4.6 *СОPII-окаймленные везикулы участвуют в транспорте из ЭПР в аппарат Гольджи*).

Вначале эти белки были обнаружены в составе синаптических пузырьков, представляющих собой секреторные транспортные везикулы, находящиеся в синапсах

нейронов. Для выделения этих белков была использована их способность образовывать комплексы друг с другом и с фактором, чувствительным к N-этидмалеимиду (NSF), а также с растворимым белком, присоединяющимся к NSF (SNAP) (см. EXP:4-0006). Ранее белки NSF и SNAP были идентифицированы как возможные участники процесса слияния мембран *in vitro*, хотя их роль остается невыясненной. Белки SNARE были идентифицированы масс-спектрометрическим методом как члены многочисленной группы белков, присутствующих во всех клетках эукариот. Интересно, что каждый белок характеризуется специфической локализацией и подобно белкам Rab относится к определенной внутриклеточной органелле (рис. 4.31). Мутанты дрожжей, несущие мутации по генам, кодирующим белки SNARE, дефектны по ряду этапов мембранного транспорта при эндо- и экзоцитозе. При этом оказываются заблокированными сайты, соответствующие органеллам, с которыми связывается тот или иной белок SNARE.

Гипотеза SNARE была предложена для объяснения специфичности взаимодействия при слиянии транспортных везикул с мембранами-мишенями. Согласно этой гипотезе, белок v-SNARE везикул взаимодействует с гомологичным белком t-SNARE компартмента мишени. Это специфическое взаимодействие приводит к слиянию мембран. В настоящее время идентифицированы пары взаимодействующих белков SNARE для всех этапов

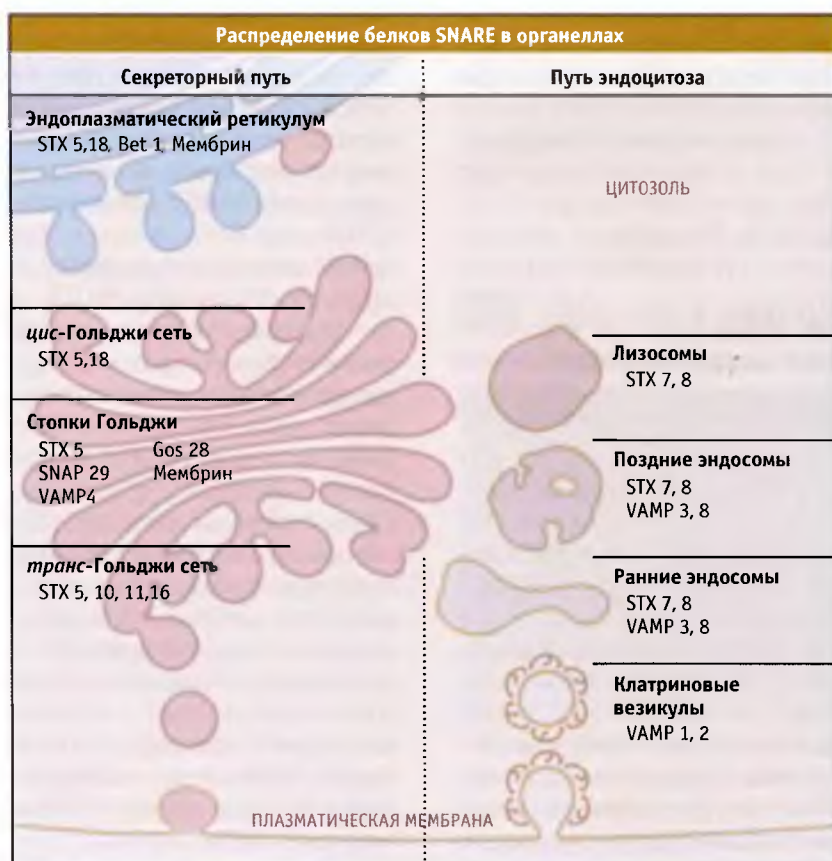


рис. 4.31. Локализация некоторых белков SNARE в органеллах

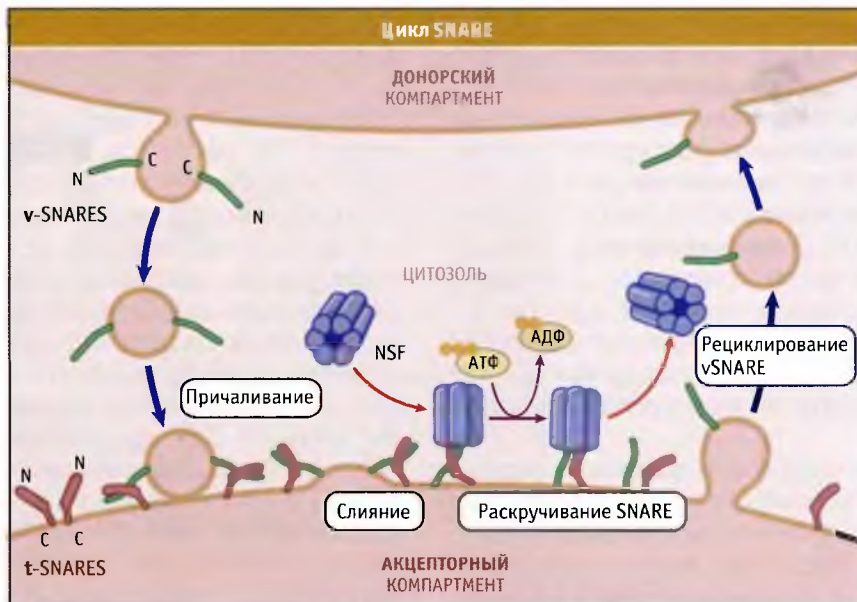


РИС. 4.32 Цикл v-SNARE, происходящий между донорной и акцепторной мембранами. Включившиеся в транспортные везикулы v-SNARE взаимодействуют с t-SNARE, которые находятся в мембране мишени. В результате этого взаимодействия мембраны сближаются и сливаются. После слияния пары SNARE раскручиваются с помощью NSF/SNAP при участии гидролиза АТФ, а v-SNARE возвращаются в донорную мембрану

везикулярного транспорта в клетках дрожжей и млекопитающих. Генетические эксперименты на дрожжах показали, что эти белки участвуют во всех событиях слияния клеточных мембран. При взаимодействии *in vitro* SNARE проявляют специфичность: эффективное образование комплекса наблюдается только для тех белков, которые соответствуют определенным внутриклеточным транспортным событиям. В настоящее время в результате генетических поисков обнаружены все SNARE, экспрессирующиеся в дрожжах, *Drosophila* и у человека. В зависимости от конкретного организма это составляет от 8 до 20 белков.

Каким образом белки SNARE приводят к контакту между мембранами и к их слиянию? Механизм действия этих белков в значительной степени определяется их N-терминальным цитоплазматическим доменом, способным к образованию спирализованных структур с парным SNARE белком. Важно, что при этом спирали ориентируются параллельным образом. Это означает, что взаимодействие между SNARE приводит к тесному контакту между C-терминальными доменами, заякоренными в мембране (РИС. 4.32). «Розочка», которую образуют взаимодействующие спирали между мембранами везикулы и мишени, достаточна для обеспечения тесного контакта, необходимого для слияния. В экспериментах *in vitro* показано, что липосомы, содержащие только один тип белка, v-SNARE, могут сливаться с липосомами, содержащими парный белок, t-SNARE. Эти результаты позволяют предполагать, что белков SNARE достаточно для слияния мембран *in vitro*. Однако неизвестно, нужны ли другие белки для осуществления этого процесса *in vivo*.

Строение кристаллической структуры комплексов SNARE показывает, что спирализованный домен представляет собой связку, состоящую из четырех спиралей. Белок v-SNARE участвует в образовании одной спирали, а t-SNARE образует три. Белки t-SNARE нейронов (РИС. 4.33) необычны в том отношении, что синтаксин образует одну спираль, а SNAP-25 — две. Во всех остальных клетках две последних спирали образуются за счет двух белков SNARE, которые обозначаются как легкие t-SNARE цепи. Поэтому одна молекула v-SNARE взаимодействует с тяжелой цепью t-SNARE и с двумя легкими цепями. (Подробнее о строении SNARE см. [STRC:4-0001](#).)

При структурном анализе было обнаружено удивительное сходство между комплексами SNARE и белками слияния оболочечных вирусов. Из белков слияния лучше всего изучены гемагглютинин вируса гриппа и белок gp120 вируса HIV-1. В обоих случаях индивидуальные субъединицы образуют друг с другом протяженные спиралеобразные структуры. При низких значениях pH или при связывании с клеточными рецепторами в этих структурах происходят конформационные изменения, в результате которых обнажается гидрофобный «пептид слияния». Спирализованные домены обладают двумя функциями: маскировки пептида слияния и его позиционирования ближе к мембране клетки хозяина после активации. Таким образом, оболочка вируса скрепляется с мембраной клетки-хозяина, с которой она сливается, и при попадании вирусного генома в клетку происходит инфицирование.

Взаимодействие v- и t-SNARE, по-видимому, специфично. Во всех экспериментах *in vitro* по изуче-



Модель, описывающая ориентацию белков SNARE в процессе причаливания везикул. Модель построена на основании рентгеноструктурного анализа цитозольных доменов белков SNARE, образующих связку из четырех спиралей. t-SNARE представлены синтаксином и SNAP-25; v-SNARE — синаптобревином. Предполагается, что белки вставлены в мембрану. Коричневым обозначена связь, существующая между двумя спиральями SNAP-25. По Sutton, R.B., et al. *Nature*. 1998. 395: 347–353

нию связывания и слияния этих белков использовали все комбинации SNARE, заключенные в липосомы. За исключением одного случая, взаимодействие между SNARE соответствует их локализации в дрожжевых клетках, и для слияния липосом в мембране везикулы должен присутствовать белок v-SNARE, а в мембране-мишени, три молекулы t-SNARE. Связка, состоящая из четырех спиралей, не только может обеспечивать слияние мембран, но и помогает определить, какие мембраны должны объединиться.

Взаимодействие между белками SNARE представляет собой регулируемый процесс. Например, t-SNARE содержат N-терминальные последовательности, которые оказывают сильный ингибирующий эффект на образование комплексов SNARE в некоторых клетках. Эти последовательности служат мишенями для регуляторных белков, которые определяют момент образования комплекса. Еще один пример — связывание регуляторных белков с уже готовым комплексом SNARE. Такие взаимодействия с регуляторными белками определяют время образования комплексов — фактора, играющего очень важную роль в процессе регулируемой секреции, которая характерна для нейронов и для клеток поджелудочной железы (подробнее см. 4.19 *Некоторые клетки запасают белки для последующей секреции*).

После того как слияние произошло, спиральные комплексы SNARE раскручиваются, и v-SNARE возвращается в исходную мембрану для участия в последующих циклах образования везикул (рис. 4.32). Раскручивание спиралей требует значительных энергетических затрат, поскольку комплексы SNARE крайне устойчивы

и противостоят воздействию даже такого сильного ионного детергента, как додецилсульфат натрия в низких концентрациях. Раскручивание спиралей катализируется NSF, который представляет собой цитоплазматическую АТФазу. Белок NSF образует гексамерный комплекс бочкообразной формы с центральным каналом и через SNAP белок связывается со SNARE. В экспериментах *in vitro* с использованием очищенных белков или включенных в биологические мембраны показано, что гидролиз АТФ под действием NSF приводит к разделению спиралей в четырехспиральном пучке. Механизм этого процесса неизвестен. Одно из возможных предположений состоит в том, что SNARE связывается со стенками центральной полости NSF, и при гидролизе АТФ отверстие открывается, что дает возможность раскрутиться спиральям SNARE.

После того как v- и t-SNARE разделились, v-SNARE снова поступает в донорскую мембрану. В том, что это действительно произошло, можно убедиться по отсутствию накопления v- и t-SNARE в единственной мембране и по медленной скорости их деградации. Предложено два механизма транспорта v-SNARE. Один механизм заключается в том, что они переносятся в повторно используемых везикулах по сигналу возврата в цитоплазматическом домене. Есть некоторые данные в пользу существования сигнала возврата у белков SNARE, однако неизвестно, как все это работает. Согласно второму механизму, некоторые белки v-SNARE могут функционировать в двух направлениях, т. е. направляя движущиеся вперед везикулы к мембране-мишени, а движущиеся назад — к исходной мембране. Так или иначе, подобно некоторым рецепторам плазматической мембраны, SNARE постоянно подвергаются рециклизации между теми компартментами, в пределах которых они функционируют.

4.13 Обычно в эндоцитозе участвуют клатриновые везикулы

Основные положения

- Постепенная сборка клатриновых трискелионов может представлять собой механический способ преобразования мембран в окаймленные ямки
- Различные адапторные комплексы позволяют отбирать карго для транспорта при связывании как с сигналами сортировки, так и с клатриновыми трискелионами
- ГТФазы из группы динаминов способствуют высвобождению окаймленных везикул из мембраны
- Специальные АТФазы удаляют клатриновое окаймление до начала этапов причаливания и слияния везикул

Эндоцитоз является основным путем, посредством которого в клетку попадают внеклеточные макромолекулы и белки плазматической мембраны (см. 4.3 *Обзор путей эндоцитоза*). Эндоцитоз и различные его формы представляют собой еще один способ мембранного транспорта, при котором образование транспортных везикул проис-

ходит в местах инвагинации плазматической мембраны. По направленности эндоцитоз противоположен общей схеме образования секреторных везикул из мембран оргanelл, но в остальном от нее не отличается (см. 4.4 *Представления о везикулярном транспорте белков*).

К наиболее изученному механизму эндоцитоза относится протекающий с участием транспортных везикул, покрытых белком клатрином и одним или несколькими **адаптерными комплексами**, связывающими клатрин с мембраной. Эти адаптеры также участвуют в отборе карго для включения его в образующиеся везикулы, участвующие в эндоцитозе. Клатрин и белки адаптерного комплекса поступают в образующиеся везикулы из цитозоля.

Молекулы карго, находящиеся в клатриновых везикулах, которые образуются на плазматической мембране, часто представляют собой рецепторы внеклеточных лигандов, предназначенные для быстрого проникновения

их в клетку. Фактически селективный захват рецепторов клатриновыми везикулами являлся первым примером отбора карго в процессе мембранного транспорта. Клатриновые везикулы также участвуют в транспортных процессах через *транс*-Гольджи сеть; эти везикулы имеют другие адаптеры и несут другие белки карго, чем те, которые участвуют в эндоцитозе (см. 4.17 *В транс-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков*).

Впервые **окаймленные ямки** и **везикулы** были обнаружены при электронно-микроскопическом исследовании ооцитов комаров в начале 1960-х годов. Ооциты захватывают и хранят желточные гранулы, необходимые для дальнейшего эмбриогенеза, и скорость захвата так высока, что большая часть поверхности ооцита содержит ямки, покрытые клатрином (рис. 4.34).

В начале 1970-х годов была выяснена структура окаймляющего слоя. Это было сделано на синапсах нейронов при рециклизации синаптических пузырьков пресинаптических мембран, используя метод замораживания-замещения (подробнее о синаптических пузырьках см. 4.19 *Некоторые клетки запасают белки для последующей секреции*). Окаймление выглядит в виде переплетенной сети белковых волокон (рис. 4.35). Благодаря такой структуре, окаймление получило название клатрин (лат. *clathratus* — защищенный решеткой).

Впервые клатриновые везикулы были выделены из ткани головного мозга в 1969 г., и позже было показано, что клатриновое покрытие состоит в основном из двух белков, тяжелой (180 кДа) и легкой (30 кДа) цепей клатрина, представленных в эквимолярном количестве. Исследования в электронном микроскопе показали, что клатриновые белки образуют трехногую фигуру, называемую **трискелион** (рис. 4.36). Каждая «нога» трискелиона включает по одной тяжелой и легкой цепи клатрина. Проксимальный участок ноги расположен ближе к вершине трискелиона и представляет собой место присоединения легких цепей. Дистальный участок располагается дальше от вершины и состоит из тяжелой цепи.

Хотя *in vivo* клатриновое покрытие мембран может собираться с участием других белков, *in vitro* клатрин обнаруживает замечательную способность к самосборке в решетчатые структуры. При инкубации выделенных



Рис. 4.34. Фотография клатриновых ямок и везикул, расположенных на поверхности ооцита, сделанная с помощью трансмиссионного электронного микроскопа. Из: *The Journal of Cell Biology*, 1964, vol. 20, pp. 313–332, с разрешения Университета Рокфеллера

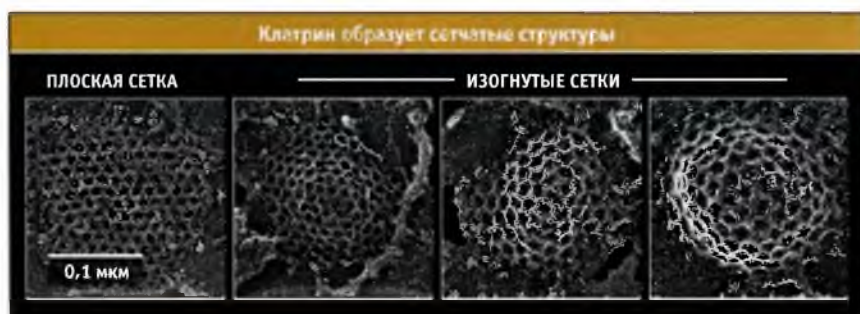
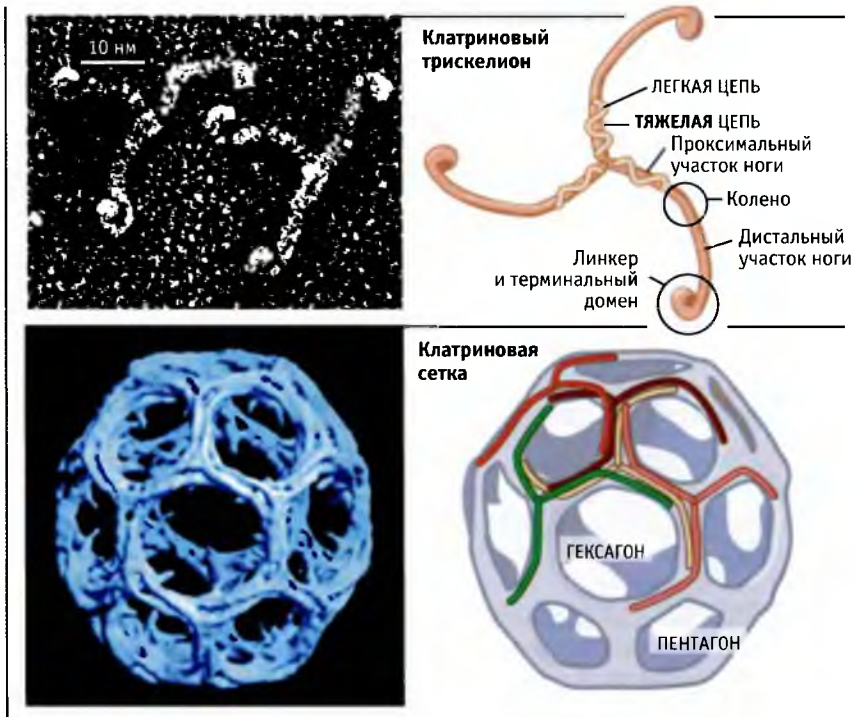


Рис. 4.35. Электронные микрофотографии структур, окаймленных клатрином, находящихся на плазматической мембране. Клатриновые сетки имеют различную кривизну. На каждой фотографии изображена разная сетка. Фотографии любезно предоставлены John Heuser, Медицинская школа, Вашингтонский университет



Клатриновые трискелионы собраны в замкнутые корзиноподобные структуры. Эти структуры могут образовывать сеть, состоящую из многоугольников пентагонального и гексагонального типа, и, таким образом, генерируются замкнутые корзиноподобные структуры. Для простоты на нижнем правом рисунке легкие цепи не показаны. Фотографии: *трискелион* любезно предоставлен Джоном Хойзером, Медицинская школа, Вашингтонский университет; *клатриновая сетка* воспроизведена из работы Smith, C. J., Grigorieff, N., Pearse, b.m.f. Clathrin coats at 21 Å resolution... *EMBO J.* 1998. 17: 4943–4953. С разрешения Oxford University Press. Фотография любезно предоставлена Барбарой Пирс, MRC, Лаборатория молекулярной биологии

трискелионов в среде с определенным значением pH и солевым составом, они спонтанно образуют пустую клатриновую сетку, которая выглядит так же, как и покрытие, окружающее мембрану *in vivo*. Сборка клатриновых решеток из очищенных препаратов легких и тяжелых цепей показывает, что трискелион образует гексагональные и пентагональные структуры, представленные на рис. 4.36. Эти структуры образуют сетки, которые напоминают покрытие везикул *in vivo*. Таким образом, для образования решетчатой структуры необходимо и достаточно наличие тяжелых и легких цепей клатрина. Каждая вершина представляет собой узел одного трискелиона, а каждая сторона пентагона или гексагона состоит из четырех ног, принадлежащих различным трискелионам.

Геометрически структура выглядит так, что гексагональные клатриновые решетки являются плоскими, но образование пентагонов вызывает изгиб необходимый для формирования сетки (рис. 4.36). Однако вся последовательность событий, приводящих к образованию полностью изогнутых и окаймленных ямок, *in vivo* остается неизвестной. Согласно одной из предложенных моделей, часть гексагонов в плоскости каким-то образом меняет структуру и образует пентагоны, что приводит к

возникновению кривизны. Другая модель предполагает, что необходимая кривизна мембраны обеспечивается белками, отличными от клатрина, и эта кривизна «фиксируется» образованием пентагонов.

Для сборки клатриновых сеток источники энергии не требуются. Поэтому предполагают, что при сборке происходит изменение свободной энергии, способствующее инвагинации мембраны и образованию везикулы. Однако в деформации плазматической мембраны до образования окаймленной везикулы ключевую роль также играют адаптерные комплексы.

Клатриновое покрытие непосредственно не взаимодействует с мембраной или с мембранными белками. Как показано на , различные адаптерные комплексы являются посредниками между клатриновыми субъединицами и сигналами сортировки, расположенными в цитоплазматическом участке молекул белков карго. На разных этапах транспорта разные адаптеры выбирают трансмембранные белки (см. 4.14 *Адаптерные комплексы связывают клатрин и трансмембранные белки карго*).

Для завершения эндоцитоза отпочковывающиеся клатриновые везикулы должны отшнуроваться от плазматической мембраны. Процесс отшнуровки тре-

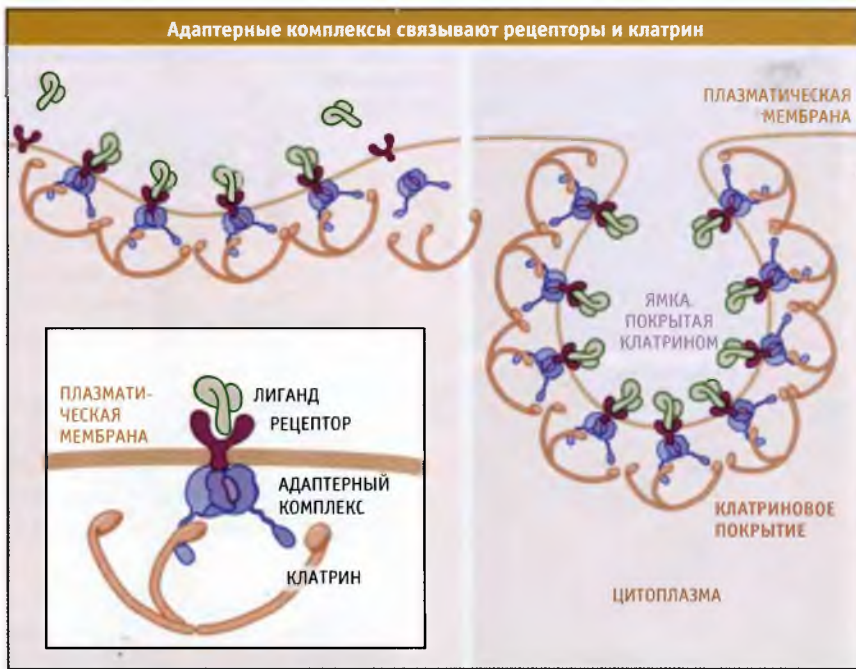


РИС. 4.37. Клатрин связывается с адаптерами, которые узнают сигнал сортировки, расположенный на цитоплазматическом участке предназначенных для транспорта белков

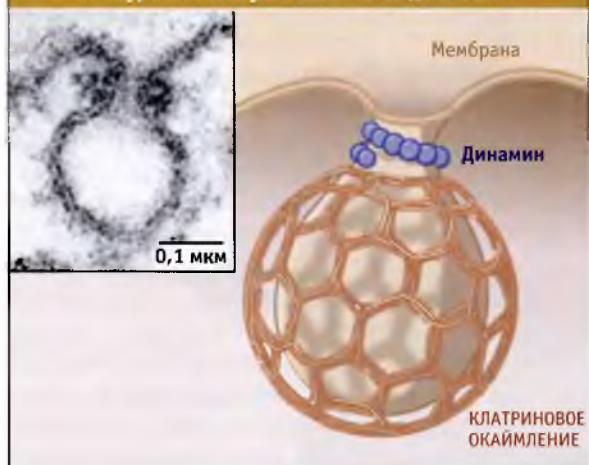


РИС. 4.38. Электронная микрофотография клатриновых ямок в клетках мутанта дрозофилы, дефектных по динамину. Мутантные мухи не были способны летать при непермиссивной температуре 30 °С. Видны каналцы, распространяющиеся от клеточной поверхности и заканчивающиеся клатрин-окаймленными утолщениями. Эти утолщения не могут отшнуровываться, поскольку динаминовые мутанты не способны нормально функционировать при непермиссивной температуре. Фотография воспроизведена из *The Journal of Cell Biology*, vol. 97, pp. 499–507, с любезного разрешения Университета Рокфеллера и д-ра Тошио Косака, Университет Киюшу

бует энергетических затрат и происходит с участием ГТФазы, называемой **динамин**, которая была впервые обнаружена в клетках мутанта *Drosophila shibire*. Эти мухи не способны летать при непермиссивной температуре. В клетках мутанта при непермиссивной температуре окаймленные ямки в синапсах нейронов соединены с длинными перемычками и не отшнурованы от плазматической мембраны (). Такие структуры не обнаруживались при пермиссивной температуре. Эти наблюдения позволили предположить, что фенотип *shibire*-мутанта обусловлен неспособностью компонентов синаптического пузырька передаваться через плазматическую мембрану, тем самым блокируя передачу нервного импульса. Мутация *shibire* вызвана дефектом динамина. В присутствии негидролизуемого ГТФ аналога очищенный динамин клеток млекопитающих *in vitro* образует на плазматической мембране эти длинные перемычки.

Так называемые «воротнички» представляют собой по сравнению с *shibire* небольшие по размеру структуры, состоящие из динамина, которые располагаются вокруг перемычек нормальных клатриновых ямок. Динамин поступает из цитоплазмы, группируясь вокруг перемычки отпочковывающейся окаймленной везикулы в виде спирали с тем, чтобы помочь отшнуровке клатриновых ямок от плазматической мембраны (). Однако механизм отшнуровки неизвестен. Согласно одному представлению, при гидролизе ГТФ эти спиральные структуры сжимаются, тем самым обеспечивая слияние мембраны, необходимое для высвобождения новых клат-

Отшнуровка везикулы вызывается динамином



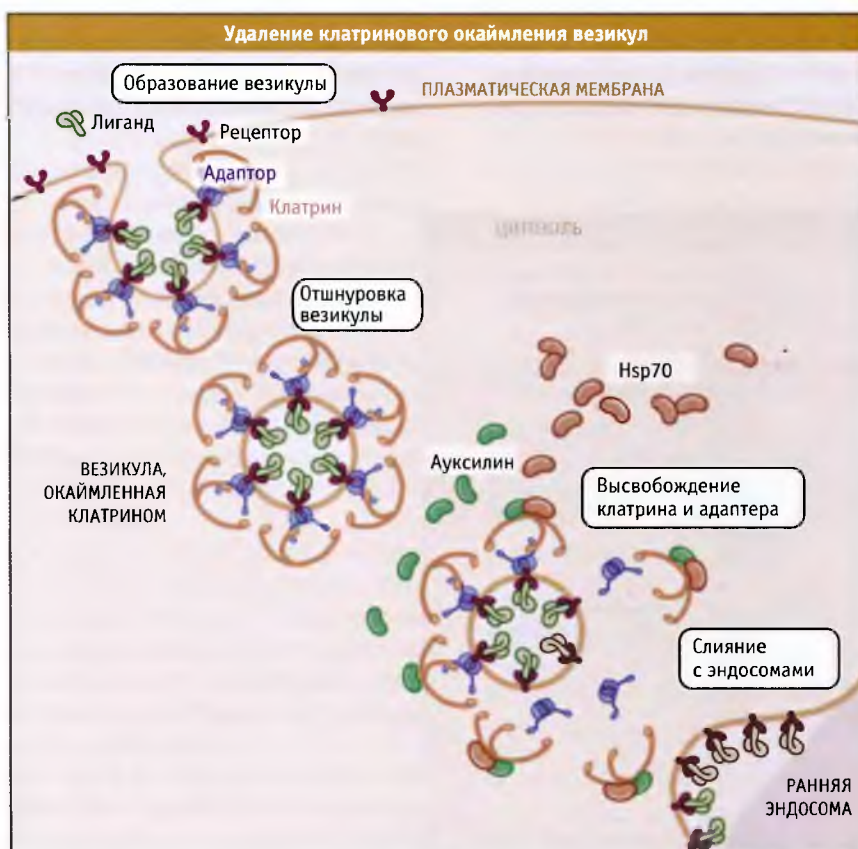
Динамин может образовывать спиральные структуры вокруг перетяжки (шейки) отпочковывающейся везикулы, которые вызывают ее отшнуровку. Фотография любезно предоставлена Пьетро де Камилли, медицинский факультет, Йельский университет

риновых пузырьков. Другая модель предполагает, что динамин косвенным образом способствует отшнуровке, по-видимому, привлекая другие молекулы или изменяя конформацию окаймленной ямки в сторону образования везикулы. Какова бы ни была причина, очевидно, что

динамин является основным компонентом процесса высвобождения клатриновых везикул из плазматических мембран, и вероятно, также из *транс*-Гольджи сети (см. 4.17 В *транс*-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков).

После отделения от мембраны клатриновые везикулы взаимодействуют с элементами актинового цитоскелета, что способствует продвижению везикул по цитозолю. Вновь образованные везикулы могут служить местами сборки актиновых филаментов, обеспечивающих это продвижение. Хотя еще остается выяснить, насколько такое движение необходимо, очевидно, что многие «дополнительные белки», которые участвуют в образовании клатриновых ямок, в частности динамин, могут нуклеировать сборку актина.

После образования клатриновой везикулы окаймление удаляется с тем, чтобы обеспечить везикуле возможность позиционироваться на следующем компартменте, ранней эндосоме. В удалении клатрина участвуют по крайней мере два белка, «раздевающая АТФаза», которая является цитозольным ферментом из группы белков теплового шока, Hsp70, и ауксинин, белок, взаимодействующий с этой АТФазой (рис. 4.40). Точный механизм удаления окаймления неизвестен, однако, вероятно, он включает в себя дестабилизацию и отделение клатринового слоя после присоединения Hsp70. Такой механизм согласуется со способностью этих АТФаз, участвующих в качестве шаперонов при синтезе и



В удалении клатринового окаймления везикул участвуют два белка: Hsp70 и ауксинин

деградации молекул белка, связываться со структурами высшего порядка и вызывать их дестабилизацию. Определенную роль в отделении окаймления, особенно при высвобождении адапторных комплексов, может играть гидролиз кислых фосфолипидов (см. 4.14 Адаптерные комплексы связывают клатрин и трансмембранные белки карго).

4.14 Адаптерные комплексы связывают клатрин и трансмембранные белки карго

Основные положения

- Адаптерные комплексы связываются с цитоплазматическими участками трансмембранных белков карго, с клатрином и с фосфолипидами
- Адаптерные белки, относящиеся к семейству AP, представляют собой гетеротетрамерные комплексы, состоящие из двух адаптиновых субъединиц и двух более мелких белков
- AP адаптеры связываются с сигналами сортировки, локализованными в цитоплазматическом участке белков карго. Наиболее изученные сигналы содержат остаток тирозина или два остатка лейцина
- Адаптерные комплексы обеспечивают селективную и быструю интернализацию рецепторов и их лигандов

Адаптерные комплексы связывают цитоплазматические участки белков карго с клатрином. Наиболее полно изучены адаптеры, относящиеся к семейству «AP», состоящему из четырех основных типов. Как показано на рис. 4.41, эти адаптеры распределяются в клетке харак-

терным образом. AP-1 и AP-2 идентифицированы в качестве основных компонентов изолированных клатриновых везикул. AP-1 локализуется в *транс*-Гольджи сети и в эндосомах, а AP-2 в плазматической мембране. AP-1 функционирует в транспорте растворимых лизосомальных компонентов и некоторых мембранных белков из *транс*-Гольджи сети в эндосомы и лизосомы (см. 4.17 В *транс*-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков). AP-2 участвует в эндоцитозе.

При поиске по базам данных, содержащим сведения о гомологах известных адапторных последовательностей, был обнаружен белок AP-3. Так же как и белок AP-1 он связан с TGN и может участвовать в биогенезе некоторых специализированных лизосом, таких как меланосомы, в которых хранятся пигменты окраски меланоцитов. У мышей с дефектами цвета шерсти часто наблюдаются мутации в субъединицах AP-3. Функции четвертого комплекса, AP-4, не известны.

Различные адаптерные комплексы, по крайней мере частично, связываются с определенными оргanelлами за счет взаимодействия со специфическими фосфолипидами. AP-2 связывается с фосфатидилинозитол-4,5-бис-фосфатом (PI4,5P или PIP₂), который представляет собой фосфолипид, образующийся, главным образом, на цитоплазматическом слое плазматической мембраны. Напротив, AP-1 связывающийся с PI4P, присутствует в основном во внутриклеточных мембранах, например в мембранах комплекса Гольджи и эндосом. Взаимодействие с соответствующим липидом может также индуцировать конформационные изменения, способствующие более эффективно-му присоединению адаптеров к своим карго, тем самым увеличивая их специфичность.

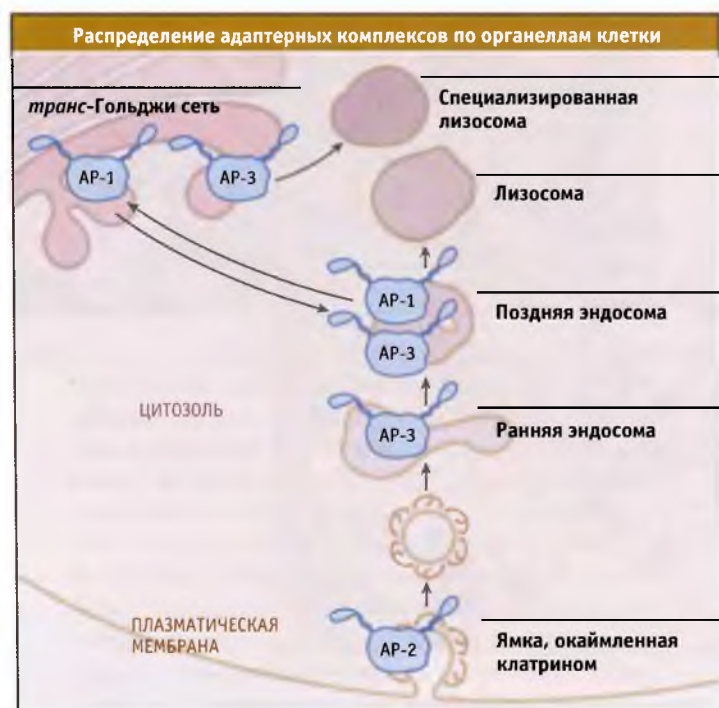
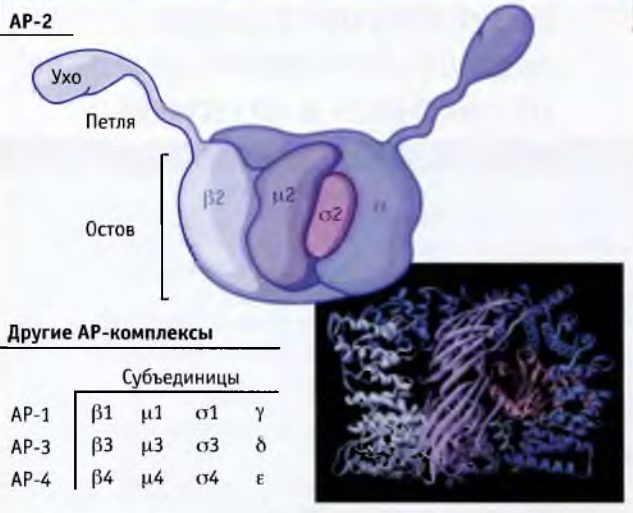


Рис. 4.41 Разные этапы мембранного транспорта происходят с участием различных адаптеров



В транспорте посредством окаймленных клатрином везикул участвуют адаптерные комплексы. Они представляют собой гетеротетраммерные структуры, состоящие из «остова», который связывается с сигнальными последовательностями в цитоплазматическом участке мембранных рецепторов, и подвижных петлевых областей, присоединенных к «ушам», которые связываются с клатрином. Представлена кристаллическая структура только для «остова». Из: *Cell*, vol. 109, Collins, B.M., et al. Molecular Architecture and Functional..., 523–535. © 2002 с разрешения Elsevier

Адаптеры представляют собой комплексы, состоящие из четырех разных субъединиц. Две большие субъединицы в каждом комплексе называются **адаптины**. Все представители семейства AP обладают одинаковой гетеротетраммерной структурой, представленной на РИС. 4.42. Общие представления о форме этих молекул были получены на основании данных электронной микроскопии и кристаллографических исследований очищенных белков. В основе структуры адаптеров лежит большой центральный домен, представляющий собой как бы основной «остов», от которого отходят две дополнительные структуры («уши»), присоединенные длинными «петлевыми» доменами. Все четыре субъединицы являются частями «остова», однако петлевые и дополнительные домены представляют собой продолжения двух цепей (в AP-1 это β- и γ-цепи; в AP-2 — α- и β-цепи; в AP-3 — β- и δ-цепи).

Различные области адаптерных комплексов обладают различными функциями. Петлевые и дополнительные домены содержат сайты связывания специфической области клатрина, которая называется β-пропеллерный домен. Этот домен дает возможность адаптерному комплексу взаимодействовать с другими белками, регулирующими образование клатриновых везикул.

Центральный домен AP-2 связывается с цитоплазматической частью рецепторов плазматической мембраны и таким образом скрепляет клатриновое покрытие с плазматической мембраной. При фосфорилировании AP-2 открывается его сайт связывания с рецептором.

При сборке окаймления специфическая киназа (AAK1) фосфорилирует AP-2. При фосфорилировании также открывается μ-субъединица AP-2, которая является участком адаптера, узнающим сигнал интернализации окаймленной ямки на рецепторе при эндоцитозе. При этом фосфорилировании открывается и сайт связывания для фосфоинозитидов. Эти отрицательно заряженные липиды плазматической мембраны играют роль дополнительных якорей для комплекса AP-2.

Как показано на РИС. 4.43, адаптеры специфически связываются с сигналами сортировки, расположенными в цитоплазматическом участке белков карго. Критическая функция, которую играют адаптеры в выборе карго для включения в окаймленные везикулы, лучше исследована для комплекса AP-2. Сигналы сортировки, которые связываются с μ-цепью AP-2, находятся только на белках, которые включаются в клатрин-окаймленные ямки, они называются сигналами сортировки эндоцитоза. AP-2, по-видимому, связывается с двумя различными типами сигналов сортировки, содержащими остаток тирозина и два остатка лейцина.

Тирозиновые сигналы были первыми мембранными сигналами сортировки, идентифицированными при анализе мутантных ЛНП-рецепторов, не способных включаться в клатрин-окаймленные ямки (см. EXP:4-0007). Мутации происходят в короткой последовательности, содержащей остаток тирозина, которая необходима и достаточна для захвата белка. Отсутствие интернализации мутантного рецептора показывает, что эта последовательность необходима для эндоцитоза. Химерный белок, содержащий последовательности сигналов сортировки и белка плазматической мембраны, который в норме не подвергается эндоцитозу, интернализировался с той же скоростью, что и нормальный ЛНП-рецептор. Этот эксперимент показывает, что тирозиновая последовательность достаточна для эндоцитоза.

В дальнейших экспериментах по получению мутантных ЛНП-рецепторов и исследованию их интернализации была продемонстрирована основополагающая роль тирозинового остатка, а также важность примыкающих

Основные сигналы сортировки и взаимодействия с адаптерами

СИГНАЛ СОРТИРОВКИ	СВЯЗЫВАЕТСЯ С:
Tyr-X-X-гидрофобный (YXXØ)	μ субъединица адаптерного комплекса
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	Прочие дополнительные белки (ARH, Dab2)
[Asp/Glu]-X-X-X-Leu-[Leu/Ile] (Дилейцин)	GGA, другие?
Моноубиквитин	Прочие дополнительные белки (Eps15)

РИС. 4.43. К числу известных сигналов сортировки при эндоцитозе относятся содержащие или тирозин- или два остатка лейцина. X представляет остаток любой аминокислоты

к нему остатков других аминокислот. На основании этих экспериментов были предложены две структуры последовательностей, ответственных за интернализацию: Тир-Х-Х-Ф и Асн-Фен-Х-Тир, где Х — любая аминокислота, а Ф — аминокислота с объемной гидрофобной боковой цепью. Однако в экспериментах на дрожжевых двойных гибридах было показано, что только первая последовательность непосредственно связывается с μ -цепью AP-2 (подробнее об использовании дрожжевых двойных гибридов см. **GNTC:4-0002**).

Последовательность, содержащая два остатка лейцина, определяет быстрый эндоцитоз ряда рецепторов. Эта последовательность может распознаваться σ -цепью, а не μ -цепью AP-2, однако их взаимодействие с последовательностью охарактеризовано не столь подробно и может происходить с участием еще одной субъединицы. Наряду с этим, сигналы, содержащие два остатка лейцина, участвуют в сортировке лизосомальных белков в *транс*-Гольджи сети (см. 4.17 В *транс*-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков).

Адаптерные комплексы, отличающиеся от группы AP, связывают некоторые рецепторы эндоцитоза с клатрином таким же образом, как комплексы AP. Например, β -аррестин связывается с сигнальной последовательностью, расположенной на цитоплазматической части β -адренергического рецептора, и с клатрином, что вызывает интернализацию рецептора в отсутствие AP-2. Аналогичным образом, белки из группы эпсина, такие как Eps15, связываются с тирозинкиназными рецепторами, например с рецептором эпидермального фактора роста, и также могут функционировать как адаптеры.

Существованием адаптеров объясняется одна из ключевых особенностей эндоцитоза — его селективность. В большинстве клеток животных происходит интенсивный конститутивный эндоцитоз, эквивалентный тому, как если бы каждые 1–2 ч с участием клатриновых везикул происходила полная интернализация всей плазматической мембраны. Однако захват специфических рецепторов происходит с полупериодом лишь в несколько минут. Таким образом, должен быть селективный захват этих рецепторов. Мы теперь знаем, что рецепторы избирательно концентрируются на сайтах эндоцитоза, когда их цитоплазматические участки специфически взаимодействуют с адаптерными комплексами, физически связывающими рецепторы с клатриновыми везикулами. Напротив, белки плазматической мембраны, которые не взаимодействуют с адаптерами, селективно не интернализируются. Эти белки интернализируются гораздо медленнее или вообще могут стерически исключаться из окаймленных ямок селективно включенными туда рецепторами, присутствующими в большей концентрации.

Наряду с этим, растворимые внеклеточные белки характеризуются низким уровнем включения в клатриновые везикулы, поскольку образование пустых везикул невозможно. Так как концентрация большинства лигандов во внеклеточной среде слишком низкая, интернализация их существенного количества возможна только при связывании с рецепторами.

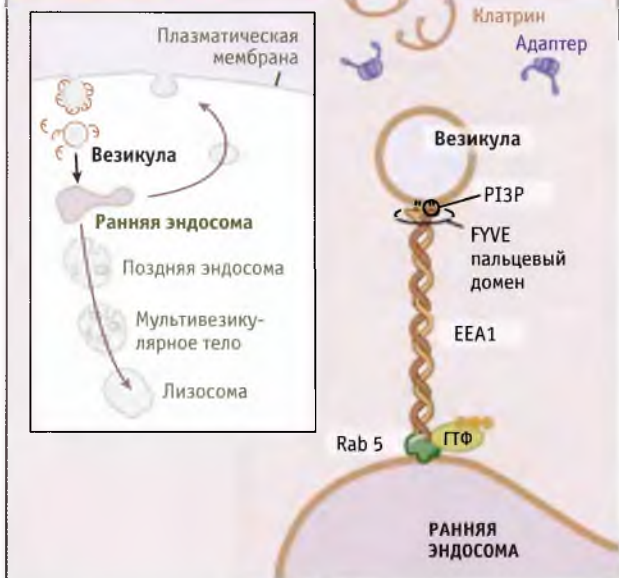
Некоторые рецепторы рециклируют из ранних эндосом, в то время как другие разрушаются в лизосомах

Основные положения

- Ранние эндосомы характеризуются умеренно кислой величиной pH внутренней среды и не содержат ферментов деградации. Поэтому интернализированные лиганды диссоциируют, но их рецепторы при этом не разрушаются
- При рециклировании многие рецепторы транспортируются и встраиваются в клеточную поверхность посредством транспортных везикул, которые отпочковываются от цилиндрических отростков ранних эндосом
- Диссоциированные лиганды переносятся из ранних эндосом в более кислые и богатые гидролазами поздние эндосомы и лизосомы, где разрушаются
- Рецепторы, которые не рециклировали, собираются в везикулы мультивезикулярных тел и транспортируются в поздние эндосомы и лизосомы для последующей деградации
- Рециклирующие эндосомы расположены поблизости от ядра, они содержат пул рециклирующих рецепторов, которые при необходимости могут быть быстро транспортированы к клеточной поверхности

Рецепторы, лиганды и внеклеточные жидкости, интернализованные при участии клатриновых везикул, попадают в ранние эндосомы, группу вакуолей снабженных цилиндрическими отростками. Ранние эндосомы расположены на периферии цитоплазмы. Доставка клатриновых везикул в ранние эндосомы происходит после отшнуровки везикулы и удаления клатринового покрытия, что происходит менее, чем через 1 мин после образования окаймленной везикулы (подробнее об отшнуровке и удалении клатрина см. 4.13 Обычно в эндоцитозе участвуют клатриновые везикулы). Удержание, причаливание и слияние уже неокймленных везикул с ранними эндосомами происходят таким же образом, как описано для экзоцитоза, и требуют участия Rab, белков удержания и SNARE (см. 4.11 Rab-ГТФазы и удерживающие белки представляют собой два типа белков, регулирующих адресование везикул). Однако в эндоцитозе участвуют другие представители этих групп белков. Вместо Rab-белка участвует его аналог Rab5, вместо t-SNARE — синтаксин 13, а в качестве удерживающего белка функционируют длинные спирализованные молекулы раннего антигена-1 эндосом (EEA1) (рис. 4.15). Белок EEA1 связывается с белком Rab5 (вместе с несколькими дополнительными белками), синтаксином 13 и фосфатидилинозитол-3-фосфатом (PI3P). Поскольку все эти белки находятся на разных мембранах, EEA1 эти мембраны связывает и облегчает слияние.

Как показано на рис. 4.15, возможны два пути дальнейшей утилизации интернализованных рецепторов и их лигандов. Первый путь предполагает, что интернализованные рецепторы доставляют лиганды в ранние эндосомы, в которых поддерживается значение pH 6,4–6,8. При таких умеренных значениях pH связь многих лигандов с рецепторами разрушается, и последние, вы-



Везикулы, окаймленные клатрином, освобождаются от клатрина и присоединяются к ранним эндосомам через EEA1, который связывается с фосфатидинозитол-3-фосфатом и Rab5

ходя из цилиндрических отростков вакуолярной части ранней эндосомы, направляются обратно к поверхности клетки. Диссоциированные лиганды с трудом проходят в эти отростки и накапливаются в люмене ранней эндосомы. Лиганды поступают в поздние эндосомы и лизосомы и разрушаются. Поскольку ранние эндосомы обладают более низкой концентрацией гидролитических ферментов и более высоким значением pH, чем лизосомы, они представляют собой удобное хранилище рецепторов для повторного использования с низким риском их деградации. Этот путь, например, используется для рецепторов питательных компонентов. Другой путь предполагает совместное продвижение интернализированных рецепторов и лигандов к поздним эндосомам и лизосомам, где они распадаются. Этот путь, например, используется для десенситизации рецепторов ростовых факторов.

Примером рециклизуемого рецептора является трансферриновый рецептор, переносящий в клетку железо в виде комплекса с белком трансферрином. Как показано на рис. 4.45, при тех значениях pH, которые характерны для люмена ранней эндосомы, происходит диссоциация атомов железа от трансферрина и их последующий транспорт в цитоплазму. Апотрансферрин (не ассоциированный с железом трансферрин) остается связанным со своим рецептором, и этот комплекс транспортируется в везикулах из эндосомальных отростков к клеточной поверхности. На поверхности клетки, при нейтральном pH, апотрансферрин отделяется от рецептора, который связывается с другой молекулой трансферрина, содержащей атом железа.

Еще один пример рециклизуемого рецептора представляет собой рецептор ЛНП, который связывает липопротеидные частицы, находящиеся в крови и доставляющие к клеткам холестерин. После того как ЛНП связался с рецептором и интернализовался, он высвобождается в люмен эндосомы, где распадается (рис. 4.45). Рецептор мигрирует через цилиндрический отросток эндосомы. Транспортная везикула отпочковывается от этого отростка, и происходит встраивание рецептора в плазматическую мембрану для повторного использования.

В отличие от трансферриновых и ЛНП-рецепторов, которые рециклируют в мембрану из ранних эндосом, другие рецепторные комплексы не обладают способностью к эффективной рециклизации и транспортируются в поздние эндосомы для деградации. К числу их относятся такие тирозинкиназные рецепторы, как рецептор эпидермального фактора роста (ЭФР) и инсулиновый рецептор, которые дают сигнал к делению клетки после связывания специфического лиганда или гормона. В таких случаях эндоцитоз комплекса лиганд-рецептор приводит к десенситизации рецепторов или к их удалению с поверхности клетки. Это делает клетку менее чувствительной к последующему воздействию лиганда. Нарушение механизма десенситизации ЭФР-рецептора может приводить к неограниченному клеточному росту и развитию рака. Как представлено на рис. 4.45, комплексы лиганда с рецептором ЭФР, предназначенные для деградации, собираются в плоскости мембраны и интернализуются в люмен эндосомы. При этом образуются мультивезикулярные тела (МВТ), которые представляют собой разновидность поздних эндосом, обладающих внутренними везикулами (см. 4.16 *При созревании ранние эндосомы превращаются в поздние эндосомы и лизосомы*).

Рецепторы и отщепившиеся от них лиганды «сортируются» в ранних эндосомах по геометрическому принципу. Большая часть площади поверхности ранних эндосом представлена цилиндрическими отростками, поскольку у них высокая величина отношения поверхности к объему. Наоборот, большая часть внутреннего объема ранней эндосомы представлена сферическим вакуолярным доменом. Таким образом, рецепторы связаны с цилиндрическими отростками просто потому, что на них приходится основная часть мембраны. Однако существуют данные о том, что после диссоциации лиганда рецепторы также могут селективно концентрироваться в цилиндрических отростках. Эти отростки отшнуровываются от ранних эндосом, образуя транспортные везикулы, в которых не связанные с лигандом рецепторы возвращаются назад в плазматическую мембрану для повторного использования.

Основной поток транспортных процессов, связанных с рециклизацией, происходит быстро и непосредственно из ранних эндосом. Он характеризуется полупериодом порядка несколько минут. Однако при-

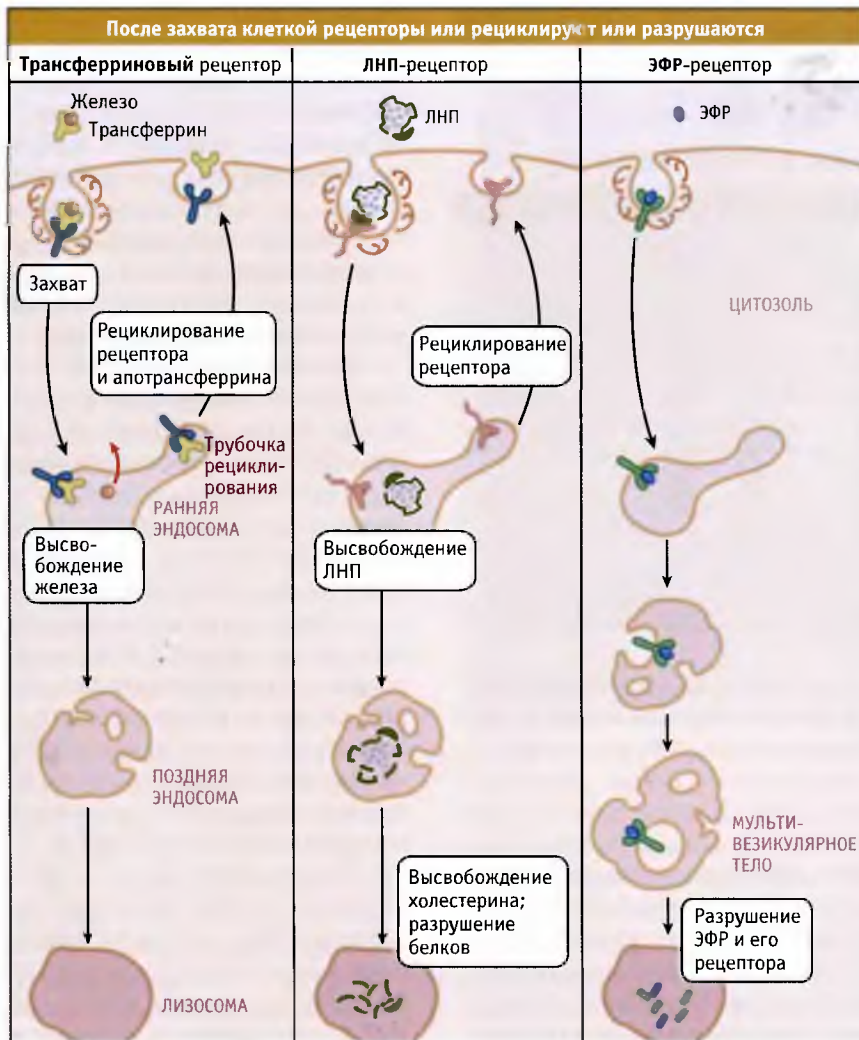


Рис. 4. Судьба рецептора после захвата клеткой; Цикл рецепторов трансферрина и липопро-
теинов низкой плотности (ЛНП) между плазматической мембраной и эндосомой. Рецептор
эпидермального фактора роста (ЭФР) разрушается в лизосомах

мерно 25% рецепторов попадают в **рециклирующие эндосомы** (см. рис. 4.46), в которых они могут находиться до 1 часа. В типичной клетке площадь поверхности мембран всех ранних и рециклирующих эндосом обычно составляет лишь около 25% от площади плазматической мембраны. Поскольку каждый час интернализуется до 100% поверхности плазматической мембраны, эффективная площадь поверхности ранних и рециклирующих эндосом должно обновляться несколько раз за час.

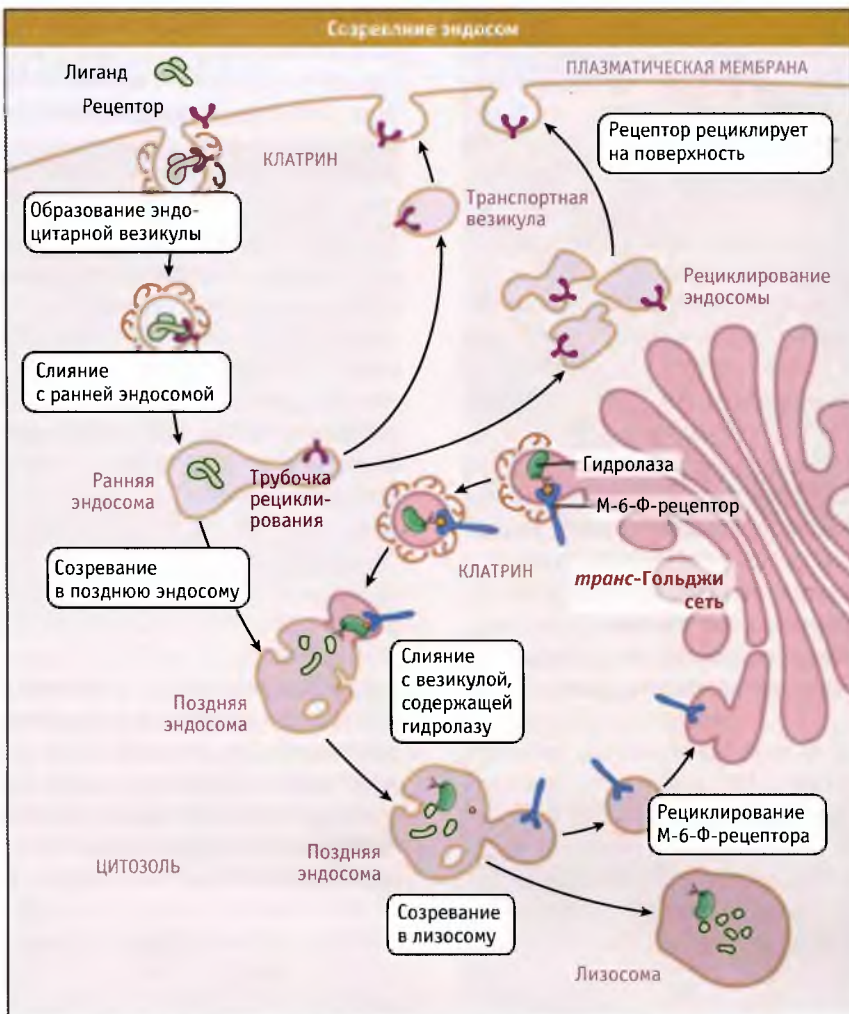
Основное количество диссоциировавших от рецепторов лигандов и макромолекул, неспецифически попавших в клетку из внеклеточной среды, исключаются из цилиндрических отростков ранних эндосом, поскольку они имеют очень маленький внутренний объем. Частично, однако, они выходят из клетки через транспортные везикулы, образующиеся из этих отростков. Тем не менее основная масса этих растворимых компонентов накапливается в вакуолярных областях ранних эндосом по мере созревания последних в поздние эндосомы.

4.16 При созревании ранние эндосомы превращаются в поздние эндосомы и лизосомы

Основные положения

- Транспорт метаболитов от ранних эндосом в поздние эндосомы и лизосомы происходит за счет «созревания»
- Белковые комплексы ESCRT участвуют в сортировке белков в везикулы, которые отпочковываются в люмен эндосом, образуя мультивезикулярные тела, обеспечивающие процесс протеолитической деградации

Превращение ранних эндосом в поздние эндосомы и в лизосомы происходит в ходе процесса созревания (см. рис. 4.16), который, по крайней мере, на первый взгляд напоминает созревание цистерн аппарата Гольджи (см. рис. 4.9). Существуют две распространенные модели, описывающие прямой транспорт белков через аппарат Гольджи). Вероятно, транспортные везикулы не играют



По мере созревания ранних эндосом в поздние, транспортные везикулы доставляют к ним компоненты и рециклируют из них рецепторы

существенной роли в движении белков между эндосомами. Вместо этого потеря рецепторов за счет их возврата в плазматическую мембрану превращает ранние эндосомы в поздние эндосомы, содержащие диссоциированные лиганды, такие как ЛНП (см. 4.15 *Некоторые рецепторы рециклируют из ранних эндосом, в то время как другие разрушаются в лизосомах*). Транспортные везикулы, содержащие вновь синтезированные ферменты лизосом и мембранные компоненты, происходят из *транс*-Гольджи сети и сливаются с поздними эндосомами (см. 4.17 *В транс-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков*). В ходе этого процесса поздние эндосомы превращаются в лизосомы, и происходит переваривание диссоциированных лигандов.

Образование цилиндрических отростков рециклизации ведет к селективному и постепенному удалению рецепторов из ранних эндосом. Остальные компоненты остаются в везикулярной части ранней эндосомы, которая перемещается в центр клетки вдоль микротрубочек. В конце концов везикулы накапливаются в перинукле-

арной части цитоплазмы, примыкающей к центру организации микротрубочек. Одна из причин такого движения везикул заключается в необходимости ограничить их дальнейшее слияние с новыми клатриновыми везикулами, которые отпочковываются от плазматической мембраны. Однако их слияние с везикулами, которые содержат лизосомальные компоненты и произошли из *транс*-Гольджи сети, может продолжаться. Таким образом, органеллы, принимающие участие в эндоцитозе, постепенно становятся более «лизосомоподобными» по составу содержащихся в них ферментов, H^+ -ионов и мембранных компонентов, таких как v -АТФазы. Это превращение происходит постепенно, с образованием поздних эндосом как промежуточных структур между ранними эндосомами и лизосомами.

Характерная особенность процесса созревания ранних эндосом заключается в образовании **мультивезикулярных тел (МВТ)**. В компартментах, принимающих участие на поздних этапах эндоцитоза (поздние эндосомы и лизосомы), часто присутствуют небольшие везикулярные включения, которые образуются в резуль-

тате инвагинации мембраны (рис. 4.47). Таким образом, нередко поздние эндосомы и лизосомы называют MBT. Функциональная роль этих структур особенно отчетливо проявляется в случае семейства рецепторов тирозинкиназ, например инсулинового рецептора и рецептора эпидермального фактора роста (ЭФР), которые после захвата лиганда деградируют (см. 4.15 *Некоторые рецепторы рециклируют из ранних эндосом, в то время как другие разрушаются в лизосомах*).

Например, десенситизация ЭФР-рецептора происходит потому, что после попадания в ранние эндосомы рецептор селективно включается в участки мембран, которые находятся внутри эндосомы (см. рис. 4.47). Мембраны внутренних везикул по своим свойствам отличаются от мембран, ограничивающих эндосомы, и таким образом, рецепторы не попадают в цилиндрические отростки для последующего рециклирования. Вместо этого, совместно с диссоциированными лигандами и другим содержимым ранних эндосом, они поступают в поздние эндосомы и лизосомы, где внутренние везикулы вместе с накопленными рецепторами деградируют под действием липаз (ферментов, разрушающих липиды) и протеаз.

Исследования, проведенные на мутантах дрожжей, дефектных по образованию MBT, позволили выяснить механизм их образования и отбора белков для мембран внутренних везикул. По-видимому, аналогичный механизм существует и для клеток млекопитающих. Характерной его чертой является метка подлежащих десенситизации рецепторов с помощью ковалентного присоединения

к ним убиквитина, небольшого белка, присутствующего в цитоплазме. Молекула убиквитина присоединяется к рецептору с помощью специфических лигаз. Одна из таких лигаз представлена белком Cbl, который кодируется протоонкогеном и содержится в цитозоле. Этот белок катализирует присоединение одного убиквитина к рецептору ЭФР. Дефект в белке Cbl приводит к нарушению процесса десенситизации ЭФР-рецептора и к неконтролируемому росту клеток. Эти моноубиквитинированные белки узнаются комплексом специальных белков, который обеспечивает их селективный захват во внутренние везикулы, а также участвует в образовании самих везикул. Поскольку эти события начинаются на уровне ранних эндосом, образование MBT служит этапом на пути созревания ранних эндосом в поздние эндосомы и лизосомы. Исследования образования MBT у дрожжей и в клетках животных показали, что один из белков цитозоля (Hrs) узнает остатки убиквитина и активирует три дополнительных набора белков, которые называются комплексами ESCRT. Эти комплексы удаляют убиквитин, обеспечивая его последующее использование, и, что более важно, способствуют образованию инвагинирующей внутрь мембранной везикулы с карго, с которого снят убиквитин. Важно отметить, что направленность формирования везикул при образовании MBT имеет противоположный характер, по сравнению с направленностью всех известных на сегодня событий мембранного перемещения. Это объясняется тем, что целью образования MBT служит выведение отобранных мембранных компонентов из транспортного пути, гарантирующее их последующее переваривание в лизосомах.

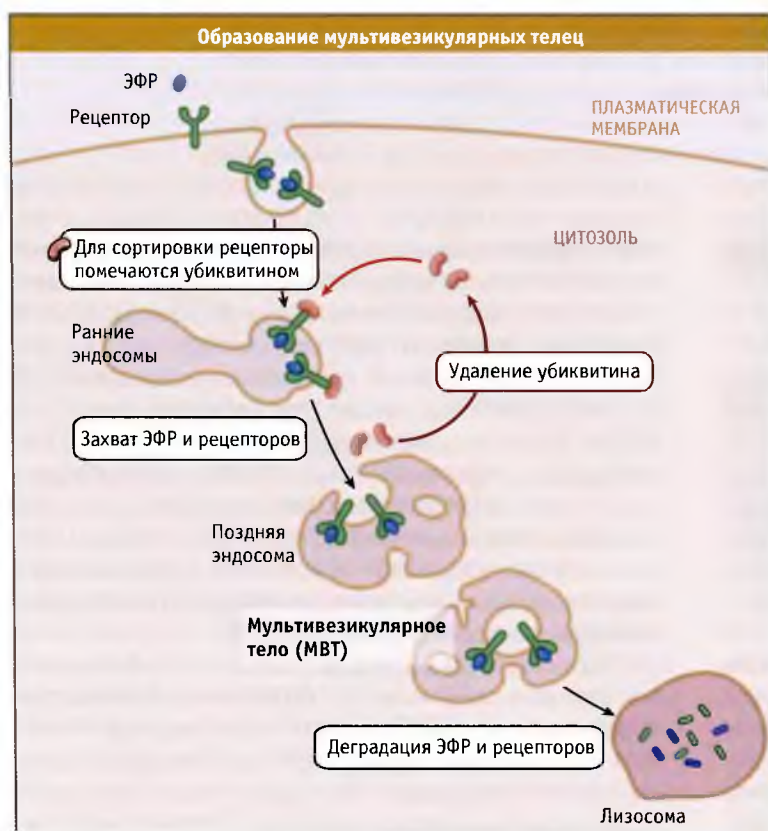


Рис. 4.47. Деградация белков с участием убиквитина происходит в мультивезикулярных тельцах, представляющих собой поздние эндосомальные компартменты на пути эндоцитоза

4.17 В транс-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков

Основные положения

- Все вновь синтезированные мембранные и секреторные белки следуют по одному транспортному пути до достижения транс-Гольджи сети, где они распределяются в различные транспортные везикулы, в соответствии с местом своего назначения
- Клатриновые везикулы транспортируют лизосомальные белки из транс-Гольджи сети в созревающие эндосомы
- В аппарате Гольджи к растворимым ферментам, предназначенным для лизосом, ковалентно присоединяется манноза-6-фосфат. Из транс-Гольджи сети эти ферменты выходят на путь эндоцитоза при участии рецептора манноза-6-фосфата
- Белки лизосомальных мембран транспортируются из транс-Гольджи сети в созревающие эндосомы, однако для этого используются другие сигналы, чем для растворимых ферментов лизосом

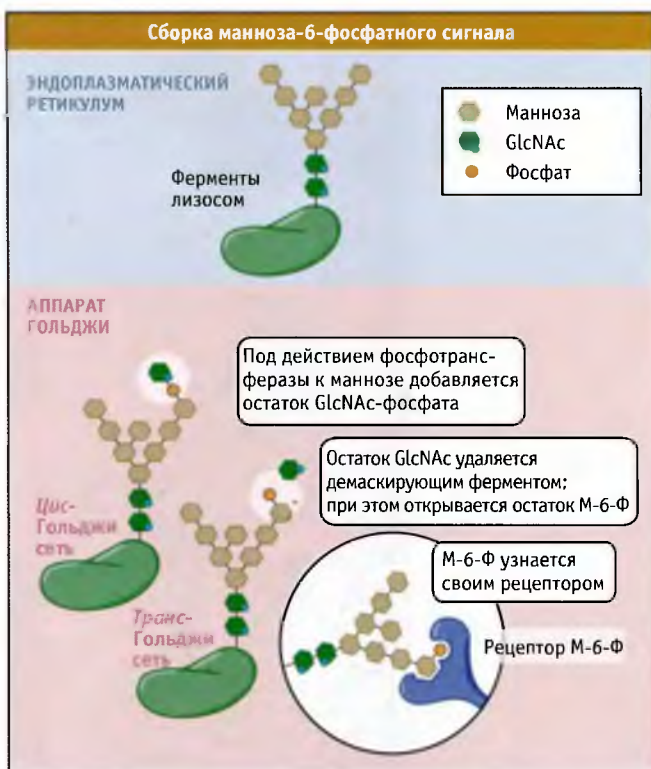
Так же как и другие белки, предназначенные для перемещения по механизму эндо- и экзоцитоза, белки лизосом синтезируются в ЭПР. Растворимые ферменты деградации и трансмембранные белки лизосом транспортируются из ЭПР через аппарат Гольджи в транс-Гольджи сеть (рис. 4.4), где они отделяются от белков клеточной поверхности и от белков другой внутриклеточной локализации.

В клетках млекопитающих для сортировки растворимых ферментов лизосом в транс-Гольджи сети необходим сигнал, отличающийся от сигналов сортировки цитоплазматических белков, которые рассматривались до сих пор. В данном случае сигнал лизосомальной сортировки называется маннозо-6-фосфатный сигнал (М-6-Ф). Он образуется в люмене при модификации олигосахаридов, ковалентно присоединенных к лизосомальным ферментам. Этот сигнал был обнаружен при изучении некоторых заболеваний, связанных с нарушениями функционирования лизосом, например при болезни I-клеток (также называемой муколипидоз II типа). В лизосомах больных, страдающих этим заболеванием, отсутствуют необходимые ферменты, и вместо поступления в лизосомы ферменты экскретируются во внеклеточное пространство. Поэтому в лизосомах накапливаются непереваренные белки, образующие характерные внутриклеточные включения (называемые «I» при болезни I-клеток). Аналогичные включения обнаруживаются и при других болезнях накопления, например при болезни Тей-Сакса, при которой в клетке отсутствует фермент гексозаминидаза А ().

Сигнал М-6-Ф образуется в результате фосфорилирования N-терминального маннозного остатка. Как показано на , N-ацетилглюкозаминфосфат (GlcNAc-P) добавляется к C-6-гидроксильной группе избранного терминального маннозного остатка при участии фермента фосфотрансферазы (при болезни I-клеток большинство ферментов лизосом не получают М-6-Ф сигнала, поскольку фосфотрансфераза у них отсутствует). Скорее



Нейрон головного мозга пациента с болезнью Тей-Сакса. Отмечается много аномальных лизосом, одна из которых показана при большом увеличении. Фотография воспроизведена с разрешения журнала *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*



Сборка молекул сигнала сортировки с участием манноза-6-фосфатного рецептора. Олигосахариды с высоким содержанием маннозы, связанные с ферментами лизосом, подвергаются модификации в ранних цистернах аппарата Гольджи при добавлении к ним N-ацетилглюкозамин фосфата. Остаток N-ацетилглюкозамина удаляется в последней из цистерн Гольджи. При этом демаскируется остаток манноза-6-фосфата, который узнается рецепторами М-6-Ф

всего, остаток GlcNAc-Р добавляется на ранних этапах нахождения белка в аппарате Гольджи. Затем специальный фермент, который присутствует в *транс*-Гольджи сети, удаляет остаток GlcNAc, открывая группу М-6-Ф. Таким образом, сигнал сортировки появляется только тогда, когда начинается сам процесс сортировки.

Конечно, для многих белков, транспортируемых по механизму экзоцитоза, характерно присутствие олигосахаридов с высоким содержанием маннозы, причем эти белки не являются ферментами лизосом. Поэтому, наряду с М-6-Ф сигналом сортировки, также должна существовать другая информация, специфичная только для лизосомальных ферментов. Эта информация не заложена в линейной последовательности аминокислот, как в случае многих других сигналов сортировки, а находится в определенном участке молекулы лизосомального фермента. Вначале, до модификации олигосахаридного остатка, фосфотрансфераза должна узнать этот участок.

М-6-Ф сигнал сортировки узнается рецепторами М-6-Ф (существует два типа этих рецепторов), которые локализованы в *транс*-Гольджи сети. Цитоплазматические участки обоих типов рецепторов содержат сигналы сор-

тировки, обеспечивающие транспорт в эндосомы. Один из них представляет собой тирозиновый сигнал, он может узнаваться AP-1 клатриновым адаптерным комплексом, расположенным в *транс*-Гольджи сети (подробнее об адаптерах см. 4.14 Адаптерные комплексы связывают клатрин и трансмембранные белки карго).

Другой сигнал, расположенный на цитоплазматической части М-6-Ф рецептора, содержит два остатка лейцина, находящихся в окружении кислых аминокислот. Этот сигнал отличается от таких же сигналов, обеспечивающих захват белков с клеточной поверхности, и взаимодействует с GGA-белком (Рис. 4.10). GGA относится к семейству белков, названных так потому, что они локализуются в аппарате Гольджи, содержат последовательности гомологичные дополнительному домену γ -адаптина, и связываются с фактором АДФ-рибозилирования. Предполагается, что белки GGA являются упаковочными молекулами, которые помогают загружать М-6-Ф-рецепторы, связанные с лизосомальными ферментами, в клатриновые везикулы, отпочковывающиеся от *транс*-Гольджи сети. По-видимому, GGA передают М-6-Ф-рецептор и клатрин на комплекс AP-1, присутствующий в образовавшейся везикуле.

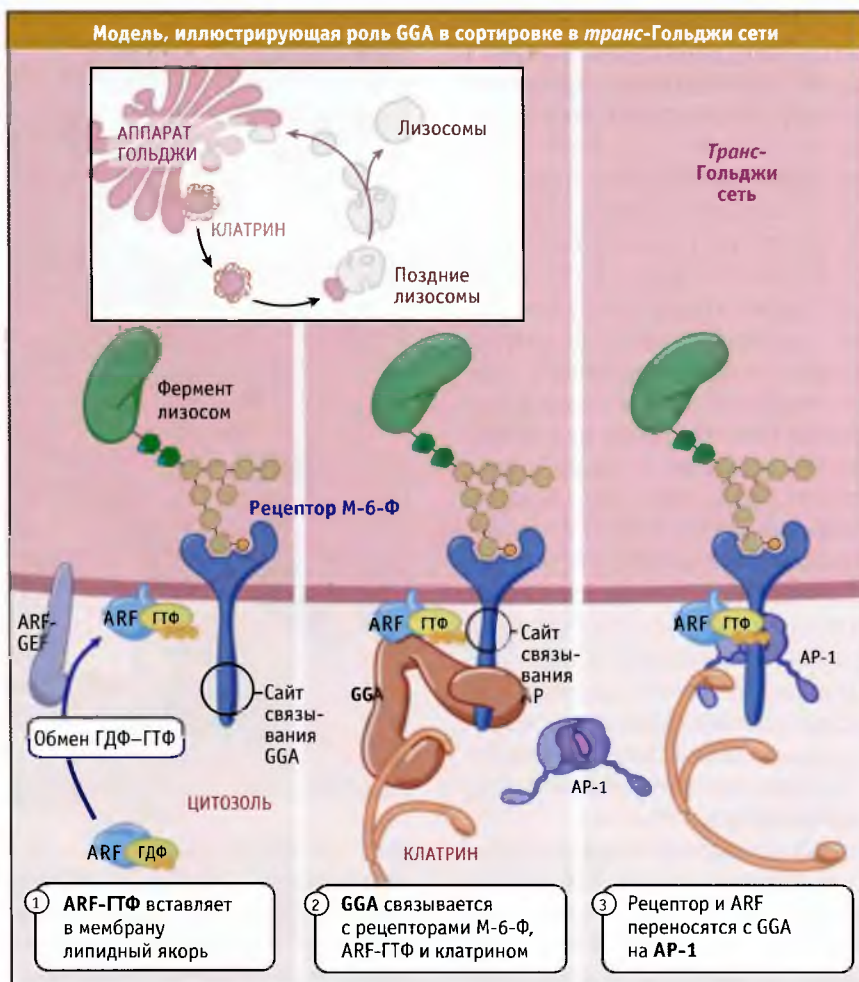
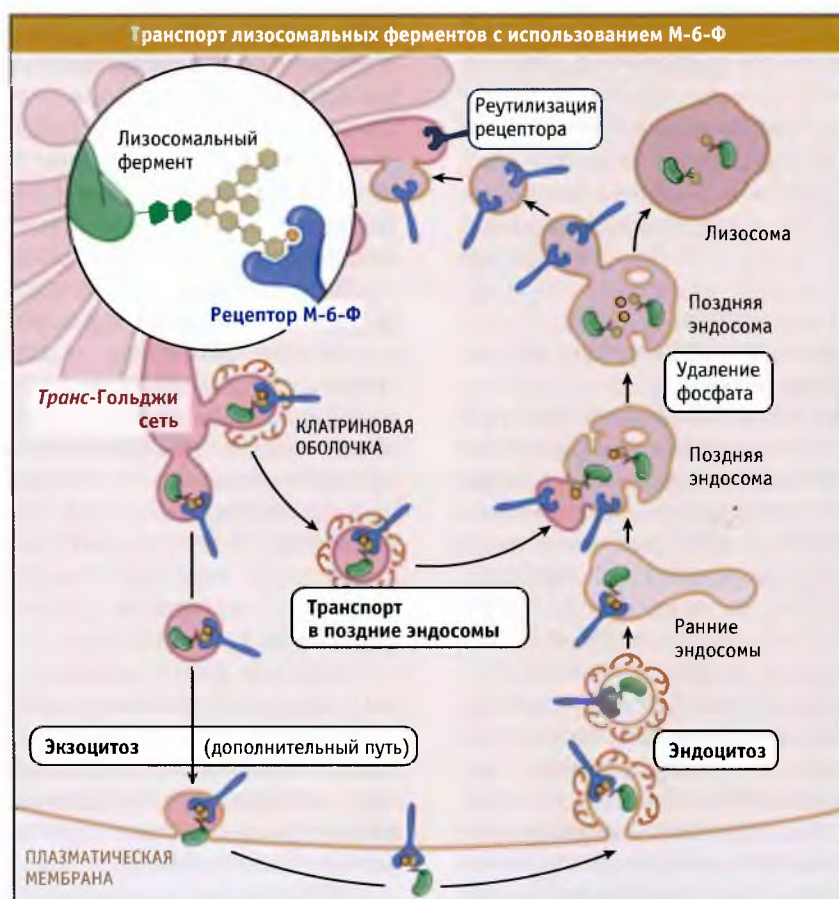


РИС. 4.10 При образовании в *транс*-Гольджи сети везикул, покрытых клатрином, GGA может переносить рецепторы манноза-6-фосфата и клатрин на AP-1 адаптерные комплексы

Как показано на рисунке, образующиеся в *транс*-Гольджи сети клатриновые везикулы, вероятно, направляются в поздние эндосомы, где происходит диссоциация М-6-Ф-рецептора и связанного с ним фермента, подобно тому, как это осуществляется для комплекса рецептор-лиганд при эндоцитозе. Доставка фермента из *транс*-Гольджи сети в ранние эндосомы также может происходить более редким путем — через клеточную поверхность. Эндосомы обладают более кислой средой, чем *транс*-Гольджи сеть, и при кислых рН ферменты отщепляются от М-6-Ф-рецепторов, что приводит к накоплению свободных ферментов в люмене эндосом. Затем М-6-Ф-рецепторы рециклируют из эндосом в *транс*-Гольджи сеть и повторно участвуют в транспортном процессе. При рециклировании используется другой адаптерный белок, ТР47, который узнает другой сигнал сортировки (содержащий фенилаланин/триптофан или остатки гидрофобных аминокислот) в цитоплазматическом участке М-6-Ф-рецептора. ТР47 отличается от других известных адаптеров тем, что он концентрируется в образующихся везикулах, которые возвращают М-6-Ф-рецепторы в *транс*-Гольджи сеть, белок Rab9. Rab9 участвует в дальнейшем адресовании этих везикул.

Транспорт растворимых лизосомальных ферментов в эндосомы по механизму экзоцитоза представляет собой часть обычного процесса их созревания. Пока лизосомальные ферменты не достигнут конечного места назначения, они защищены от воздействия ферментов деградации. Существуют, по крайней мере, три механизма, которые обеспечивают активность ферментов только в определенных компартментах:

- Лизосомальные ферменты не проявляют активности при рН, характерном для ЭПР и аппарата Гольджи, и активируются только при кислых значениях рН, свойственных эндосомам и лизосомам. Таким образом, кислое значение рН в эндосомах не только благоприятствует диссоциации М-6-Ф-рецепторов, но и существенно для активации фермента.
- Некоторые лизосомальные ферменты образуются в ЭПР в виде проферментов, в N-терминальной области которых находится короткая последовательность, ингибирующая их активность. Ингибирование сохраняется до тех пор, пока последовательность не отщепится в эндосомах. Нередко отщепление носит «аутокаталитический» характер, т. е. определенная



Манноза-6-фосфатный сигнал сортировки используется для транспорта ферментов лизосом из *транс*-Гольджи сети на путь эндоцитоза. Основной путь представляет собой прямой перенос из *транс*-Гольджи сети в поздние эндосомы. Существует также дополнительный путь через клеточную поверхность

Поляризованные эпителиальные клетки транспортируют белки к апикальной и базолатеральной мембранам

Основные положения

- В поляризованных клетках плазматическая мембрана состоит из отдельных доменов со специфическими наборами белков, и поэтому в этих клетках происходит дополнительная сортировка белков
- В зависимости от типа клеток, сортировка белков поверхности в поляризованных клетках может происходить в *транс*-Гольджи сети, эндосомах или в одном из доменов плазматической мембраны
- Процесс сортировки белков в поляризованных клетках происходит при участии специальных адаптерных комплексов, а также, вероятно, липидных рафтов (микродоменов) и лектинов

протеаза активируется самостоятельно, при достижении органеллы с достаточно низкой величиной pH.

- Некоторые активирующие ферменты представляют собой фосфатазы, которые расщепляют М-6-Ф-сигналы сортировки. Удаление этих сигналов помогает ограничить выход в *транс*-Гольджи сеть активных ферментов лизосом за счет предотвращения их связывания с рециклирующими М-6-Ф-рецепторами.

Все эти события созревания начинаются на уровне поздних эндосом, при вступлении фермента на путь эндоцитоза. При последующем продвижении ферментов в лизосомы скорость протекания и эффективность этих событий увеличиваются. Начиная от ранних эндосом и до лизосом происходит постепенное снижение величины pH: от 6,5–6,8 до 4,5–5,0. Поскольку для большинства лизосомальных ферментов оптимальное значение pH составляет <5, то по мере продвижения по пути эндоцитоза они постепенно увеличивают активность.

Резидентные белки мембран лизосом, например лизосомальные гликопротеины (lgps) и лизосомальные мембранные белки (lamps), транспортируются из *транс*-Гольджи сети по механизму, независимому от М-6-Ф. В цитоплазматическом домене этих белков присутствуют тирозин-содержащие сигналы, которые определяют их взаимодействие с одним или несколькими адаптерными комплексами (AP-1 или AP-3) или с GGA-белками. В эндосомах эти белки доставляются из *транс*-Гольджи сети, вероятно, посредством клатриновых везикул, и накапливаются в лизосомах. В отличие от М-6-Ф-рецепторов они не рециклируют в *транс*-Гольджи сети, поскольку, вероятно, не способны реагировать с TIR47. Хотя большинство мембранных белков подвергаются в лизосомах деградации, белки lgr и lamp устойчивы к протеолизу. Они содержат много гликозильных групп, и считается, что последние либо образуют некое защитное покрытие, либо обладают плотной упаковкой, которая обеспечивает устойчивость к ферментам.

Сортировка лизосомальных белков у дрожжей и в клетках млекопитающих происходит различным образом. У дрожжей органеллы, эквивалентные лизосомам, называются вакуоли. В них также содержится набор растворимых гидролитических ферментов, которые поступают туда с участием мембранных рецепторов. Однако транспорт из *транс*-Гольджи сети в вакуоли не требует узнавания маркера М-6-Ф и происходит без участия М-6-Ф рецепторов, для которых у дрожжей не существует гомологов. Природа сигналов, которые обеспечивают адресование растворимых ферментов в дрожжевые вакуоли, неизвестна, однако не исключено, что ферменты связываются с рецептором на мембране. Генетический анализ позволяет предполагать, что этот рецептор может взаимодействовать с GGA-белками, что свидетельствует о консерватизме, свойственном стратегии сортировки. Подобно белкам мембран лизосом у животных, транспорт белков мембран вакуолей из аппарата Гольджи происходит у дрожжей с участием клатриновых адаптеров (например AP-3). Однако у дрожжей AP-3 может взаимодействовать с сигналом, содержащим остатки двух лейцинов, а не тирозина.

Плазматические мембраны большинства клеток многоклеточных организмов состоят из множества отдельных доменов, расположенных в непрерывном липидном бислое и различающихся между собой по биохимическим, структурным и функциональным характеристикам. Такие клетки считаются «поляризованными». Наиболее типичными примерами таких клеток являются эпителиальные клетки и нейроны. Эпителиальные клетки выстилают все полости тела (например, кишечник, почки, воздухоносные пути) и, таким образом, обладают двумя поверхностями. Апикальный домен обращен в люмен органа, а базолатеральный граничит с кровью или с прилегающими клетками (рис. 4.15).

В эпителиальных клетках, специализированных на поглощении питательных веществ (например, клетки эпителия кишечника), на плазматической мембране апикального домена существуют небольшие выросты, которые называются микроворсинки. Они увеличивают общую поверхность клетки, что способствует увеличению поглощения ею питательных веществ. Апикальная плазматическая мембрана в таких клетках обогащена мембранными белками, которые способствуют захвату клеткой таких питательных компонентов, как аминокислоты, сахара и другие молекулы. Также мембрана богата уникальными гликолипидами.

Напротив, базолатеральный домен содержит большинство мембранных белков (например, ЛНП-рецептор и ЭФР-рецептор) и липидов, находящихся в плазматической мембране неполяризованных клеток. Наряду с этим, переносчики, находящиеся в базолатеральном домене, транспортируют питательные компоненты из клетки в плазму крови.

Межклеточные контактные комплексы, состоящие из плотных контактов, адгезивных контактов и десмосом, разграничивают апикальные и базолатеральные домены (см. 15.16 *Плотные контакты создают между клетками барьеры, обладающие селективной проницаемостью*). Одна из функций этих комплексов состоит в том, чтобы

предотвратить возможность латеральной диффузии компонентов апикальной мембраны в базолатеральный домен, и наоборот. Поэтому липиды и белки должны направляться в соответствующий домен. Транспорт по секреторному механизму и по пути эндоцитоза носит полярized характер. Это обеспечивает движение компонентов апикальной и базолатеральной мембран в соответствующих направлениях. Транспорт в базолатеральный домен происходит под действием адресных сигналов, отличающихся от сигналов для апикального транспорта.

В зависимости от того, предназначены вновь образованные мембранные белки для апикальной или базолатеральной поверхности, в *транс*-Гольджи сети они сортируются по разным типам везикул (рис. 4.52). Для многих типов полярized эпителиальных клеток процесс базолатерального транспорта исследован хорошо. В цитоплазматических доменах большинства базолатеральных белков присутствуют сигналы, содержащие остаток тирозина или два остатка лейцина. Эти остатки узнаются адаптерными комплексами таким же образом, как это происходит для белков, которые транспортируются по механизму эндоцитоза или направляются в лизосомы (см. 4.14 Адаптерные комплексы связывают клатрин и трансмембранные белки карго и 4.17. В *транс*-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков). Последовательности, содержащие и иногда не содержащие остатки тирозина, узнаются в *транс*-Гольджи сети с участием AP-1B, специфичной для эпителиальных клеток изоформы клатринового адаптерного комплекса AP-1. AP-1B связывается с клатрином, образуя транспортную везикулу, ориентированную в базолатеральном направлении. Этот комплекс отличается от широко распространенного комплекса AP-1A только структурой μ -цепи. Субъединицы μ 1A и μ 1B обладают на 80% одинаковой структурой, однако связывают разные типы сигналов. Причина этих различий не установлена.

Цитоплазматические домены белков, предназначенных для апикальной плазматической мембраны, не содержат специфических сигналов. Вместо этого в домене люмена они содержат критические N- или O-сахарные остатки или имеют особый тип мембранного якорного домена, обеспечивающего их включение в апикально направляющиеся транспортные везикулы. Одним из примеров такого мембранного якоря является GPI, который добавляется к некоторым белкам в эндоплазматическом ретикулуме (см. 3.13 К некоторым транслоцированным белкам добавляется гликолипидная группа ГФИ). Такие везикулы, транспортируемые в апикальном направлении, часто содержат уникальный липидный микродомен, называемый липидный рафт, который накапливает специфические белки, обеспечивая, таким образом, их селективное включение в апикальные везикулы (рис. 4.52). Вероятно, этот же механизм в определенной степени позволяет разделять липиды, так что сложные гликолипиды, обнаруженные на апикальной, но не на базолатеральной поверхности эпителиальных клеток, также селективно включаются в эти везикулы.

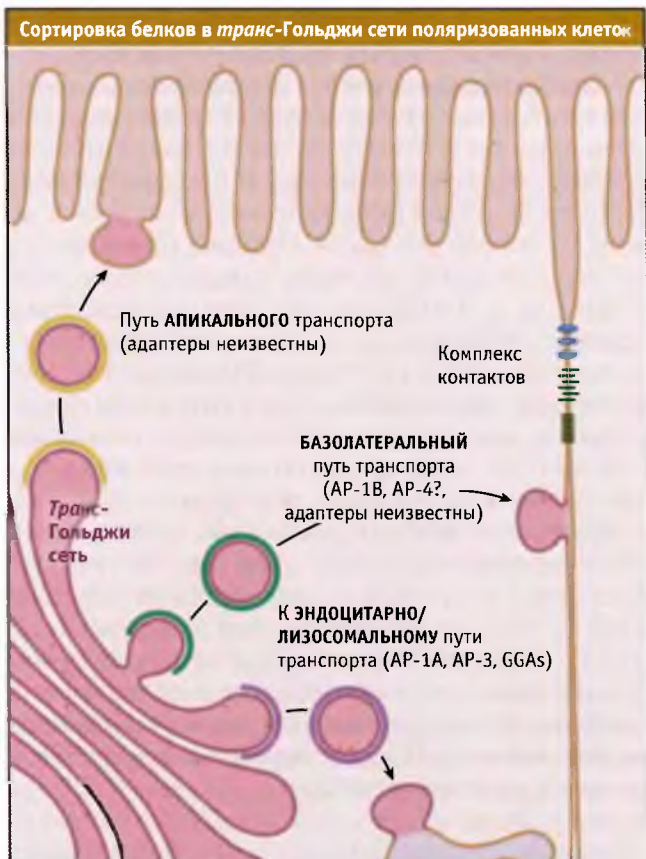
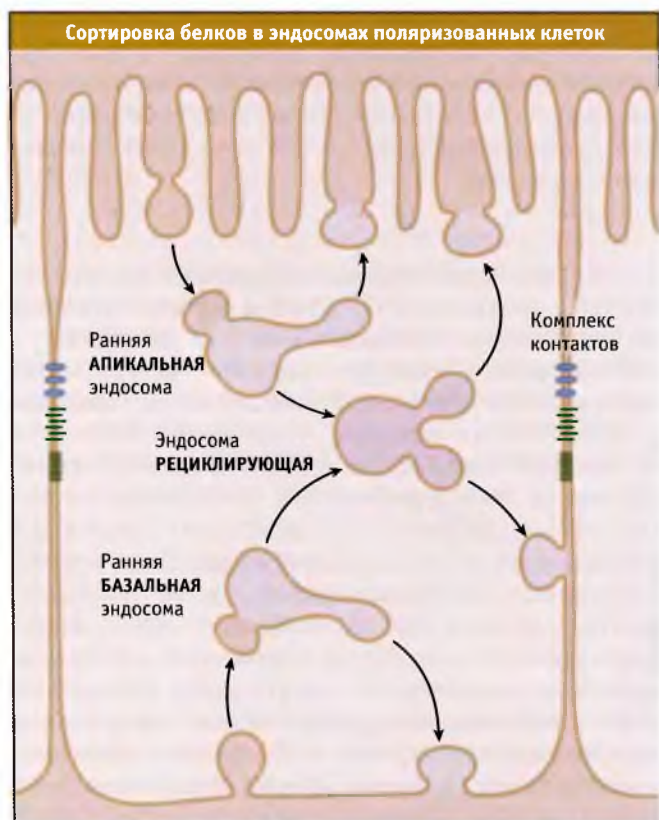


РИС. 4.52. Три типа сортировки, происходящего в *транс*-Гольджи сети полярized клеток эпителия. Белки сортируются для эндоцитоза и для транспорта через апикальную и базолатеральную мембраны. Для каждого пути используются свои адаптерные комплексы

Для некоторых мембранных белков, в которых отсутствует информация об адресе и которые транспортируются из *транс*-Гольджи сети и в апикальных, и базолатеральных везикулах, существует третий тип полярized адресования. Однако после попадания в плазматическую мембрану эти белки еще могут стать полярized. Это происходит в процессе домен специфического удержания, при котором мембранный белок взаимодействует с предварительно полярized цитоскелетом. Последний содержит белки, которые собираются на мембранных доменах в ответ, например, на такие сигналы, как прикрепление к другой клетке. Часто такой тип цитоскелета собирается в области межклеточных контактов, что обеспечивает асимметричность накопления мембранных белков. (Подробнее о межклеточных контактах см. 15.16 Плотные контакты создают между клетками барьеры, обладающие селективной проницаемостью.) Мембранные белки, которые взаимодействуют с таким цитоскелетом, стабилизируются в соответствующем мембранном домене. Однако мембранные белки, попавшие в домен, который не обладает подходящим цитоскелетом, интернализируются путем эндоцитоза, деградируют в лизосомах, или рециклируют.

В последнем случае они получают еще одну возможность попасть в домен с соответствующим цитоскелетом.

Сортировка апикальных и базолатеральных белков также осуществляется в эндосомах. Поскольку эндоцитоз происходит как с апикальной, так и с базолатеральной поверхности эпителиальных клеток, интернализованные белки за счет рециклирования должны вернуться в те домены, из которых они вышли. Очевидно, ранние эндосомы могут вести себя как *транс*-Гольджи сеть, сортируя апикальные и базолатеральные белки в определенные везикулы рециклирования, которые направляются или к апикальной, или к базолатеральной мембране (рис. 4.19). Фактически при сортировке по признаку полярности в эндосомах используются те же сигналы, что и в *транс*-Гольджи сети. Чтобы при продолжающемся эндоцитозе эпителиальные клетки могли поддерживать полярность плазматической мембраны, необходимо поляризованное рециклирование содержимого эндосом. Фактически в эндосомах, и в частности, в рециклирующих эндосомах, может происходить биосинтетическая сортировка. Таким образом, в качестве промежуточных звеньев, на пути от *транс*-Гольджи сети к базолатеральной плазматической мембране, могут использоваться рециклирующие эндосомы. Это, вероятно, объясняет, почему оба пути используют один и тот же набор сигналов.



Молекулы, интернализованные из апикальной или базолатеральной мембран, могут вернуться обратно в прежний домен мембраны прямым путем с участием ранних эндосом или направиться в другой домен при участии рециклирующих эндосом.

4.19 Некоторые клетки запасают белки для последующей секреции

Основные положения

- Некоторые молекулы карго хранятся в секреторных гранулах, которые сливаются с плазматической мембраной и высвобождают содержимое только после стимуляции
- Хранение белков для регулируемой секреции часто сопровождается процессом конденсации, при котором молекулы карго образуют ассоциаты и концентрируются для последующей доставки во внеклеточную среду
- Конденсация белков при регулируемой секреции часто начинается в эндоплазматическом ретикулуме, продолжается в аппарате Гольджи и завершается в вакуолях, которые в конце концов образуют секреторные гранулы
- Конденсация на всех стадиях экзоцитоза сопровождается селективным возвращением мембран гранул
- Слияние синаптических везикул с плазматической мембраной происходит с участием белков SNARE, но регулируется зависимыми от кальция белками, в частности синаптотагмином

Многие клетки эукариот могут сохранять секреторные белки во внутриклеточных везикулах, и они выходят во внеклеточное пространство только после стимуляции клетки соответствующим сигналом (секретогомом). Этот процесс называется регулируемой секрецией, он обеспечивает быструю доставку больших количеств метаболитов, не используя длительный путь синтеза *de novo*. По такому пути могут создаваться запасы различных белков, от нейромедиаторов до гормонов и пищеварительных ферментов. Соответствующие везикулы называются **секреторные гранулы**, они образуются в *транс*-Гольджи сети при созревании.

Первые подробные исследования процесса регулируемой секреции были выполнены на ацинарных клетках поджелудочной железы, синтезирующих секреторные белки (главным образом пищеварительные ферменты желудка и тонкого кишечника). Эти белки образуются в таких больших количествах, что составляют основную часть белков, вырабатываемых этими клетками (см. 4.2 Обзор путей экзоцитоза). Как представлено на рис. 4.20, упаковка секреторных белков начинается на ранних этапах секреторного пути, после их выхода из ЭПР. Вероятно, эти белки не обладают сигналом экспорта, и их концентрация в ЭПР такая же, как и в СОPII-везикулах. Однако после слияния СОPII-везикул с образованием везикулярных тубулярных кластеров (ВТК) везикулы СОPI начинают процесс возвращения компонентов. Однако при этом каким-то образом из образующихся СОPI-везикул исключаются секреторные белки. В результате концентрация секреторных белков в ВТК увеличивается. Секреторные белки могут исключаться благодаря наличию общих для них свойств, которые вызывают их ассоциацию друг с другом, и при этом исключают из комплекса другие типы белков. Эти белковые комплексы могут быть слишком велики, чтобы войти в СОPI везикулы, которые осуществляют обратный транспорт.

Конденсация начинается в везикулярных тубулярных кластерах

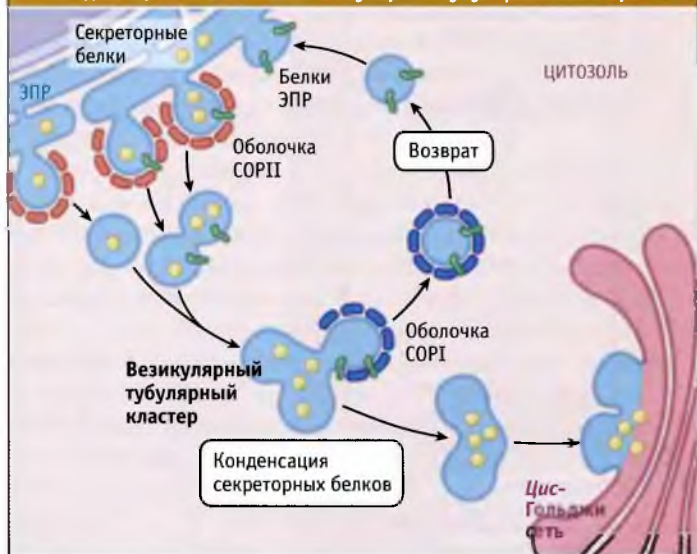


Рис. 4.54. Белки, выходящие из клеток за счет регулируемой секреции, концентрируются в везикулярных тубулярных кластерах, в то время, как другие белки перемещаются в везикулы, покрытые COPI

Процесс конденсации продолжается в аппарате Гольджи и в вакуолях, которые отпочковались от *транс*-Гольджи сети. Образующиеся секреторные гранулы имеют одинаковые размеры (около 0,5 мкм в диаметре) и занимают в клетке определенный район, примыкая к апикальной мембране. По получении клеткой стимулирующего сигнала от секретора, гранулы сливаются с указанной мембраной (см. рис. 4.7). Для экзокринных клеток поджелудочной железы таким секреторным агентом является пептид, называемый ССК, который выделяется в желудке в процессе переваривания пищи. Таким образом, стимулируя высвобождение гранул из поджелудочной железы, ССК обеспечивает выделение пищеварительных ферментов в желудочно-кишечный тракт.

Созревание секреторных гранул также исследовалось на клетках культуры PC12, представляющих собой

линию нейроэндокринных клеток, полученных из клеток надпочечников и способных секретировать гормоны в ответ на воздействие ростового фактора нервных клеток. Как показано на Рис. 4.55, вакуоли отпочковываются от *транс*-Гольджи сети и затем при дальнейшей конденсации созревают. При этом при образовании клатриновых везикул удаляются мембранные компоненты. В этих везикулах могут сохраняться белки *транс*-Гольджи сети, например фурин и М-6-Ф-рецептор, которые случайно включились в мембраны образующихся гранул.

Регулируемое слияние секреторных гранул с плазматической мембраной в основном происходит таким же образом, что и при конститутивном секреторном процессе. Основное различие состоит в том, что слияние блокируется на стадии сборки комплекса SNARE. Процесс слияния инициируется поступлением ионов каль-

Образование секреторных гранул

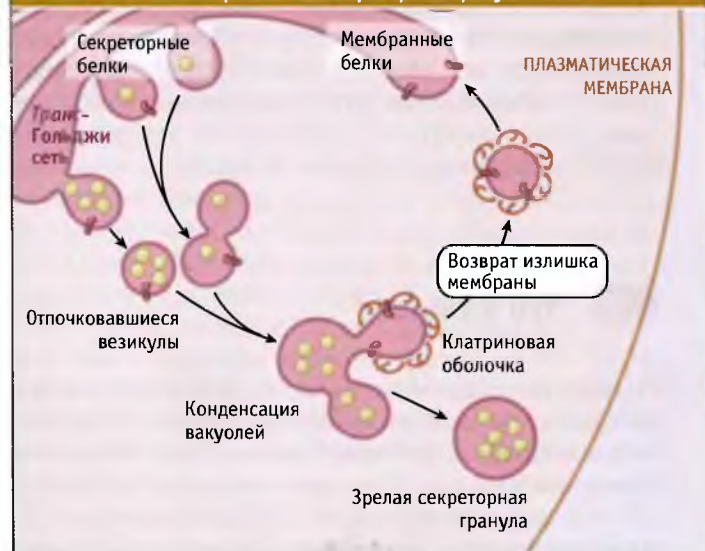


Рис. 4.55. Белки, предназначенные для регулируемой секреции, упаковываются в везикулы, которые отпочковываются от транс-Гольджи сети и сливаются друг с другом. При конденсации секреторного содержимого остается излишек мембраны, который возвращается на место в виде везикул, покрытых клатрином. Зрелые гранулы сливаются с плазматической мембраной только после получения клеткой соответствующего сигнала

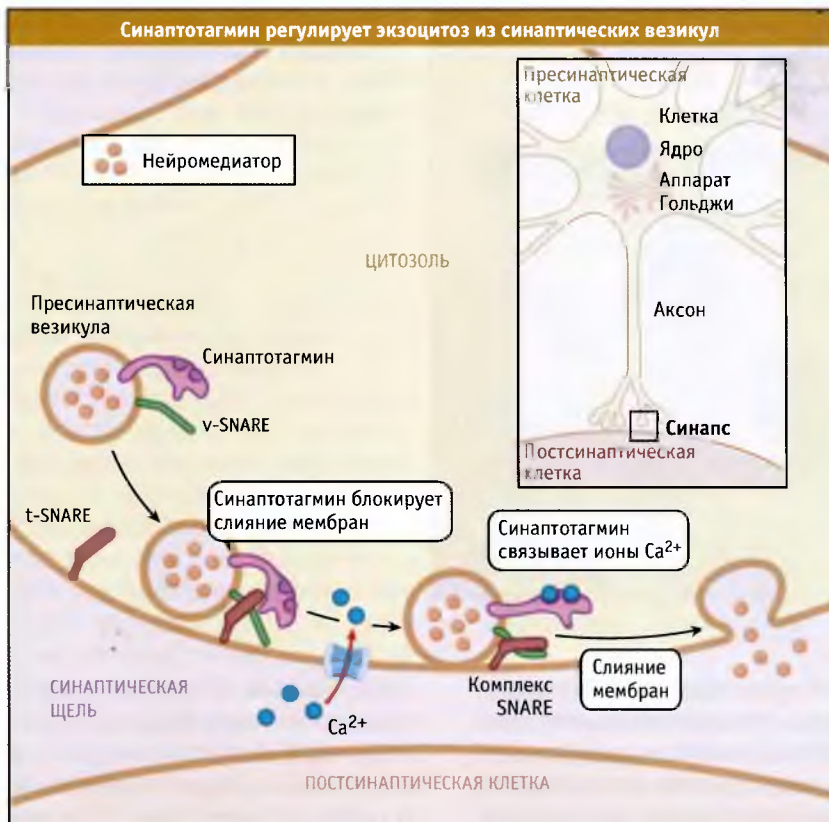


РИС. 4.56. Синаптотагмин регулирует высвобождение содержимого синаптических пузырьков. Считают, что он связывает комплекс, образованный v- и t-SNARE, тем самым предотвращая слияние мембран. Ионы кальция входят через кальциевый канал, связываются с синаптотагмином, при этом высвобождается комплекс SNARE, что обеспечивает слияние мембран

ция из внеклеточной среды. Как показано на РИС. 4.56, ключевую роль в регуляции этого процесса играет синаптотагмин, белок, связывающий кальций.

Синаптотагмин впервые был обнаружен в мембранах синаптических пузырьков, специализированных секреторных гранул, которые участвуют в высвобождении нейромедиаторов в синапсах. Нейроны являются поляризованными клетками с двумя доменами: клеточным телом и аксоном, которые никак не разделены (рис. 4.56). Аксоны — длинные выросты (иногда достигающие нескольких метров в длину), которые передают электрический импульс от одного нейрона к другому. Аксоны заканчиваются синапсами, которые представляют собой специальный тип контакта с мышечными клетками или с телом (или с клеточными отростками, называемыми дендритами) других нейронов. Плазматические мембраны аксона в синапсе характеризуются крайне специфическим биохимическим составом, который соответствует функциям передачи нервного импульса. Синаптотагмины участвуют в регулируемом секреторном процессе в нейронах и в других клетках.

На одном конце молекулы синаптотагмина имеется мембранный якорь, а остальная часть молекулы погружена в цитоплазму клетки. Этот цитоплазматический

домен содержит два сайта, связывающих кальций, образует комплекс со всеми белками SNARE и, по-видимому, поддерживает их в неактивной конфигурации (рис. 4.56). Нервный импульс, вызывающий деполяризацию плазматической мембраны, запускает поступление в клетку ионов кальция через кальциевые каналы в пресинаптической мембране. Локальное увеличение концентрации ионов кальция, как предполагают, служит сигналом изменения конформации синаптотагмина. Эти конформационные изменения приводят к выходу синаптотагмина из комплекса SNARE, и происходит слияние мембран.

4.20 Что дальше?

Охарактеризовано большинство белков, участвующих в процессах перемещения между мембранами, и в ряде случаев выяснены их функции. Однако о функциях многих белков можно только догадываться, и ощущается необходимость использования более углубленных методов исследований в этом направлении. Например, в настоящее

время удержание везикул на мембране рассматривается как событие в категории все или ничего, и упускается тот факт, что этот процесс очень тонко регулируется во времени и пространстве. По-видимому, наиболее адекватным в данном случае является сочетание биохимических и микроскопических методов исследования.

Более того, ощущается необходимость интеграции отдельных процессов для создания целостной картины. Часто можно изучить отдельные этапы, но путь, по которому они объединяются вместе, остается неясным. Примером является процесс выбора карго для транспорта в базолатеральную мембрану поляризованных клеток. Существует очевидная необходимость в специфическом адаптере (AP-1B), но как он связан с процессом сборки окаймления? Адаптеры, которые связываются с базолатеральным карго и с М-6-Ф рецепторами, оба связываются с клатрином, но для них характерно различное направление. Что препятствует вхождению обоих типов комплексов адаптер-карго в одни и те же транспортные везикулы? Что регулирует и координирует индивидуальные события мембранного транспорта в процессе биологического развития или при метаболических изменениях в клетке или в тканях? Наблюдение и анализ таких событий в реальном времени возможны с помощью биохимических и микроскопических методов.

С другой стороны, существуют сложные структуры, которые исследуются методами рентгеноструктурного анализа и ядерного магнитного резонанса. Например, недавно получена структура адаптерного комплекса AP-2. Выяснение этих структур обеспечивает необходимые предпосылки для дальнейшего изучения механизмов процессов с использованием генетических и биохимических подходов.

4.21 Резюме

Уникальный набор белков отражает специализированные функции органелл, участвующих в экзо- и эндоцитозе. Состав этого набора поддерживается постоянным, несмотря на большое количество белков, которые проходят через органеллы в ходе их функционирования и в результате биосинтетических процессов. Индивидуальность состава компартментов поддерживается постоянным обменом везикулами между мембранами. Белки селективно включаются в везикулы, которые переносят их к следующему компартменту, и затем везикулы сливаются только с этим компартментом.

Транспортируемые белки сортируются в соответствии с сигналом, который прямо или опосредованно связывается с белком, окаймляющим везикулу. Этот механизм особенно характерен для эндоцитоза и в меньшей степени для экзоцитоза. Последний характеризуется продвижением молекул карго, особенно синтезируемых в больших количествах, или больших структур в виде неизбирательного потока по направ-

лению к транс-Гольджи сети. Прямой селекцией белков не происходит, и основную роль играют два других сигнала: удержание и возвращение. За счет первого белок удерживается на специфической мембране по механизму, в котором участвует домен, пронизывающий мембрану. Второй сигнал обеспечивает захват белка и его возвращение в органеллу, где он должен функционировать. Многие растворимые и присутствующие в больших количествах белки ЭПР обладают С-терминальным сигналом KDEL, который служит для возвращения белков из ранних компартментов Гольджи. Для белков мембран ЭПР характерен сигнал, состоящий из остатков основных аминокислот.

Для направления везикул к определенным компартментам необходимы Rab-ГТФазы, удерживающие белки и белки SNARE. Парные SNARE взаимодействуют между собой, при этом мембраны соприкасаются и сливаются. Слияние мембран контролируется, и таким образом регулируется секреция многих типов карго — от пищеварительных ферментов до нейромедиаторов.

Список литературы

4.1 Введение

Обзор

Mellman, I., and Warren, G., 2000. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* v. 100 p. 99–112.

4.2 Обзор путей экзоцитоза

Обзор

Griffiths, G., and Simons, K., 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* v. 234 p. 438–443.

Helenius, A., and Aebi, M., 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* v. 291 p. 2364–2369.

Kornfeld, R., and Kornfeld, S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* v. 54 p. 631–664.

Palade, G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* v. 189 p. 347–358.

Pfeffer, S., 2003. Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* v. 112 p. 507–517.

Rothman, J. E., 1981. The Golgi apparatus: two organelles in tandem. *Science* v. 213 p. 1212–1219.

Rothman, J. E. and Wieland, F. T., 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* v. 272 p. 227–234.

Van den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A., and Opdenakker, G., 1998. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* v. 33 p. 151–208.

Исследования

Hang, H. C., and Bertozzi, C. R., 2005. The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Bioorg. Med. Chem.* v. 13 p. 5021–5034.

Novick, P., Ferro, S., and Schekman, R., 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* v. 25 p. 461–469.

4.3 Обзор путей эндоцитоза

Обзор

- Aderem, A., and Underhill, D. M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* v. 17 p. 593–623.
- Conner, S. D. and Schmid, S. L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* v. 422 p. 37–44.
- Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S., 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* v. 279 p. 679–685.
- Greenberg, S., and Grinstein, S., 2002. Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* v. 14 p. 136–145.
- Mellman, I., 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 12 p. 575–625.
- Mellman, I., Fuchs, R., and Helenius, A., 1986. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* v. 55 p. 663–700.
- Rojas, R., and Apodaca, G., 2002. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 944–955.
- Stevens, T. H. and Forgac, M., 1997. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 779–808.
- Trombetta, E. S., and Mellman, I., 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* v. 23 p. 975–1028.
- Tuma, P. L., and Hubbard, A. L., 2003. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* v. 83 p. 871–932.

Исследования

- Fuchs, R., Schmid, S., and Mellman, I., 1989. A possible role for Na⁺,K⁺-ATPase in regulating ATP-dependent endosome acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 86 p. 539–543.
- Galloway, C. J., Dean, G. E., Marsh, M., Rudnick, G., and Mellman, I., 1983. Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 80 p. 3334–3338.

4.4 Представления о везикулярном транспорте белков

Обзор

- Rothman, J. E., 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* v. 372 p. 55–68.
- Springer, S., Spang, A., and Schekman, R., 1999. A primer on vesicle budding. *Cell* v. 97 p. 145–148.
- Waters, M. G., and Hughson, F. M., 2000. Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* v. 1 p. 588–597.

4.5 Представления о сигнальном транспорте и о неизбирательном потоке белков

Обзор

- Pfeffer, S. R., and Rothman, J. E., 1987. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* v. 56 p. 829–852.
- Rothman, J. E., and Wieland, F. T., 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* v. 272 p. 227–234.

Исследования

- Bretscher, M. S., Thomson, J. N., and Pearse, B. M., 1980. Coated pits act as molecular filters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 77 p. 4156–4159.
- Wiedmann, M., Huth, A., and Rapoport, T. A., 1984. Xenopus oocytes can secrete bacterial beta-lactamase. *Nature* v. 309 p. 637–639.
- Wieland, F. T., Gleason, M. L., Serafini, T. A., and Rothman, J. E., 1987. The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* v. 50 p. 289–300.

4.6 COPII-окаймленные везикулы участвуют в транспорте из ЭПР в аппарат Гольджи

Обзор

- Barlowe, C., 2003. Molecular recognition of cargo by the COPII complex: a most accommodating coat. *Cell* v. 114 p. 395–397.
- Hauri, H. P., Kappeler, F., Andersson, H., and Appenzeller, C., 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *J. Cell Sci.* v. 113 (Pt 4) p. 587–596.
- Springer, S., Spang, A., and Schekman, R., 1999. A primer on vesicle budding. *Cell* v. 97 p. 145–148.
- Warren, G. and Mellman, I., 1999. Bulk flow redux? *Cell* v. 98 p. 125–127.

Исследования

- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R., 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 77 p. 895–907.
- Belden, W. J. and Barlowe, C., 2001. Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles. *Science* v. 294 p. 1528–1531.
- Bi, X., Corpina, R. A., and Goldberg, J., 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* v. 419 p. 271–277.
- Kuehn, M. J., Schekman, R., and Ljungdahl, P. O., 1996. Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles in vitro. *J. Cell Biol.* v. 135 p. 585–595.
- Nichols, W. C. et al., 1998. Mutations in the ER-Golgi intermediate compartment protein ERGIC-53 cause combined deficiency of coagulation factors V and VIII. *Cell* v. 93 p. 61–70.
- Nishimura, N., Bannykh, S., Slabough, S., Matteson, J., Altschuler, Y., Hahn, K., and Balch, W. E., 1999. A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 15937–15946.
- Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J. M., and Lippincott-Schwartz, J., 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* v. 389 p. 81–85.
- Springer, S., and Schekman, R., 1998. Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* v. 281 p. 698–700.

4.7 Резидентные белки, выходящие из ЭПР, возвращаются обратно

Исследования

- Munro, S., and Pelham, H. R., 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* v. 48 p. 899–907.

- Nilsson, T., Jackson, M., and Peterson, P. A., 1989. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 58 p. 707–718.
- Schindler, R., Itin, C., Zerial, M., Lottspeich, F., and Hauri, H. P., 1993. ERGIC-53, a membrane protein of the ER-Golgi intermediate compartment, carries an ER retention motif. *Eur. J. Cell Biol.* v. 61 p. 1–9.
- Schutze, M. P., Peterson, P. A., and Jackson, M. R., 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* v. 13 p. 1696–1705.
- Wilson, D. W., Lewis, M. J., and Pelham, H. R., 1993. pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro*. *J. Biol. Chem.* v. 268 p. 7465–7468.
- 4.8** **COPI-окаймленные везикулы участвуют в ретроградном транспорте белков из аппарата Гольджи в ЭПР**
- Обзор**
- Pelham, H. R., 1994. About turn for the COPs? *Cell* v. 79 p. 1125–1127.
- Исследования**
- Aoe, T., Huber, I., Vasudevan, C., Watkins, S. C., Romero, G., Cassel, D., and Hsu, V. W., 1999. The KDEL receptor regulates a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor 1 by interacting with its non-catalytic domain. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 20545–20549.
- Donaldson, J. G., Lippincott-Schwartz, J., Bloom, G. S., Kreis, T. E., and Klausner, R. D., 1990. Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action. *J. Cell Biol.* v. 111 p. 2295–2306.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Démolière, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H., and Cosson, P., 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* v. 79 p. 1199–1207.
- Nickel, W., Brugger, B., and Wieland, F. T., 2002. Vesicular transport: the core machinery of COPI recruitment and budding. *J. Cell Sci.* v. 115 p. 3235–3240.
- Serafini, T., Orci, L., Amherdt, M., Brunner, M., Kahn, R. A., and Rothman, J. E., 1991. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* v. 67 p. 239–253.
- Waters, M. G., Serafini, T., and Rothman, J. E., 1991. 'Coatamer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* v. 349 p. 248–251.
- 4.9** **Существуют две распространенные модели, описывающие прямой транспорт белков через аппарат Гольджи**
- Обзор**
- Pelham, H. R., and Rothman, J. E., 2000. The debate about transport in the Golgi—two sides of the same coin? *Cell* v. 102 p. 713–719.
- 4.10** **Удержание белков в аппарате Гольджи зависит от домена, пронизывающего мембрану**
- Обзор**
- Bretscher, M. S., and Munro, S., 1993. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* v. 261 p. 1280–1281.
- Nilsson, T., and Warren, G., 1994. Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 6 p. 517–521.
- Pelham, H. R. and Munro, S., 1993. Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell* v. 75 p. 603–605.
- Исследования**
- Munro, S., 1995. An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J.* v. 14 p. 4695–4704.
- Nilsson, T., Hoe, M. H., Slusarewicz, P., Rabouille, C., Watson, R., Hunte, F., Watzel, G., Berger, E. G., and Warren, G., 1994. Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells. *EMBO J.* v. 13 p. 562–574.
- 4.11** **Rab-ГТФазы и удерживающие белки представляют собой два типа белков, регулирующих адресование везикул**
- Обзор**
- Barr, F. A., and Warren, G., 1996. Disassembly and reassembly of the Golgi apparatus. *Semin. Cell Dev. Biol.* v. 7 p. 505–510.
- Guo, W., Sacher, M., Barrowman, J., Ferro-Novick, S., and Novick, P., 2000. Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol.* v. 10 p. 251–255.
- Pfeffer, S. R., 1999. Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* v. 1 p. E17–22.
- Waters, M. G., and Hughson, F. M., 2000. Membrane tethering and fusion in the secretory and endocytic pathways. *Traffic* v. 1 p. 588–597.
- Whyte, J. R., and Munro, S., 2002. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J. Cell Sci.* v. 115 p. 2627–2637.
- Zerial, M., and McBride, H., 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 107–117.
- Исследования**
- Salminen, A. and Novick, P. J., 1987. A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* v. 49 p. 527–538.
- 4.12** **Белки SNARE, вероятно, участвуют в слиянии везикул с мембранами-мишенями**
- Обзор**
- Brunner, A. T., 2001. Structure of proteins involved in synaptic vesicle fusion in neurons. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* v. 30 p. 157–171.
- Chen, Y. A., and Scheller, R. H., 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 98–106.
- Ferro-Novick, S., and Jahn, R., 1994. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* v. 370 p. 191–193.
- Gerst, J. E., 2003. SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1641 p. 99–110.
- Jahn, R., Lang, T., and Sudhof, T. C., 2003. Membrane fusion. *Cell* v. 112 p. 519–533.
- Skehel, J. J., and Wiley, D. C., 1998. Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion. *Cell* v. 95 p. 871–874.
- Söllner, T. H., 2003. Regulated exocytosis and SNARE function (review). *Mol. Membr. Biol.* v. 20 p. 209–220.
- Toonen, R. F., and Verhage, M., 2003. Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. *Trends Cell Biol.* v. 13 p. 177–186.

- Hanson, P. I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R., and Heuser, J. E., 1997. Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* v. 90 p. 523–535.
- Parlati, F., McNew, J. A., Fukuda, R., Miller, R., Sollner, T. H., and Rothman, J. E., 2000. Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* v. 407 p. 194–198.
- Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., and Rothman, J. E., 1993. A protein assembly-disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* v. 75 p. 409–418.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E., 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* v. 362 p. 318–324.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A. T., 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* v. 395 p. 347–353.

4.13 Обычно в эндоцитозе участвуют клатриновые везикулы

Обзор

- Lemmon, S. K., 2001. Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr. Biol.* v. 11 p. R49–R52.
- Sever, S., Damke, H., and Schmid, S. L., 2000. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* v. 1 p. 385–392.

Исследования

- Ford, M. G., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J., Evans, P. R., and McMahon, H. T., 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* v. 419 p. 361–366.
- Heuser, J., 1980. Three-dimensional visualization of coated vesicle formation in fibroblasts. *J. Cell Biol.* v. 84 p. 560–583.
- Hinshaw, J. E., and Schmid, S. L., 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* v. 374 p. 190–192.
- Kanaseki, T., and Kadota, K., 1969. The “vesicle in a basket.” A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J. Cell Biol.* v. 42 p. 202–220.
- Kirchhausen, T. and Harrison, S. C., 1981. Protein organization in clathrin trimers. *Cell* v. 23 p. 755–761.
- Kosaka, T., and Ikeda, K., 1983. Reversible blockage of membrane retrieval and endocytosis in the garland cell of the temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*, shibire ts1. *J. Cell Biol.* v. 97 p. 499–507.
- Merrifield, C. J., Moss, S. E., Ballestrem, C., Imhof, B. A., Giese, G., Wunderlich, I., and Almers, W., 1999. Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in cultured mast cells. *Nat. Cell Biol.* v. 1 p. 72–74.
- Musacchio, A., Smith, C. J., Roseman, A. M., Harrison, S. C., Kirchhausen, T., and Pearse, B. M., 1999. Functional organization of clathrin in coats: combining electron cryomicroscopy and X-ray crystallography. *Mol. Cell* v. 3 p. 761–770.

- Pearse, B. M., 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* v. 97 p. 93–98.
- Roth, T. F., and Porter, K. R., 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell Biol.* v. 20 p. 313–332.
- Takei, K., McPherson, P. S., Schmid, S. L., and De Camilli, P., 1995. Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* v. 374 p. 186–190.
- Ungewickell, E., and Branton, D., 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature* v. 289 p. 420–422.
- van der Bliek, A. M., and Meyerowitz, E. M., 1991. Dynamin-like protein encoded by the *Drosophila shibire* gene associated with vesicular traffic. *Nature* v. 351 p. 411–414.
- Woodward, M. P., and Roth, T. F., 1978. Coated vesicles: characterization, selective dissociation, and reassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 75 p. 4394–4398.

4.14 Адаптерные комплексы связывают клатрин и трансмембранные белки карго

Обзор

- Bonifacino, J. S., and Traub, L. M., 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 72 p. 395–447.
- Robinson, M. S., 2004. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol.* v. 14 p. 167–174.
- Robinson, M. S., and Bonifacino, J. S., 2001. Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 13 p. 444–453.
- Setaluri, V., 2000. Sorting and targeting of melanosomal membrane proteins: signals, pathways, and mechanisms. *Pigment Cell Res.* v. 13 p. 128–134.

Исследования

- Anderson, R. G., Goldstein, J. L., and Brown, M. S., 1977. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localize in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* v. 270 p. 695–699.
- Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., and Owen, D. J., 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* v. 109 p. 523–535.
- Confalonieri, S., Salcini, A. E., Puri, C., Tacchetti, C., and Di Fiore, P. P., 2000. Tyrosine phosphorylation of Eps15 is required for ligand-regulated, but not constitutive, endocytosis. *J. Cell Biol.* v. 150 p. 905–912.
- Davis, C. G., Lehrman, M. A., Russell, D. W., Anderson, R. G., Brown, M. S., and Goldstein, J. L., 1986. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* v. 45 p. 15–24.
- Dell'Angelica, E. C., Mullins, C., and Bonifacino, J. S., 1999. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.* v. 274 p. 7278–7285.
- Dell'Angelica, E. C., Ohno, H., Ooi, C. E., Rabinovich, E., Roche, K. W., and Bonifacino, J. S., 1997. AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* v. 16 p. 917–928.
- Gaidarov, I., Chen, Q., Falck, J. R., Reddy, K. K., and Keen, J. H., 1996. A functional phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate/phosphoinositide binding domain in the clathrin adaptor AP-2 alpha subunit. Implications for the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* v. 271 p. 20922–20929.

- Goodman, O. B., Krupnick, J. G., Santini, F., Gurevich, V. V., Penn, R. B., Gagnon, A. W., Keen, J. H., and Benovic, J. L., 1996. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* v. 383 p. 447–450.
- Heuser, J. E., and Keen, J., 1988. Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly. *J. Cell Biol.* v. 107 p. 877–886.
- Matter, K., Hunziker, W., and Mellman, I., 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* v. 71 p. 741–753.
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M. C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., and Bonifacino, J. S., 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* v. 269 p. 1872–1875.
- Owen, D. J., Vallis, Y., Pearse, B. M., McMahon, H. T., and Evans, P. R., 2000. The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain. *EMBO J.* v. 19 p. 4216–4227.
- Rapoport, I., Chen, Y. C., Cupers, P., Shoelson, S. E., and Kirchhausen, T., 1998. Dilucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J.* v. 17 p. 2148–2155.
- Robinson, M. S., and Pearse, B. M., 1986. Immunofluorescent localization of 100K coated vesicle proteins. *J. Cell Biol.* v. 102 p. 48–54.
- Simpson, F., Peden, A. A., Christopoulou, L., and Robinson, M. S., 1997. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* v. 137 p. 835–845.
- Steinman, R. M., Brodie, S. E., and Cohn, Z. A., 1976. Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. *J. Cell Biol.* v. 68 p. 665–687.
- Ybe, J. A., Brodsky, F. M., Hofmann, K., Lin, K., Liu, S. H., Chen, L., Earnest, T. N., Fletterick, R. J., and Hwang, P. K., 1999. Clathrin self-assembly is mediated by a tandemly repeated superhelix. *Nature* v. 399 p. 371–375.

4.15 Некоторые рецепторы рециклируют из ранних эндосом, в то время как другие разрушаются в лизосомах

Обзор

- Helenius, A., Mellman, I., Wall, D., and Hubbard, A., 1983. Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* v. 8 p. 245–250.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D., 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 893–905.
- Mellman, I., 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 12 p. 575–625.

Исследования

- Davis, C. G., Goldstein, J. L., Südhof, T. C., Anderson, R. G., Russell, D. W., and Brown, M. S., 1987. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* v. 326 p. 760–765.
- Geuze, H. J., Slot, J. W., and Schwartz, A. L., 1987. Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J. Cell Biol.* v. 104 p. 1715–1723.
- Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J., 1991. rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* v. 64 p. 915–925.

- Klausner, R. D., Ashwell, G., van Renswoude, J., Harford, J. B., and Bridges, K. R., 1983. Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 80 p. 2263–2266.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y., 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* v. 12 p. 3663–3674.
- Marsh, M., and Helenius, A., 1980. Adsorptive endocytosis of Semliki Forest virus. *J. Mol. Biol.* v. 142 p. 439–454.
- Marsh, M., Griffiths, G., Dean, G. E., Mellman, I., and Helenius, A., 1986. Three-dimensional structure of endosomes in BHK-21 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 83 p. 2899–2903.
- McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R., and Zerial, M., 1999. Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* v. 98 p. 377–386.
- Mu, F. T., Callaghan, J. M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R. G., Campbell, P. L., McCluskey, J., Yeo, J. P., Tock, E. P., and Toh, B. H., 1995. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine “fingers” and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J. Biol. Chem.* v. 270 p. 13503–13511.
- Prekeris, R., Klumperman, J., Chen, Y. A., and Scheller, R. H., 1998. Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J. Cell Biol.* v. 143 p. 957–971.
- Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M., and Mellman, I., 1999. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J. Cell Biol.* v. 145 p. 123–139.
- Simonsen, A., Lippé, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., and Stenmark, H., 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* v. 394 p. 494–498.

4.16 При созревании ранние эндосомы превращаются в поздние эндосомы и лизосомы

Обзор

- Helenius, A., Mellman, I., Wall, D., and Hubbard, A., 1983. Endosomes. *Trends Biochem. Sci.* v. 8 p. 245–250.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G., and Emr, S. D., 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 893–905.
- Kornfeld, S., and Mellman, I., 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 5 p. 483–525.
- Mellman, I., 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 12 p. 575–625.
- Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A., and Cohn, Z. A., 1983. Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell Biol.* v. 96 p. 1–27.

Исследования

- Dunn, K. W., McGraw, T. E., and Maxfield, F. R., 1989. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J. Cell Biol.* v. 109 p. 3303–3314.
- Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Hopkins, C. R., 1990. Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell* v. 61 p. 623–634.

- Grunberg, J., Griffiths, G., Howell, S., and K. E., 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J. Cell Biol.* v. 108 p. 1301–1316.
- Katzmann, D. J., Babst, M., and Emr, S. D., 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* v. 106 p. 145–155.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B., and Yarden, Y., 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* v. 12 p. 3663–3674.
- Matteoni, R., and Kreis, T. E., 1987. Translocation and clustering of endosomes and lysosomes depends on microtubules. *J. Cell Biol.* v. 105 p. 1253–1265.
- Schmid, S. L., Fuchs, R., Male, P., and Mellman, I., 1988. Two distinct subpopulations of endosomes involved in membrane recycling and transport to lysosomes. *Cell* v. 52 p. 73–83.

4.17 В транс-Гольджи сети происходит сортировка лизосомальных белков

Обзор

- Bonifacino, J. S., and Traub, L. M., 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* v. 72 p. 395–447.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S., 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* v. 54 p. 631–664.
- Kornfeld, S., 1992. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* v. 61 p. 307–330.
- Kornfeld, S., and Mellman, I., 1989. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 5 p. 483–525.
- Stack, J. H., Horazdovsky, B., and Emr, S. D., 1995. Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 11 p. 1–33.

Исследования

- Boman, A. L., Zhang, C., Zhu, X., and Kahn, R. A., 2000. A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol. Biol. Cell* v. 11 p. 1241–1255.
- Carroll, K. S., Hanna, J., Simon, I., Krise, J., Barbero, P., and Pfeffer, S. R., 2001. Role of Rab9 GTPase in facilitating receptor recruitment by TIP47. *Science* v. 292 p. 1373–1376.
- Costaguta, G., Stefan, C. J., Bensen, E. S., Emr, S. D., and Payne, G. S., 2001. Yeast Gga coat proteins function with clathrin in Golgi to endosome transport. *Mol. Biol. Cell* v. 12 p. 1885–1896.
- Darsow, T., Burd, C. G., and Emr, S. D., 1998. Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE. *J. Cell Biol.* v. 142 p. 913–922.
- Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M., and Bonifacino, J. S., 2000. GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* v. 149 p. 81–94.

- Doray, B., Bruns, K., Ghosh, P., and Kornfeld, S., 2002. Interaction of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor with GGA proteins. *J. Biol. Chem.* v. 277 p. 18477–18482.
- Geuze, H. J., Stoorvogel, W., Strous, G. J., Slot, J. W., Bleekemolen, J. E., and Mellman, I., 1988. Sorting of mannose 6-phosphate receptors and lysosomal membrane proteins in endocytic vesicles. *J. Cell Biol.* v. 107 p. 2491–2501.
- Hirst, J., Lui, W. W., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N., and Robinson, M. S., 2000. A family of proteins with gamma-adaptin and VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* v. 149 p. 67–80.
- Howe, C. L., Granger, B. L., Hull, M., Green, S. A., Gabel, C. A., Helenius, A., and Mellman, I., 1988. Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120-kDa lysosomal membrane glycoprotein (lgp120): identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 85 p. 7577–7581.
- Kornfeld, S., and Sly, W. S., 1985. Lysosomal storage defects. *Hosp Pract (Off Ed)* v. 20 p. 71–75, 78–82.
- Pelham, H. R., 1988. Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO J.* v. 7 p. 913–918.
- Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J., and Bonifacino, J. S., 2001. Sorting of mannose 6-phosphate receptors mediated by the GGAs. *Science* v. 292 p. 1712–1716.
- Zhu, Y., Doray, B., Poussu, A., Lehto, V. P., and Kornfeld, S., 2001. Binding of GGA2 to the lysosomal enzyme sorting motif of the mannose 6-phosphate receptor. *Science* v. 292 p. 1716–1718.

4.18 Поляризованные эпителиальные клетки транспортируют белки к апикальной и базолатеральной мембранам

Обзор

- Drubin, D. G., and Nelson, W. J., 1996. Origins of cell polarity. *Cell* v. 84 p. 335–344.
- Griffiths, G., and Simons, K., 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* v. 234 p. 438–443.
- Mellman, I., 1995. Molecular sorting of membrane proteins in polarized and nonpolarized cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* v. 60 p. 745–752.
- Mostov, K. E., Verges, M., and Altschuler, Y., 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 12 p. 483–490.
- Munro, S., 2003. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* v. 115 p. 377–388.
- Rodriguez-Boulau, E., and Powell, S. K., 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 8 p. 395–427.
- Simons, K., and Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* v. 387 p. 569–572.

Исследования

- Ang, A. L., Taguchi, T., Francis, S., Fölsch, H., Murrells, L. J., Pypaert, M., Warren, G., and Mellman, I., 2004. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J. Cell Biol.* v. 167 p. 531–543.

- Fölsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J. S., and Mellman, I., 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* v. 99 p. 189–198.
- Matter, K., Whitney, J. A., Yamamoto, E. M., and Mellman, I., 1993. Common signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell* v. 74 p. 1053–1064.
- Matter, K., Yamamoto, E. M., and Mellman, I., 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.* v. 126 p. 991–1004.
- Rindler, M. J., Ivanov, I. E., Plesken, H., Rodriguez-Boulan, E., and Sabatini, D. D., 1984. Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* v. 98 p. 1304–1319.
- Scheiffele, P., Peränen, J., and Simons, K., 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* v. 378 p. 96–98.
- Wandinger-Ness, A., Bennett, M. K., Antony, C., and Simons, K., 1990. Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J. Cell Biol.* v. 111 p. 987–1000.
- Huttner, W. B., Ohashi, M., Kehlenbach, R. H., Barr, F. A., Bauerfeind, R., Bräunling, O., Corbeil, D., Hannah, M., Pasolli, H. A., and Schmidt, A., 1995. Biogenesis of neurosecretory vesicles. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* v. 60 p. 315–327.
- Palade, G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* v. 189 p. 347–358.
- Schiavo, G., Osborne, S. L., and Sgouros, J. G., 1998. Synaptotagmins: more isoforms than functions? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 248 p. 1–8.
- Südhof, T. C., and Rizo, J., 1996. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* v. 17 p. 379–388.
- Warren, G., and Mellman, I., 1999. Bulk flow redux? *Cell* v. 98 p. 125–127.
- Исследования**
- Bendayan, M., 1984. Concentration of amylase along its secretory pathway in the pancreatic acinar cell as revealed by high resolution immunocytochemistry. *Histochem. J.* v. 16 p. 85–108.
- Dittié, A. S., Klumperman, J., and Tooze, S. A., 1999. Differential distribution of mannose-6-phosphate receptors and furin in immature secretory granules. *J. Cell Sci.* v. 112 (Pt 22) p. 3955–3966.
- Klumperman, J., Kuliawat, R., Griffith, J. M., Geuze, H. J., and Arvan, P., 1998. Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J. Cell Biol.* v. 141 p. 359–371.
- Martínez-Menárguez, J. A., Geuze, H. J., Slot, J. W., and Klumperman, J., 1999. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* v. 98 p. 81–90.

4.19 Некоторые клетки запасают белки для последующей секреции

Обзор

- Case, R. M., 1978. Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* v. 53 p. 211–354.
- Gerber, S. H., and Südhof, T. C., 2002. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* v. 51 Suppl 1 p. S3–11.

Структура ядра и процессы транспорта

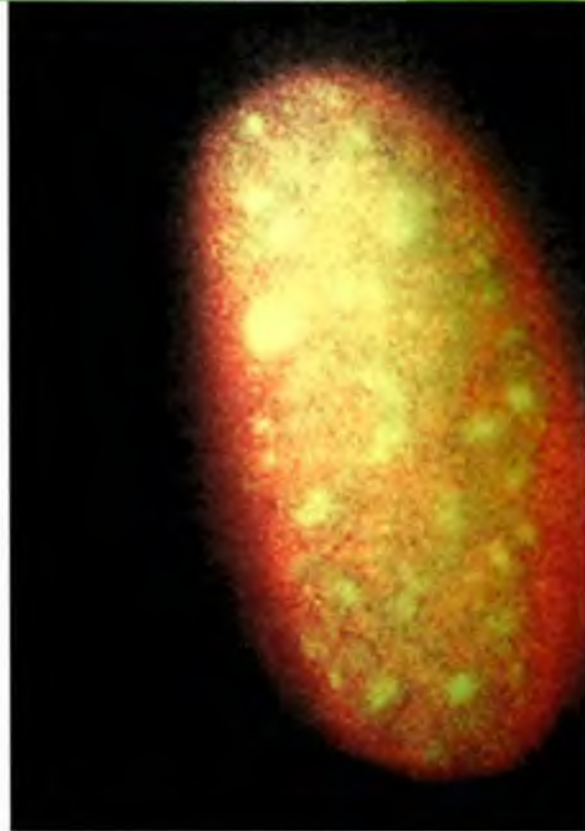
Чарлз Н. Коул

Отдел биохимии и генетики, Медицинская школа в Дартмуте, Гановер, НГ

Памела А. Силвер

Отдел системной биологии, Медицинская школа в Гарварде, Бостон, МА

На фотографии, сделанной с помощью флуоресцентного микроскопа, показано распределение молекул ДНК (красный цвет) и иРНК (зеленый цвет) в ядре типичной клетки млекопитающего. иРНК локализована в доменах, расположенных между областями интерфазного хроматина. С разрешения из Shav-Tal, X.D., et al. 2004. *Science*. 304: 1794–1800. © 2004 AAAS. Фотография любезно предоставлена Шайлеш М. Шеной и Роберт Синджер, Медицинский колледж им. Альберта Эйнштейна, Университет Иешива



КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛАВЫ

- 5.1** Введение
 - 5.2** В зависимости от типа организма и клеток ядро выглядит по-разному
 - 5.3** Каждая хромосома занимает отдельную территорию
 - 5.4** Ядро содержит субкомпарменты, которые не окружены мембраной
 - 5.5** Некоторые процессы происходят в определенных ядерных сайтах и определяются их структурами
 - 5.6** Ядро окружено ядерной оболочкой
 - 5.7** Ядерная ламина подстилает ядерную оболочку
 - 5.8** Между ядром и цитоплазмой осуществляется активный транспорт больших молекул
 - 5.9** Ядерные поровые комплексы представляют собой симметричные каналы
 - 5.10** Ядерные поровые комплексы состоят из нуклеопоринов
 - 5.11** Белки избирательно транспортируются в ядро через ядерные поры
 - 5.12** Сигнал ядерной локализации направляет белки в ядро
 - 5.13** В импорте белков в ядро участвуют цитоплазматические рецепторы NLS
 - 5.14** Экспорт белков из ядра также происходит с участием рецепторов
 - 5.15** Направление ядерного транспорта контролируется Ran-ГТФазой
 - 5.16** Для описания механизма ядерного транспорта предложено несколько моделей
 - 5.17** Ядерный транспорт может регулироваться
 - 5.18** Из ядра экспортируется много типов РНК
 - 5.19** Субъединицы рибосом собираются в ядрышке и экспортируются с участием экспортина 1
 - 5.20** тРНК экспортируются с участием специального экспортина
 - 5.21** иРНК экспортируются из ядра в виде РНК-белковых комплексов
 - 5.22** гЯРП транспортируются от мест процессинга к ЯПК
 - 5.23** Экспорт иРНК требует участия нескольких новых факторов
 - 5.24** УмяРНК экспортируются, модифицируются, собираются в комплексы и импортируются
 - 5.25** Предшественники микроРНК экспортируются из ядра и подвергаются процессингу в цитоплазме
 - 5.26** Что дальше?
 - 5.27** Резюме
- Список литературы

5.1 Введение

Основные положения

- В ядре содержится большая часть ДНК клетки и осуществляется сложный механизм регуляции генной экспрессии
- Ядерная оболочка представляет собой двойную мембрану, окружающую ядро
- Ядро содержит не окруженные мембраной субкомпарменты
- В ядерной оболочке находятся поры, предназначенные для поступления белков в ядро и для выхода из него РНК и белков

При исследовании эукариотической клетки в световом микроскопе, наиболее крупным из видимых компартментов является **ядро** (рис. 5.1). Термин «эукариотический» означает «имеющий истинное ядро», и наличие последнего служит характерной особенностью всех эукариотических клеток. В ядре содержится практически весь генетический материал эукариотической клетки, и оно служит центром, контролирующим ее биологическую активность. (Небольшое количество ДНК содержится в митохондриях и в хлоропластах растительных клеток.)

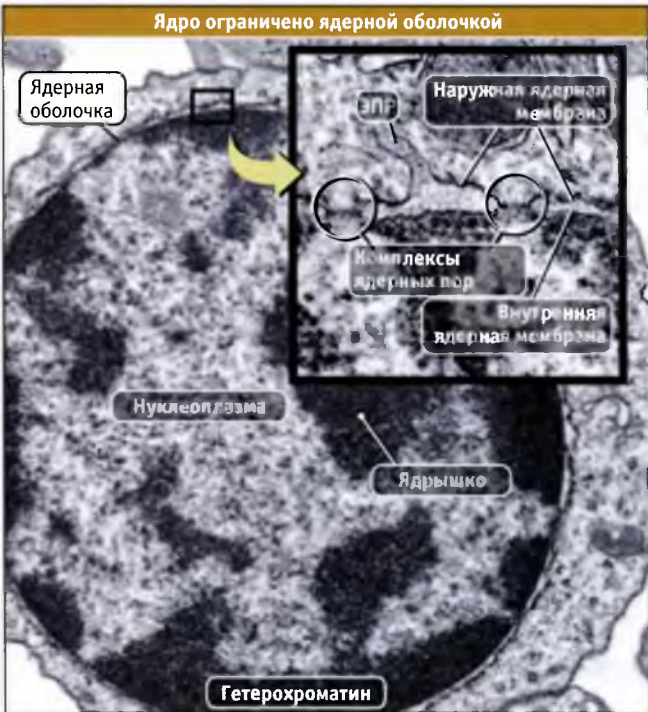
Вероятно, первым, кто увидел клеточное ядро, был Антони ван Левенгук (1632–1723). При изучении клеток крови амфибий и птиц он обнаружил в центре «отчетливую область». Однако честь открытия ядра принадлежит аббату Феликсу Фонтане (1730–1805), который в своих зарисовках клеток эпидермиса кожи угря, сделанных в 1781 г., изобразил ядро в виде яйцевидной структуры. Шотландский ботаник Роберт Браун (1773–1858) отметил, что во всех изученных им клетках растений содержится «круглая область, обыкновенно несколько более прозрачная, чем клеточная оболочка». Он был первым, кто назвал эти структуры ядрами, термином, производным от латинского слова *нуклеус*, обозначающего *ядро*.

Как видно на микрофотографиях, полученных с помощью электронного микроскопа, ядро окружено двойной мембраной, называемой **ядерной оболочкой** (рис. 5.2). Две мембраны разделены промежутком, который контактирует с эндоплазматическим ретикуломом (ЭПР). Пронизывающий ядерную оболочку ядерный поровый комплекс (ЯПК) представляет собой каналы, по которым между ядром и цитоплазмой проходят макромолекулы. В отличие от белков, транспортирующихся через ЭПР или мембраны митохондрий (см. 3 Мембранное адресование белков), белки, проходящие через ЯПК, находятся в свернутом состоянии.

В ядре находятся субкомпарменты, которые не окружены мембранами. Эти субкомпарменты обладают специализированными функциями. Единственный ядерный субкомпармент, хорошо видимый в световом микроскопе, — **ядрышко** (см. рис. 5.1), в котором синтезируется рибосомная РНК (рРНК) и собираются субъединицы рибосом. Остальные субкомпарменты видимы с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. К ним относятся тельца, содержащие факторы сплайсинга РНК и области репликации ДНК. Часть ядра, расположенная вне ядрышек, называется **нуклеоплазма**.



Клетка HeLa, представляющая собой клетку карциномы шейки матки, обладает ядром, хорошо видимым в световом микроскопе. Фотография любезно предоставлена Чжэннань Ву и Джозефом Галлом, Институт Карнеги



Многие детали строения ядра лимфоцита хорошо видны в электронном микроскопе. Фотография любезно предоставлена Терри Алленом, Институт раковых исследований Патерсона

В ядре ДНК находится в различной конфигурации (см. 6.2 *Хроматин подразделяется на эухроматин и гетерохроматин*). На микрофотографиях, выполненных с помощью электронного микроскопа, некоторые области ДНК выглядят темнее, потому что скручены более сильно (см. рис. 5.2). Такая ДНК относится к **гетерохроматину** и не участвует в активной транскрипции. Большая часть гетерохроматина примыкает к ядерной оболочке. Остальная ДНК упакована менее плотно и принадлежит к **эухроматину**. В этой части хроматина присутствуют активно экспрессирующиеся гены. В большинстве клеток гораздо большая часть ДНК находится в составе эухроматина, чем в гетерохроматине.

Какие преимущества обеспечивает ядро эукариотической клетке? Ядро защищает ДНК и участвует в сложном процессе регуляции генной активности. В клетке эукариот содержится больше ДНК, чем в прокариотической клетке (в некоторых случаях в 10 000 раз больше). Эта ДНК упакована в хромосомы, в каждой из которых содержится одна молекула ДНК (см. 6 *Хроматин и хромосомы* и 5.3 *Каждая хромосома занимает отдельную территорию*). Один двунит-

евый разрыв в ДНК одной хромосомы может оказаться для клетки летальным событием. В интерфазе ДНК упакована относительно неплотно, так что ферменты, ответственные за репликацию и синтез РНК, имеют к ней доступ. Когда ДНК упакована рыхло, она в большей степени склонна к повреждениям. Подвижная структура цитоскелета генерирует усилия сдвига, которые могут нарушить целостность ДНК в тех местах интерфазного ядра, где она оказывается незащищенной. Напротив, в митозе хромосомы становятся компактными, поскольку ДНК скручивается в плотную структуру. Хотя при митозе ядерная мембрана исчезает и ДНК оказывается в окружении цитоплазмы, конденсированные хромосомы более устойчивы к повреждениям, которые вызываются силами сдвига при движении цитоскелета.

Наличие ядра позволяет клеткам эукариот иметь гораздо более сложную систему регуляции экспрессии генов, чем прокариотическим клеткам. В клетках прокариотических организмов трансляция и транскрипция являются сопряженными процессами: трансляция мРНК начинается до момента завершения их синтеза. Вследствие разделения эукариотической клетки на цитопламати-

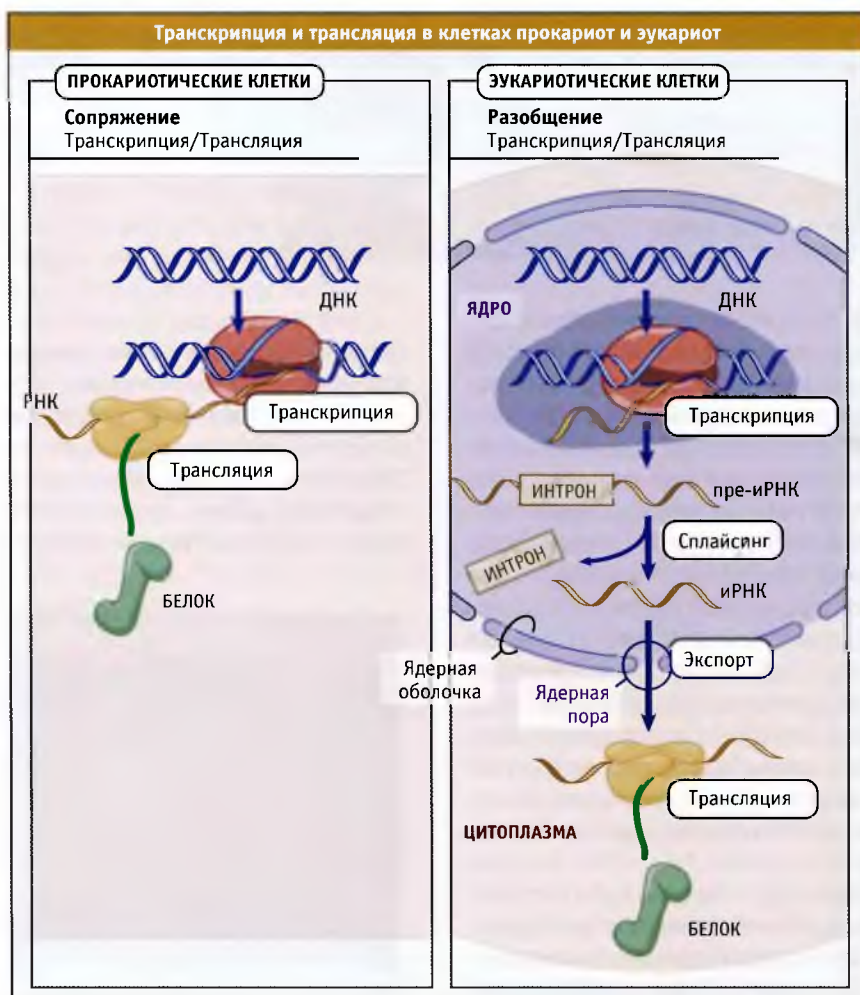


Рис. 5.4 В клетках прокариот транскрипция и трансляция представляют собой сопряженные процессы (слева). У эукариот эти же процессы происходят в отдельных компартментах (справа)

ческий и ядерный компартменты многие макромолекулы должны транспортироваться между ядром и цитоплазмой. Например, транскрипция и процессинг мРНК происходят в ядре, и затем эти молекулы поступают в цитоплазму, где происходит синтез белка. Особенности протекания процессов транскрипции и трансляции в клетках про- и эукариот представлены на рис. 5.3. Для протекания репликации, транскрипции и других ядерных процессов необходимо много белков, которые должны поступать из цитоплазмы. В ядре из множества образующихся там молекул РНК собираются субъединицы рибосом, при этом более сотни необходимых белков импортируются из цитоплазмы. Образующиеся субъединицы выходят в цитоплазму. Все макромолекулы поступают в ядро и выходят из него через ЯПК. Важно отметить, что двухсторонний ядерный транспорт молекул является регулируемым процессом.

кции, как секреция, он составляет 40–60% (см. 3 Мембранное адресование белков).

Большинство клеток содержит одно ядро; однако некоторые клетки содержат несколько ядер, а у отдельных дифференцированных клеток ядро может отсутствовать. Многоядерные клетки могут образовываться в случае, когда в клетке проходит многократное деление ядра (кариокинез) в отсутствие деления клетки (цитокинеза). Например, в клетках ранних эмбрионов *Drosophila melanogaster* и родственных организмов, в пределах общей цитоплазмы содержатся сотни ядер (рис. 5.4). При этом РНК и белки, образующиеся в определенных группах ядер, образуют градиент, который позже начинает играть центральную роль в правильном развитии передней/задней осей тела мухи. Многоядерные клетки также образуются при слиянии нескольких клеток с образованием синцития. Например, зрелые клетки мышц (миоциты) образуются при слиянии клеток-предшественников (миобластов). Некоторые типы дифференцированных клеток, например зрелые эритроциты млекопитающих, тромбоциты, и некоторые клетки хрусталика у позвоночных, являются безъядерными.

Форма и внешний вид ядра являются факторами, позволяющими различать различные типы клеток между собой. Например, лейкозы представляют собой заболевание крови, которые характеризуются избыточным образованием белых кровяных клеток. Существует много типов этих клеток, которые проходят различные стадии дифференцировки. На каждой стадии ядро клетки каждого типа выглядит характерным образом. Один из многочисленных тестов, используемых при диагностике типов лейкоза, состоит в определении морфологии ядер присутствующих в избытке клеток.

Еще одной характеристикой ядра, которая позволяет идентифицировать различные клеточные типы, является величина гетерохроматиновой фракции генома. Например, по мере того как незрелые эритробласты дифференцируются в зрелые эритроциты, все большее количество ДНК переходит в структуру гетерохроматина (рис. 5.5). Увеличение доли гетерохроматина связано с выключением большинства генов, поскольку почти все иРНК в зре-

Размеры ядра зависят от количества содержащейся в нем ДНК. Самые мелкие ядра достигают примерно 1 мкм в диаметре и обнаружены у одноклеточных эукариот — пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Диаметр ядра у многих многоклеточных организмов достигает 5–10 мкм. Ядра ооцитов лягушки *Xenopus laevis* в диаметре достигают 400 мкм. Из-за своих крупных размеров (1 мм диаметром), а также из-за легкой доступности эти ооциты и их ядра широко используются в различных биологических и биохимических исследованиях. После разрушения ооцитов ядра осаждаются под действием силы тяжести и могут быть отделены от цитоплазмы. Изолированные ядра можно исследовать биохимическими методами, а также морфологически, в световом и электронном микроскопе. Также относительно просто осуществлять микроинъекции в ядро или в цитоплазму интактного ооцита, что делает *Xenopus* ценным объектом для исследования транспорта макромолекул из ядра в цитоплазму.

У большинства клеток ядро обладает сферической или удлинённой формой, что обеспечивает минимальную площадь поверхности, ограничивающую определенный объем. В различных клетках общий объем, занимаемый ядром, широко варьирует: от 1–2% у дрожжей до 10% у большинства соматических клеток. У клеток, для которых не характерны такие цитоплазматические фун-

5.2 В зависимости от типа организма и клеток ядро выглядит по-разному

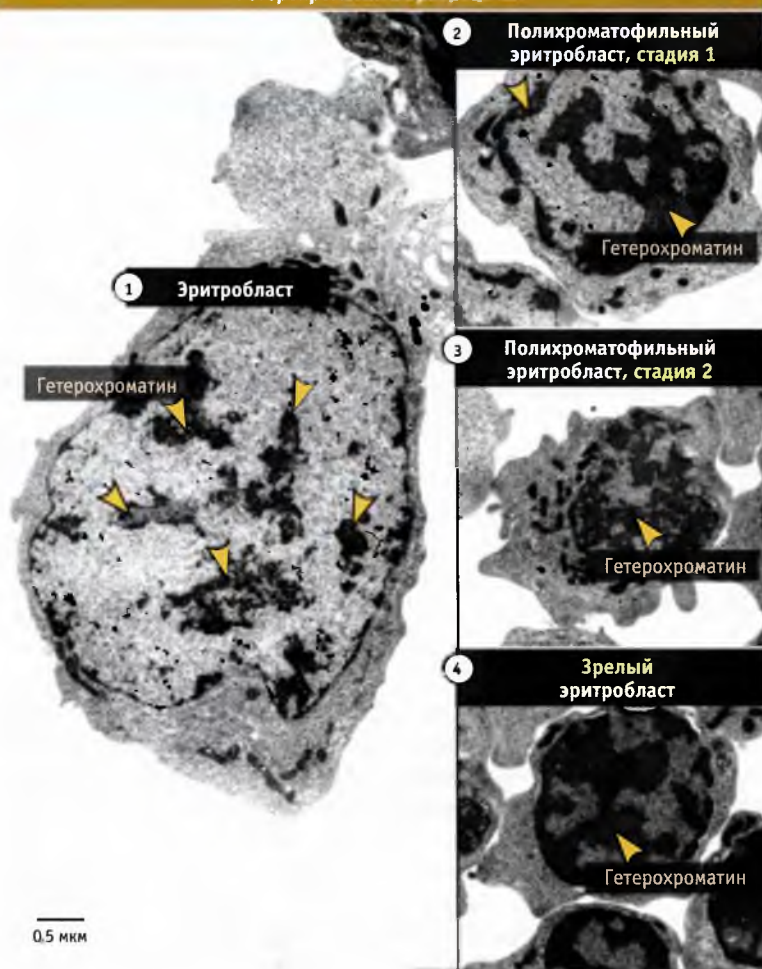
Основные положения

- Диаметр ядер колеблется от одного микрона (1 мкм) до более чем 10 мкм
- Большинство клеток содержит одно ядро, однако некоторые клетки содержат несколько ядер; есть и такие, которые вообще не содержат ядра
- Доля гетерохроматина у разных клеток варьирует, и по мере степени дифференцировки клеток она увеличивается



РИС. 5.4. Эмбрион *Drosophila*, находящийся на ранней стадии развития. ДНК окрашена DAPI. Фото любезно предоставлено Шароном Бискемем, Колледж в Дартмуте

В процессе дифференцировки эритроидных клеток происходит экспрессия нескольких генов, возрастает доля гетерохроматина, и клетка уменьшается в размере. Фото любезно предоставлено Терри Алленом, Институт раковых исследований Патерсона



лых эритроцитах представлены глобиновой мРНК. В некоторых организмах ядро эритроцита в конце концов выбрасывается, оставляя мембранный «мешок», содержащий гемоглобин и другие белки, необходимые для переноса кислорода и углекислоты в крови. Характерно, что только после потери ядра красные кровяные клетки приобретают новую форму — двояковогнутого диска. В дальнейшем эта форма играет критическую роль при прохождении эритроцита через тончайшие капилляры.

Одна из удивительных характеристик цитоплазмы заключается в ее компартментализации на ограниченные мембранами органеллы, которые обеспечивают оптимальное окружение для выполнения специфических клеточных функций. Напротив, ядро не содержит внутренних мембран, однако оно обладает внутренней организацией. В ядре существует много субкомпарментов, которые обеспечивают необходимое биохимическое окружение, оптимальное для выполнения ими важных задач. В настоящем разделе мы рассмотрим общие вопросы организации хромосом. В разделах 5.4 *Ядро содержит субкомпарменты, которые не окружены мембраной* и 5.5 *Некоторые процессы происходят в определенных ядерных сайтах и определяются их структурами* мы обсудим локализацию таких ядерных процессов, как сборка субъединиц рибосом и репликация ДНК.

Набор хромосом в ядре характеризуется строгой организацией. Эта организация проявляется при окрашивании фиксированных препаратов специфическими красителями, которые по-разному красят разные хромосомы. Исследование препаратов во флуоресцентном микроскопе показывает, что хромосомы не переплетаются между собой (рис. 5.6). Напротив, они

5.3 Каждая хромосома занимает отдельную территорию

Основные положения

- Хотя в ядре отсутствуют внутренние мембраны, ядра клеток являются высокоорганизованными структурами и содержат много субкомпарментов
- Каждая хромосома занимает отдельную область или территорию, что предохраняет их от взаимного переплетения
- Ядро содержит как хромосомные домены, так и межхромосомные области



Отдельные хромосомы занимают в ядре определенные области, которые называются территориями хромосом. С разрешения Company of Biologists Ltd из: Spector, D. L. J. Cell Sci. 2001. 114: 2891–2893. Фотография любезно предоставлена Томасом Рейдом

обнаруживают пространственную упорядоченность, и каждая хромосома расположена в специальной области, называемой регион, домен или территория хромосомы. Если бы хромосомы перепутались между собой, то во избежание возникновения разрывов они должны были бы распутаться перед сегрегацией до наступления митоза. Однако, поскольку каждая хромосома занимает свой регион, такой проблемы не возникает. Мы не знаем, каким образом хромосома сохраняет за собой свою территорию, но во многих типах клеток концы хромосом, называемые теломеры, прикреплены к ядерной оболочке. Вероятно, это предотвращает перекручивание хромосом друг с другом.

Хроматин не заполняет все ядро. Существуют области его преимущественной локализации (**хромосомные домены**) и примыкающие к ним, но не содержащие хроматина, которые называются **межхромосомные домены** (рис. 5.6). Последние содержат поли(А)⁺РНК, находящиеся на последнем этапе процессинга, и диффундирующие к периферии ядра, на экспорт (см. рис. 5.53; 5.22 *гяРНК транспортируются из мест процессинга в ЯПК*).

Существует еще один уровень организации хромосом, который определяет, какие гены непосредственно примыкают к межхромосомным доменам, а какие нет. Чувствительные методы гибридизации *in situ* и техника анализа изображений позволяют определить, в каком месте ядра располагается определенный ген и его транскрипты. Было установлено, что интенсивно транскрибируемые гены локализуются преимущественно по периферии хроматиновых доменов, примыкая к межхромосомным территориям. Поскольку в разных клетках активны различные гены, предполагается, что тип генов, примыкающих к межхромосомным регионам, зависит от типа клеток. Организация хромосом в пределах их тер-

риторий жестко не закреплена и зависит от изменений в характере экспрессии генов (см. 5.2 *В зависимости от типа организма и клеток ядро выглядит по-разному*). В зависимости от расположения по отношению к межхромосомным доменам, иРНК для наиболее представленных белков более быстро диффундируют через эти домены в ЯПК, способствуя выходу в цитоплазму. Вместе с тем, активно транскрибируемые гены часто локализованы рядом с ЯПК, что благоприятствует эффективному экспорту соответствующих иРНК в цитоплазму (подробнее об ЯПК см. 5.9 *Ядерные поровые комплексы представляют собой симметричные каналы*).

5.4 Ядро содержит субкомпарменты, которые не окружены мембраной

Основные положения

- Ядерные субкомпарменты не окружены мембраной
- В ядрышках образуются рРНК и субъединицы рибосом
- Ядрышки содержат ДНК, которая кодирует рРНК и которая присутствует во многих хромосомах
- Факторы сплайсинга иРНК хранятся в ядерных сайтах и мигрируют к местам транскрипции, где проявляют свои функции
- Прочие ядерные тельца могут быть обнаружены с помощью антител, однако функции большинства их неизвестны

Происходящие в ядре ключевые события включают такие этапы экспрессии генов, как транскрипция и процессинг РНК. Эти процессы локализованы в различных ядерных сайтах. Больше всего мы знаем о функциях ядрышек. Описаны и другие субкомпарменты, однако функции их по большей части неизвестны.

Наиболее изученными субкомпартментами ядра являются ядрышки (см. рис. 5.1 и 5.2). Большинство клеток содержит по одному ядрышку, однако иногда в клетках находятся по несколько ядрышек (рис. 5.1). Ядрышко представляет собой место синтеза и процессинга рРНК, а также сборки субъединиц рибосом. Размеры ядрышек варьируют и определяются особенностями биогенеза рибосом в данной клетке.

Ядрышко содержит все компоненты, необходимые для формирования субъединиц рибосом, и является сайтом эффективной сборки этих структур. К числу необходимых компонентов относятся гены рРНК многих хромосом, сами рРНК, ферменты синтеза и процессинга рРНК, и рибосомные белки, импортируемые из цитоплазмы. В пределах ядрышка находятся много морфологически-различных областей (рис. 5.7), что согласуется с представлением о существовании в этом субкомпартменте разных сайтов для транскрипции генов рРНК, ее процессинга и сборки субъединиц.

Хотя ядрышко не имеет мембраны, большая часть белков и РНК, характерных для этой структуры, находится только там и не обнаруживается в других местах ядра. Ядрышко присутствует только в момент сборки субъединиц рибосом. Оно исчезает при ингибировании транскрипции рРНК и появляется вновь при ее возобновлении. Таким образом, считается, что ядрышко образуется в результате объединения генов рРНК, транскрипционных факторов, связанных с промоторами генов рРНК, и молекул РНК-полимеразы I, которая появляется под влиянием факторов транскрипции. В свою очередь, вновь синтезированные молекулы рРНК вызывают последовательное появление рибосомальных белков и многих факторов необходимых для сборки субъединиц рибосом (см. MBIO:5-0001). В каком порядке происходят эти процессы, мы не знаем. При вступлении клетки в митоз ядрышко исчезает, а после его завершения снова появляется. Все это также происходит по неизвестному механизму.

Функция ядрышка не ограничивается участием в биогенезе субъединиц рибосом. В ядрышке расположены гены тРНК, происходит их транскрипция и начинается процессинг тРНК. Там также находится много белков, которые не участвуют в образовании субъединиц рибосом. Во многих случаях мы не знаем, почему белки локализованы в ядрышке. Иногда белки, локализованные в ядре, могут собираться в ядрышке и затем быстро высвобождаться в нуклеоплазму для выполнения своих функций. К числу таких белков относятся некоторые белки, регулирующие клеточный цикл (см. MBIO:5-0002). Протеомика белков ядрышек культур клеток человека показала, что они содержат более 400 различных полипептидов, и 30% из них представляют собой новые, неохарактеризованные белки.

Также в ядре было обнаружено несколько других небольших дискретных субкомпартментов. Для этого использовали антитела, выделенные из сыворотки больных с аутоиммунными заболеваниями или полученные к специфическим ядерным белкам. Эти антитела поз-

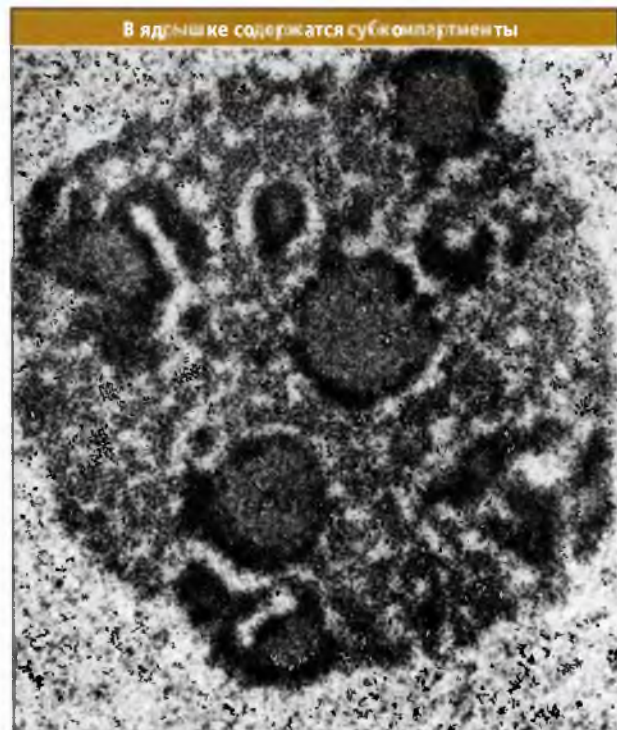


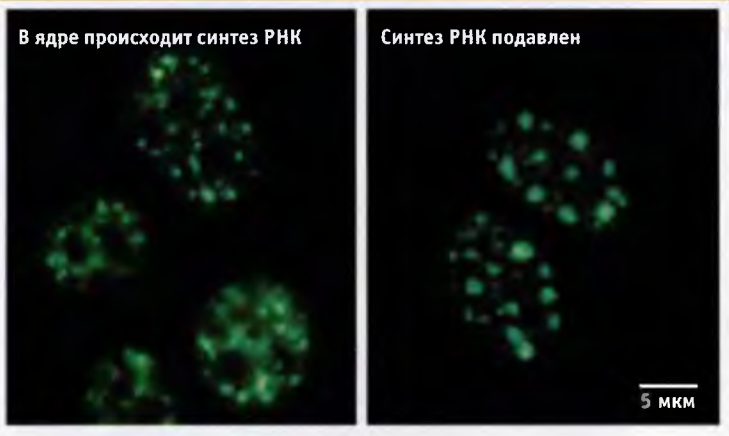
РИС. 5.7. Субкомпартменты ядрышка, видимые в электронном микроскопе. Фотография любезно предоставлена Доном В.Фаусеттом. Из *The Cell*, 1981. Фотография Дэвида М. Филлипс, The Population Council

воляют визуализировать дискретные субкомпартменты с помощью флуоресцентных методов и в некоторых случаях при иммуноэлектронной микроскопии, поскольку они невидимы в световом микроскопе. Иногда эти субкомпартменты присутствуют во многих типах эукариотических клеток, они не ограничены мембранами и называются ядерные тельца. К числу их относятся точкообразные тельца («спеклы»), тельца Кахаля, тельца Джемини и тельца PML. Одна из функций ядерных телец может заключаться в повышении эффективности биологических процессов за счет концентрации в определенном месте всех макромолекул, необходимых для протекания какого-либо процесса.

Факторы сплайсинга РНК в ядре пространственно организованы в **спеклы**. На рис. 5.8 видно, что факторы сплайсинга не только концентрируются в клетке примерно в 20–50 спеклах, но и расположены во многих местах диффузно. Места диффузного расположения называются интерхроматиновые гранулы. Поскольку спеклы не содержат пре-иРНК, считается, что они служат лишь хранилищами факторов сплайсинга, но не осуществляют сам процесс. Сплайсинг происходит в диффузных областях, в которых наряду с факторами сплайсинга обнаружена полиаденилированная РНК. На рис. 5.8 представлены результаты эксперимента, подтверждающего эту точку зрения. Если блокировать транскрипцию ингибитором РНК-полимеразы II, то не наблюдается диффузного распределения факторов сплайсинга, поскольку они перемещаются в

В ядре происходит синтез РНК

Синтез РНК подавлен



Факторы сплайсинга сосредоточены в ядерных спеклах. Более диффузные сайты, в которых можно обнаружить эти факторы, представляют собой сайты процессинга пре-иРНК (слева). Добавление актиномицина вызывает блок транскрипции (справа). Спеклы визуализировались методом непрямой иммунофлуоресценции с использованием антител к β -компоненту фактора сплайсинга U2мРНК. Фотография любезно предоставлена Дэвидом Спектором, Лаборатория в Колд Спринг Харборе

спеклы. Когда транскрипция с участием РНК-полимеразы II возобновляется, факторы вновь появляются в областях диффузного распределения.

Некоторые факторы сплайсинга локализованы в других структурах, **тельцах Кахаля** или спирализованных тельцах (рис. 5.4). Обычно в ядре находится лишь одно или несколько телец Кахаля, которые часто расположены вблизи ядрышек. Эти тельца содержат белок, который называется коилин и не присутствует в спеклах. Мы знаем, что тельца Кахаля не участвуют в ферментативном сплайсинге, поскольку не содержат пре-иРНК, однако они содержат малые ядерные и малые ядрышковые РНК (мяРНК и мягРНК) и представляют собой сайты посттранскрипционной модификации этих РНК и сборки РНП комплексов (подробнее о мяРНК см. MBIO:5-0003 и 5.24 УмяРНК экспортируются, модифицируются, собираются в комплексы и импортируются. Подробнее о мягРНК см. MBIO:5-0004 и EXP:5-0001). На рис. 5.9 также видно еще одно ядерное **тельце Джемини** или

тельце GEM. Тельца Джемини не обнаружены во всех клетках, и некоторые их компоненты также присутствуют в тельцах Кахаля, что позволяет предполагать, что они могут выполнять сходные функции.

К числу ядерных субкомпарментов относятся тельца PML. Они получили свое название потому, что содержат белок, близкий к впервые обнаруженному у больных промиелоцитарным лейкозом (PML). Впервые PML-тельца были идентифицированы с помощью антител, выделенных из сыворотки крови лейкозных больных. Белок PML, вместе со многими другими белками, образует PML тельца, однако их функция остается невыясненной. Они не участвуют в репликации ДНК, транскрипции и процессинге РНК, а также не являются хранилищем факторов сплайсинга.

Многие из этих небольших ядерных телец, вероятно, отсутствуют в мелких ядрах таких одноклеточных эукариот, как дрожжи. Однако в клетках дрожжей находятся ядерные тельца, напоминающие тельца Кахаля. Возможно, что также присутствуют и другие тельца, однако, поскольку они по размерам существенно меньше, чем в ядрах клеток млекопитающих, их гораздо труднее обнаружить.



Тельца Кахаля и тельца GEM можно обнаружить методом непрямой иммунофлуоресценции с применением антител. Фотография воспроизведена из работы Spector, D. L. J. Cell Sci. 2001. 114: 2891-2893. С разрешения Company of Biologists Ltd. С любезного разрешения Грегга Матера

5.5 Некоторые процессы происходят в определенных ядерных сайтах и определяются их структурами

Основные положения

- В ядре содержатся сайты репликации, в которых образуется ДНК
- Ядро может содержать ядерный скелет, который помогает организовать его функции

В предыдущих разделах мы рассмотрели некоторые ядерные домены и субкомпарменты, которые обладают уникальным составом и функциями (см. 5.3 Каждая хромосома занимает отдельную территорию

Фабрики репликации ДНК



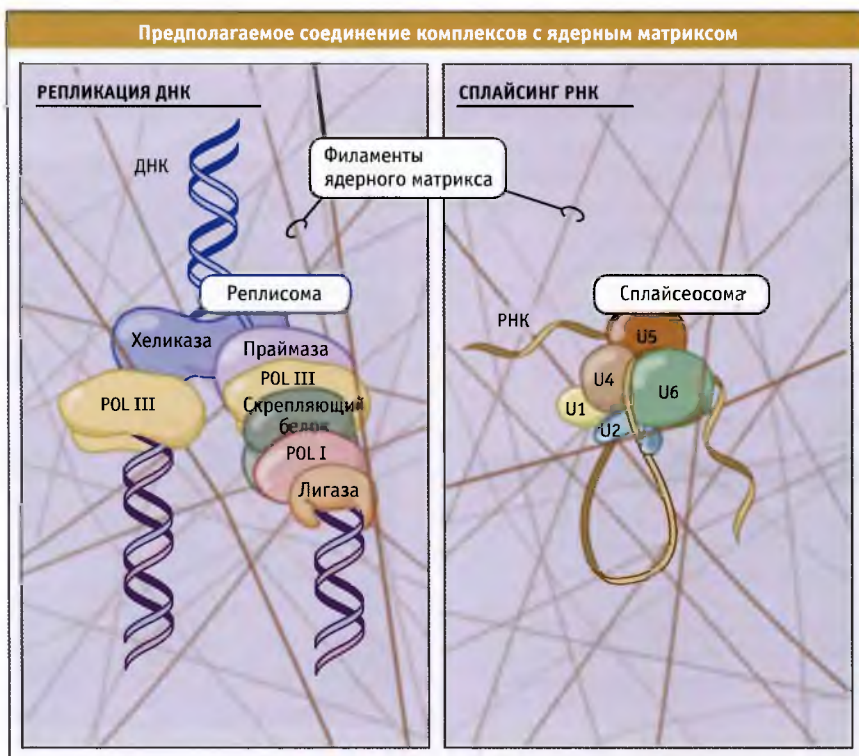
Репликация ДНК происходит в ограниченном количестве сайтов, которые называются фабрики репликации. ДНК метится бромдезоксимурином (BrdU) и визуализируется с использованием антител к BrdU, конъюгированных с флуорофором. Представлены фотографии клеток в различные промежутки времени после митоза. Из работы Hozak, P., Jackson, D.A., and Cook, P.R. *J. Cell. Sci.* 1994. 107: 2191–2202. С разрешения Company of Biologists Ltd. Фотографии любезно предоставлены Питером Куком

и 5.4 Ядро содержит субкомпарменты, которые не окружены мембраной). В ядре также происходят другие процессы, например репликация ДНК. Считается, что макромолекулярные аппараты репликации и сплайсинга могут быть связаны с определенными структурами ядра.

В ранней S-фазе цикла, когда происходит синтез ДНК, в клетке существует много сайтов репликации. По мере протекания синтеза они сливаются, и в результате остаются лишь несколько десятков более крупных сайтов. Эти крупные сайты называются фабрики репликации ДНК. На рисунке показано распределение этих фабрик в различных стадиях S-фазы. Поскольку в каждый момент времени количество точек начала репли-

кации превышает количество фабрик репликации, то каждая фабрика должна содержать десятки или сотни точек начала репликации. Аналогичные исследования позволяют предполагать, что транскрипция также может происходить в ограниченном количестве сайтов, называемых фабрики транскрипции.

Локализация биосинтетических процессов в отдельных сайтах позволяет предполагать существование в ядре некой опорной структуры. Упорядоченная скелетная структура, напоминающая цитоскелет, в ядре отсутствует. Однако некоторые исследования позволяют предполагать наличие в ядре сетчатой структуры, которая называется **ядерный матрикс**. В отличие от цитоскелета матрикс становится видимым только после



Ферментативные фабрики, осуществляющие репликацию ДНК и сплайсинг РНК, могут быть связаны с ядерным матриксом

обработки ядра детергентами, ДНКазой и растворителями высокой ионной силы. При такой обработке удаляется много компонентов, включая почти всю ДНК и мембраны, а остаются только нерастворимые белки и часть РНК. Матрикс содержит короткие волокна, по размеру близкие к промежуточным филаментам, актину (но не к его фибриллярной форме) и ко многим другим белкам. Эти компоненты не организуются в более крупные структуры.

Поскольку ядерный матрикс растворим относительно плохо, его трудно изучать как целое. Некоторые исследователи полагают, что ядерный матрикс представляет собой артефактную структуру, поскольку становится видимым только после жесткой процедуры экстракции. Однако, поскольку в ядре происходят многие важные и сложные процессы, которые должны выполняться с максимальной точностью, возможно существование некой организующей опорной структуры (см. 6.4 В молекуле ДНК эукариот существуют петли и домены, посредством которых она прикрепляется к опорным структурам и 6.5 ДНК присоединяется к интерфазному матриксу посредством специфических последовательностей).

К числу возможной функции опорной ядерной структуры относится организация молекулярных машин репликации, транскрипции и процессинга РНК, которые представлены реплисомой, комплексом РНК-полимеразы II–холофермент и сплайсосомой соответственно. Хотя эти большие мультисубъединичные комплексы обладают гораздо меньшей массой, чем хромосомы, по размеру они превышают свои субстраты — нуклеиновые кислоты. Данные исследования структуры этих комплексов показывают, что они обладают специальной канавкой, обеспечивающей прохождение цепи нуклеиновой кислоты по комплексу (см. MBIO:5-0005 и MBIO:5-0004). По данным многих исследований, эти комплексы присоединены к опорной ядерной структуре (рис. 5.11). Это означает, что когда начинается репликация, транскрипция и сплайсинг, соответствующие молекулярные машины фиксируются, и через них продвигаются нуклеиновые кислоты.

5.6 Ядро окружено ядерной оболочкой

Основные положения

- Ядро окружено оболочкой, состоящей из двух мембран
- Наружная ядерная мембрана является продолжением мембран ЭПР, а перинуклеарное пространство (просвет) переходит в просвет ЭПР
- В ядерной оболочке присутствуют многочисленные ЯПК, которые представляют собой единственные каналы обмена молекулами и макромолекулами между ядром и цитоплазмой

Ядро окружено оболочкой, состоящей из двух concentrically расположенных **наружной** и **внутренней ядерных мембран** (рис. 5.2). Каждая мембрана содержит определенный набор белков и сплошной двойной

слой фосфолипидов. За исключением некоторых одноклеточных эукариот, внутренняя ядерная мембрана поддерживается сетью филаментов, закрепленных в сетчатой структуре. Эта сеть филаментов называется ядерная ламина (см. 5.7 Ядерная ламина подстилает ядерную оболочку).

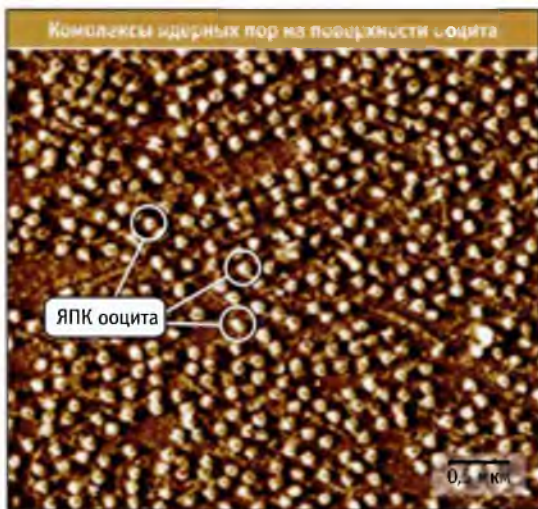
Наружная ядерная мембрана переходит в мембраны ЭПР и, так же как большая часть его мембран, покрыта рибосомами, принимающими участие в синтезе белка. На рис. 5.12 показана связь наружной мембраны с ЭПР.

Пространство между наружной и внутренней ядерными мембранами представляет собой перинуклеарное пространство (ПП). Так же как наружная мембрана связана с мембраной ЭПР, ПП ядерной оболочки контактирует с внутренним пространством ЭПР (рис. 5.12). Толщина каждой из двух мембран составляет 7–8 нм (нм), а ширина **ПП ядерной оболочки** — 20–40 нм.

При исследовании препаратов ядерной оболочки в электронном микроскопе, наиболее заметной особенностью структуры являются ЯПК (ядерные поровые комплексы), которые служат каналами транспортировки большинства молекул между ядром и цитоплазмой (см. 5.9 Ядерные поровые комплексы представляют собой симметричные каналы). Оболочка ядер большинства клеток содержит около 10–20 ЯПК на квадратный микрон поверхности. Так, клетки дрожжей содержат 150–250 ЯПК, а соматические клетки млекопитающих 2000–4000. Однако некоторые клетки обладают гораздо большей плотностью пор, вероятно, потому, что для них характерна высокая интенсивность процессов транскрипции и трансляции, что предполагает транспорт большого количества макромолекул в ядро и из него. Например, поверхность ядра ооцитов амфибий почти полностью покрыта ЯПК (рис. 5.13).



Рис. 5.12 Ядерная оболочка соединена с ЭПР. Фотография любезно предоставлена Терри Алленом, Институт Патерсона



Поверхность ядерной мембраны ооцита *Xenopus laevis* покрыта комплексами ядерных пор. Фотография получена с помощью сканирующего микроскопа с атомным разрешением и воспроизводится из работы J. Mol. Biol., vol. 287, Stoffler, D., et al., *Calcium-mediated Structural Changes...*, pp. 741–752. © С разрешения Elsevier. С любезного разрешения Ули Эби, Университет Базеля

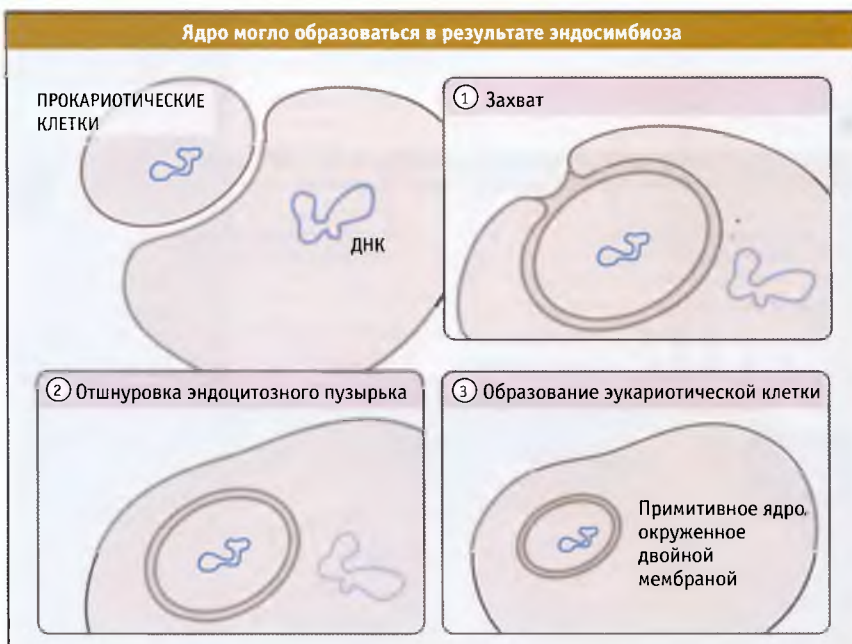
Каким образом могла возникнуть двойная ядерная мембрана? В эукариотической клетке, митохондрии и хлоропласты также имеют двойную мембрану. Согласно гипотезе эндосимбиоза, эти органеллы образовались в ходе эволюции, когда одни клетки захватили других в процессе эндоцитоза. Затем поглощенные клетки оказались окруженными двумя мембранами: своей и мембраной клет-

ки-хозяина. Оказалось, что некоторые из поглощенных клеток проявляют метаболическую активность, например, в отличие от клеток хозяина, способны осуществлять фотосинтез. Наиболее убедительное доказательство в пользу эндосимбиотического происхождения митохондрий и хлоропластов заключается в том, что рибосомы обеих органелл больше напоминают рибосомы современных прокариот, и в меньшей степени эти же микроструктуры цитоплазмы эукариотической клетки. Гораздо менее ясным представляется происхождение ядра. Однако существование двойной ядерной мембраны, подобно мембране митохондрий и хлоропластов, позволяет предполагать, что захваченная прокариотическая клетка превратилась в ядро, содержащее всю клеточную ДНК (рис. 5.7).

5.7 Ядерная ламина подстилает ядерную оболочку

Основные положения

- Ядерная ламина состоит из белков промежуточных филаментов, называемых ламинами
- Ядерная ламина расположена за внутренней ядерной мембраной и физически связана с ней интегральными мембранными белками
- Ядерная ламина участвует в сборке ядерной оболочки и может выполнять функции ее физической поддержки
- Ядерная ламина связана с хроматином посредством белков. Это может обуславливать ее роль в репликации и транскрипции ДНК
- У дрожжей и некоторых других одноклеточных эукариот ядерная ламина отсутствует



Ядро могло образоваться в результате эндосимбиоза, процесса, при котором одна прокариотическая клетка захватывает другую клетку; затем захваченная клетка становится примитивным ядром

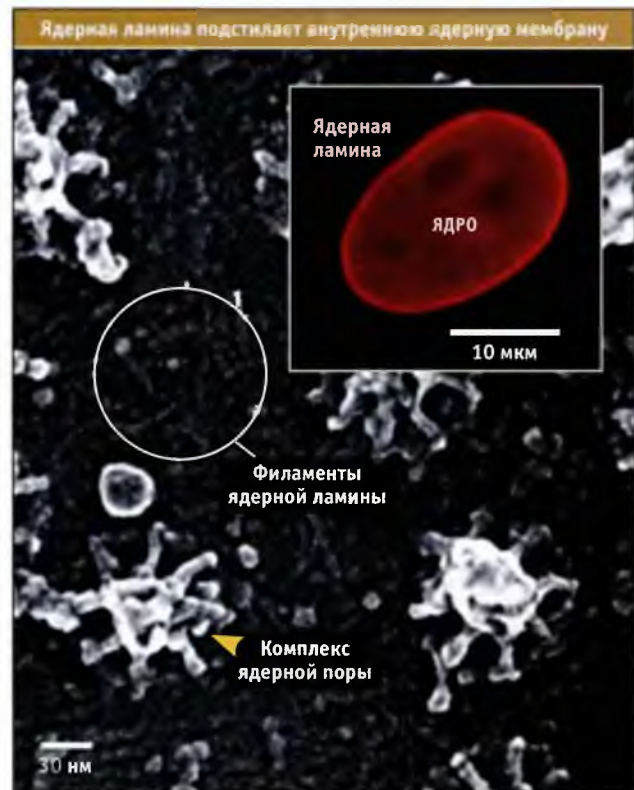


РИС. 5.15. Для визуализации ядерной ламины с помощью флуоресцентной микроскопии использовали антитела к белкам ламины (в рамке). На фотографии, полученной с помощью электронного микроскопа, видны ядерные корзины ЯПК и филаменты ядерной ламины. Фотографии любезно предоставлены Мартином Голдбергом и Терри Алленом, а также Энн и Боб Голдман. Отдел клеточной и молекулярной биологии Медицинской школы Файнберг Северо-Западного университета Чикаго (рамка)

Наличие **ядерной ламины** — сети промежуточных филаментов, расположенной за внутренней ядерной мембраной, является характерным признаком, свойственным ядрам клеток **Metazoa** (см. 9 Промежуточные филаменты). Как показано на рис. 5.15, ламина легко выявляется методом непрямой иммунофлуоресценции, с использованием антител к одному из белков, входящих в ее состав. В электронном микроскопе ламина выглядит как сеть, состоящая из отдельных волокон. На рисунке также представлены типичные неупорядоченные филаменты ламины, расположенные прямо за внутренней ядерной мембраной.

Белки ядерной ламины (называемые ламины) напоминают кератиновые белки промежуточных филаментов цитоплазмы. Так же как и кератины, они называются белками промежуточных филаментов, поскольку образуемые ими филаменты (10–20 нм) по размеру занимают промежуточное положение между актиновыми микрофиламентами (7 нм) и микротрубочками (25 нм). Целостность филаментов ламины нарушается ЯПК, которые прикрепляются к ней (рис. 5.15).

Наряду с белками промежуточных филаментов, ядерная ламина также содержит набор интегральных мембранных белков, которые называются белками, связанными с ламиной (LAP). Некоторые из этих белков участвуют во взаимодействиях между ламиной и внутренней мембраной ядра. Как показано на рис. 5.16, ламина закрепляется на внутренней ядерной мембране двумя типами связей. Один тип образуется между белками ламины и интегральными белками внутренней мембраны ядра. Другой тип возникает при взаимодействии полипептидной цепи ламинов с липидной фарнезильной группой внутренней ядерной мембраны.

Геном растений не содержит генов ядерных ламинов, однако растения содержат другие структурные

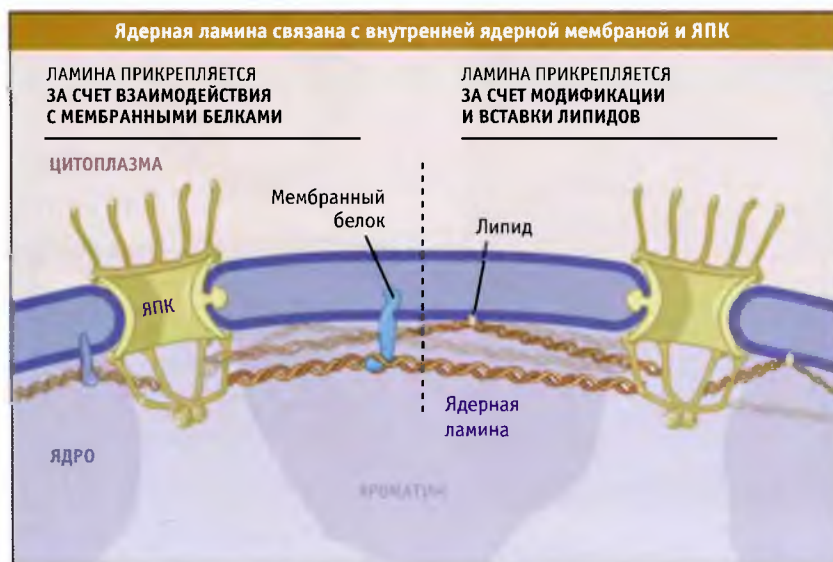


Рис. 5.16. Ядерная ламина сцеплена с внутренней ядерной мембраной двумя типами связей

белки, которые выполняют такие же функции, как и ламины клеток млекопитающих. Дрожжи (*S. cerevisiae* и *S. pombe*) и некоторые другие одноклеточные эукариоты не содержат ламин, и поэтому не образуют ламин. С чем это может быть связано? Существуют, по меньшей мере, две возможные причины, объясняющие отсутствие ламин у одноклеточных различием в величине ядер у клеток дрожжей (около 1 мкм в диаметре) и многоклеточных организмов (порядка 10 мкм в диаметре). Первая возможность заключается в том, что для дрожжевых клеток характерен закрытый митоз, при котором ядерная оболочка в течение всего времени остается интактной. Напротив, в клетках многоклеточных эукариот ядерная оболочка разрушается в начале митоза. После сегрегации хромосом вокруг каждого их набора образуется новая ядерная оболочка. Считается, что в это время ламина играет главную роль в перестройке организации ядра. Во-вторых, ламина может обеспечивать дополнительную структурную поддержку для более крупной ядерной оболочки в клетках **Metazoa** (подробнее о роли ламин в митозе см. 11.10 В митозе происходит много морфологических изменений).

Наряду с той ролью, которую ядерная ламина выполняет в сборке и поддержании структуры ядра, ее взаимодействие с хроматином может представляться необходимым для протекания репликации ДНК. Данные, свидетельствующие о роли ядерной ламин в репликации, были получены в экспериментах, в которых хроматин сперматозоидов *Xenopus laevis* добавляли к

экстрактам яйцеклеток. При этом вокруг хроматина отмечалось образование ядерной оболочки (рис. 5.17). Эти ядра увеличивались в размерах, и происходила деконденсация хромосом, находившихся в ядрах сперматозоидов в конденсированном состоянии (деконденсация маскирует картину, которая наблюдается при оплодотворении, когда ДНК сперматозоида взаимодействует с некоторыми факторами в ооцитах). Затем в этих ядрах происходит репликация ДНК. В экстрактах яйцеклеток в большом количестве содержатся ядерные ламин и LAP. После удаления ламин из этих экстрактов с помощью иммобилизованных антител к белкам ламин формирование ядерной оболочки вокруг хроматина сперматозоидов еще возможно. Однако ядра маленькие и хрупкие, и репликации ДНК в них не происходит. Эти результаты свидетельствуют о том, что ламина может играть важную роль в организации хроматина и репликации ДНК.

Повышенная хрупкость клеток связана с мутациями, затрагивающими белки промежуточных филаментов. Мутации в ламинах и LAP обуславливают развитие ряда генетических заболеваний, особенно поражающих мышечную систему. Эти заболевания называются ламинопатиями. По-видимому, изменения ламин придают ядру хрупкость и большую чувствительность к повреждениям. Особенно склонны к повреждениям мышечные клетки, поскольку при сокращении мышц ядра их клеток испытывают большую механическую нагрузку, чем ядра клеток других тканей.



Рис. 5.17. Когда у сперматозоидов *Xenopus laevis* удаляют плазматическую мембрану и инкубируют их с экстрактом яйцеклеток, происходит деконденсация хроматина и вокруг него образуется функционально-активная ядерная оболочка. Флуоресценция обнаруживает локализацию ДНК. Фотографии любезно предоставлены Дугласом Форбсом, Калифорнийский университет, Сан Диего

5.8 Между ядром и цитоплазмой осуществляется активный транспорт больших молекул

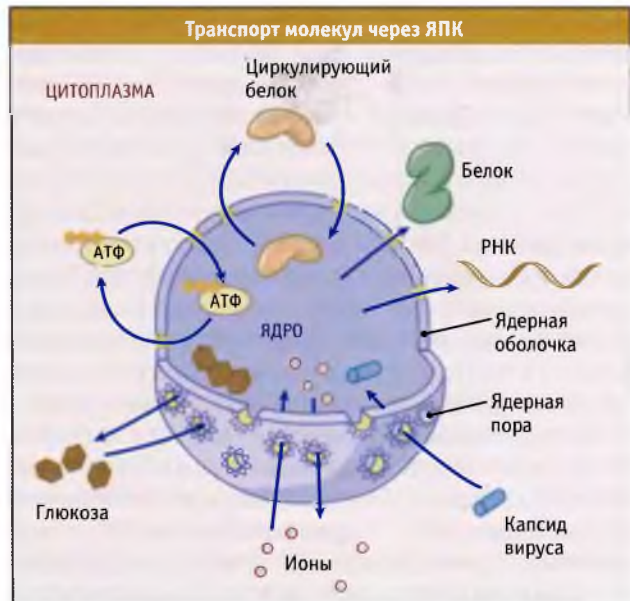
Основные положения

- Через мембраны ядерной оболочки могут проходить незаряженные молекулы менее 100 Да
- Молекулы более 100 Да (включая макромолекулы) проходят через ЯПК ядерной оболочки
- Частицы до 9 нм диаметром (соответствующие глобулярным белкам до 40 кДа) могут проходить через ЯПК за счет пассивной диффузии
- Более крупные макромолекулы активно транспортируются через ЯПК, причем для этого они должны содержать специальную информацию.

Незаряженные молекулы менее 100 Да, включая молекулы воды, могут свободно диффундировать через фосфолипидный бислой, однако все остальные молекулы и макромолекулы транспортируются через ЯПК (ядерный комплекс поры) в ядерной оболочке. Процесс транспорта через ЯПК называется транслокация. На рис. 5.38 представлены различные классы молекул, которые проходят в ядро и выходят из него через ЯПК.

Транспорт молекул (>100 Да) и макромолекул между ядром и цитоплазмой можно исследовать, используя соединения, меченные радиоактивными изотопами или флуоресцентными красителями. Эти соединения вводят в цитоплазму или в ядра крупных клеток, таких как, например, ооциты амфибий. Локализация молекул, меченных радиоактивными изотопами, определяется после выделения ядерной и цитоплазматической фракции клеток, а локализация соединений, меченных красителями — с помощью флуоресцентной микроскопии. Исследования, проведенные с использованием этих методов, показали, что относительно небольшие молекулы таких соединений, как глюкозо-6-фосфат или флуоресцеин, проходят через ядерную оболочку очень быстро — в течение нескольких секунд. В состоянии равновесия концентрация таких соединений по обеим сторонам ядерной оболочки одинакова. Мы полагаем, что транспорт этих небольших молекул происходит за счет прямой диффузии, поскольку он осуществляется с одинаковой скоростью как при температуре 4 °С, так и при физиологических ее значениях.

Максимальный размер частиц, способных свободно диффундировать через ядерную оболочку, определяли путем инъекции частиц золота определенного размера с одной стороны ядерной оболочки и регистрации их появления с другой стороны. Как показано на рис. 5.39, при помощи таких исследований удалось выяснить, что частицы размером 9 нм и менее могут поступать в ядро и выходить из него за счет пассивной диффузии через ядерные поры. Такой диаметр соответствует молекуле глобулярных белков массой около 40 кДа. Поскольку скорость диффузии частицы пропорциональна ее величине, поскольку более крупные частицы проникают в



Через ЯПК транспортируется много различных молекул и макромолекул. Не показаны небольшие, незаряженные молекулы (< 100 Да), которые способны диффундировать через мембраны ядерной оболочки

обоих направлениях медленнее, чем более мелкие. Скорость диффузии одинакова в обоих направлениях.

Молекулы белков, размеры которых превышают 9 нм, не могут свободно диффундировать через ядерные поры и переносятся в процессе активного селективного транспорта. К такому заключению пришли на основании экспериментов, в которых в цитоплазму клетки вводили белки различного размера. Было показано, что лишь некоторые белки способны проникать в ядро, причем скорость их транспорта не связана с величиной молекул. Такие же закономерности существуют и для экспорта белков из ядра. Эти эксперименты показали, что ядерный импорт и



Когда частицы золота различных размеров, покрытые поливинилпирролидоном, вводят в клетку, частицы меньше либо равные 9 нм проходят через ЯПК за счет пассивной диффузии

экспорт белков представляют собой избирательные процессы. Они не происходят при недостатке АТФ и при 4 °С, что свидетельствует об их энергозависимом характере. Ниже мы обсудим вопрос о том, что причина транспорта в ядро и выхода из него только определенных белков заключается в том, что они содержат специальные сигналы, позволяющие им транспортироваться через оболочку ядра (см. 5.11 Белки избирательно транспортируются в ядро через ядерные поры).

5.9 Ядерные поровые комплексы представляют собой симметричные каналы

Основные положения

- ЯПК представляют собой симметричные структуры, расположенные в местах слияния внешней и внутренней ядерной мембран
- В клетках человека каждый ЯПК обладает массой около 120×10^6 Да, что в 40 раз больше массы рибосомы, и состоит из множества копий молекул, включающих ~30 белков
- ЯПК содержит филаменты, простирающиеся в цитоплазму, и напоминающие корзину структуры, проникающие в ядро

ЯПК ядерной мембраны представляют собой единственные каналы, которые связывают ядро и цитоплазму. В клетках человека ЯПК имеют молекулярную массу около 120×10^6 Да и наружный диаметр порядка 120 нм. Общая масса ЯПК в 40 раз превышает массу эукариотической рибосомы. Комплекс ядерной поры состоит из многих копий примерно 30 разных полипептидов, нуклеопоринов (см. 5.10 Ядерные поровые комплексы состоят из нуклеопоринов). В противоположность ЯПК, рибосомы содержат по одной копии четырех типов РНК, и около 80 различных полипептидов.

ЯПК представляют собой бочкообразные структуры, проходящие через ядерную оболочку и несколько выступающие за пределы обеих мембран, образуя структуры кольцообразной формы. Как показано на рис. 5.20, для большинства ЯПК характерна симметрия восьмого порядка. Со стороны ядра и цитоплазмы пора выглядит по-разному (и рис. 5.21). Части ЯПК, выступающие в нуклеоплазму и цитоплазму, называются терминальными структурами. С цитоплазматической стороны ЯПК терминальные структуры представляют собой восемь относительно коротких фибрилл, которые распространяются в цитоплазму на расстояние около 100 нм. Со стороны ядра аналогичные фибриллы образуют кольцо (рис. 5.20). Эта структура называется ядерная корзина или «верша». У некоторых клеток многоклеточных организмов от ядерной корзины вглубь ядра направляются дополнительные фибриллы. Со стороны цитоплазмы и ядра терминальные структуры являются местами контакта транспортируемых молекул на входе и выходе из ЯПК (см. 5.11 Белки избирательно транспортируются в ядро через ядерные поры).

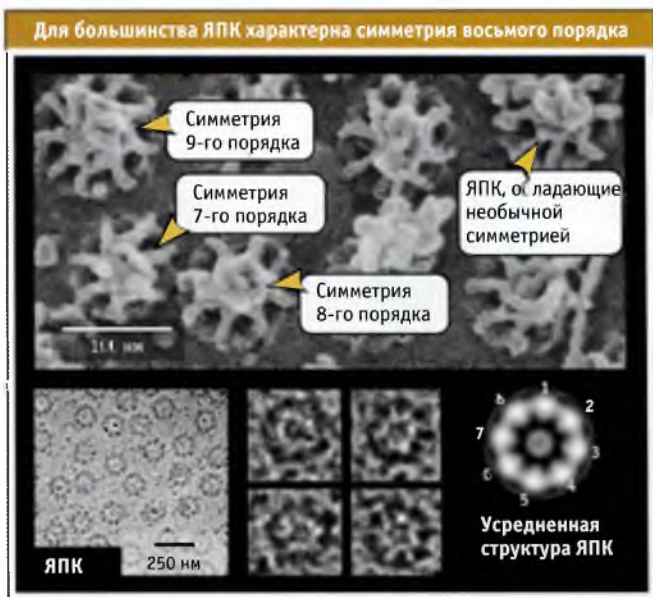


Рис. 5.20. ЯПК характеризуется осью симметрии восьмого порядка, расположенной перпендикулярно оболочке ядра. Иногда встречаются поры, обладающие симметрией седьмого или девятого порядка. Симметрия восьмого порядка легко видима на увеличенных изображениях отдельных ЯПК (фотографии внизу). Усредненная микрофотография в электронном микроскопе, полученная по результатам нескольких сотен отдельных фотографий (внизу справа). Фотография (наверху) любезно предоставлена Мартином Голдбергом и Терри Алленом и воспроизведена из *Journal of Molecular Biology*, Vol. 328, Stoffler, D. et al., *Cryo-Electron Tomography Reveals Novel Insights...*, 119–130. © 2003 с разрешения Elsevier. Фотография любезно предоставлена Ули Эби, Университет Базеля (внизу)



Рис. 5.21. ЯПК обладают различными терминальными структурами. Как показывают исследования в электронном микроскопе, со стороны ядра по форме они напоминают корзину (слева), а со стороны цитоплазмы представлены фибриллами (справа). Фотографии воспроизведены из *J. Struct. Biol.*, vol. 140, Fahrenkrog B., et al. *Domain-specific Antibodies...* pp. 254–267. © 2002 с разрешения Elsevier. Фотография любезно предоставлена Ули Эби, Университет Базеля

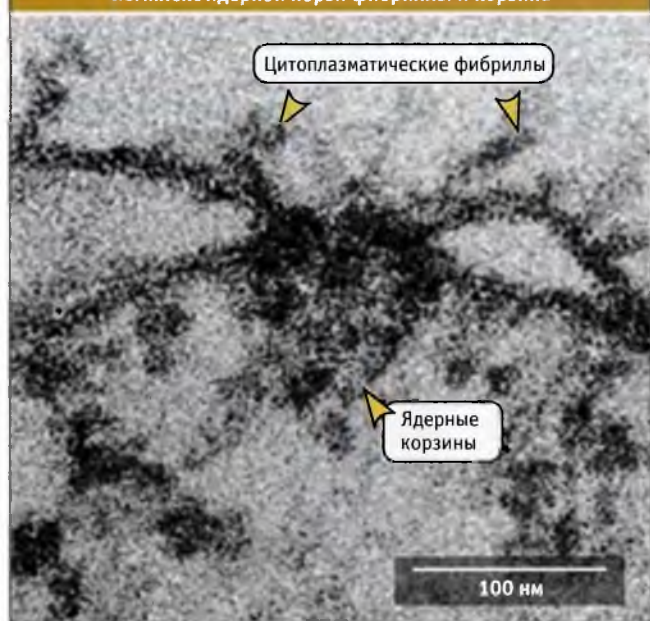


Рис. 5.22. Цитоплазматические фибриллы и ядерные корзинки ядерных пор, видимые в трансмиссионном электронном микроскопе. Фотография воспроизведена из *The Journal of Cell Biology*, 1998, vol. 143, pp. 577–588. © The Rockefeller University Press. Фотография любезно предоставлена Ули Эби, Университет Базеля

Модели, описывающие строение ядерной поры, были предложены на основании анализа сотен электронных микрофотографий отдельных ЯПК, полученных при высоком разрешении. Для наложения изображений и их анализа использовались математические методы, дающие возможность получить усредненную картину распределения электронной плотности или обобщенную структуру кора ЯПК (этот метод не обеспечивает оптимального разрешения терминальных структур). На представленных моделях структуры кора ЯПК клеток дрожжей и *Xenopus*. Размеры ЯПК клеток *S. cerevisiae* и других одноклеточных эукариот составляют около 60×10^6 Да — т. е. в половину меньше, чем размеры ЯПК многоклеточных организмов. Однако, несмотря на разницу в размерах, их общее строение одинаково. Размер центрального канала поры, а также его транспортные свойства у Metazoa и дрожжей также одинаковы. В настоящее время наилучшие изображения ЯПК получены методом криоэлектронной микроскопии.

Как показано на , при любом расположении ЯПК происходит слияние наружной и внутренней мембран ядра. Мы не знаем, каким образом это происходит, но, скорее всего, слияние является интегральной частью процесса сборки ЯПК в ядерной оболочке. Комплексы закрепляются в оболочке с помощью интегральных мембранных белков, которые являются частью основной

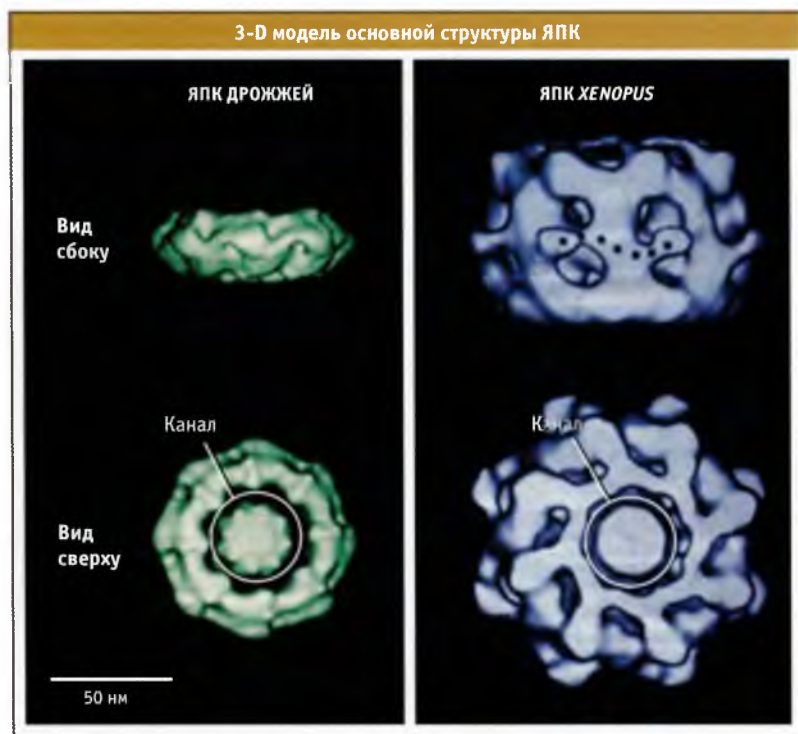
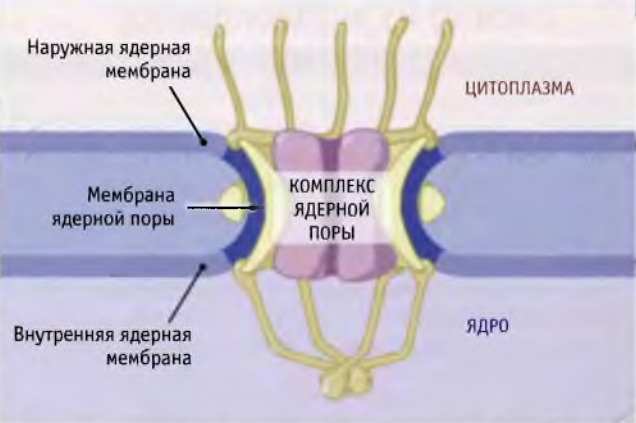


Рис. 5.23. Трехмерные компьютерные модели ЯПК, иллюстрирующие распределение средней электронной плотности. Представлен вид моделей сбоку, вдоль плоскости ядерной оболочки, и сверху, перпендикулярно оболочке. Фотографии из работы Curr. Opin. Cell Biol., vol. 11, Fahrenkrog, B., et al., *The Nuclear Pore...* pp. 391–401. ©, 1999, с разрешения Elsevier. Фотография любезно предоставлена Ули Эби, Университет Базеля

Внутренняя и наружная мембраны в области ЯПК



Наружная и внутренняя мембраны ядерной оболочки соединяются в области комплекса ядерной поры

структуры. Эти белки проходят в перинуклеарное пространство. ЯПК проникают в ядерную ламину и также скрепляются с ней.

Обобщенная модель ЯПК, построенная по данным многих исследований, предполагает, что ядерная пора состоит из нескольких кольцевых и напоминающих

спицы структур. Эти структуры сложным образом соединены между собой (рис. 5.25). ЯПК состоит из модульных компонентов. С помощью сканирующего электронного микроскопа можно наблюдать различные структуры, которые подтверждают эту точку зрения. Основываясь на полученных данных, предложена модель, описывающая сборку модульных структур. Однако пока мы не можем проверить, действительно ли они соединены таким образом. Мы также очень мало знаем о процессе сборки ЯПК.

Фиксация клеток позволяет наблюдать этапы продвижения материалов по каналу ЯПК. При исследовании препаратов в электронном микроскопе часто видно, что полость центрального канала заполнена плотной средой (рис. 5.23). Относительно состава этой среды существуют различные точки зрения. Согласно одной из них, среда представляет собой часть ЯПК, которая наиболее прочно связывается с карго, транспортируемым через канал. Поэтому для ее обозначения используют термин *транспортер* или *втулка*. Альтернативная точка зрения предполагает, что в действительности электронноплотный материал является комплексом карго с рецептором. На основании исследований, проведенных с помощью электронного микроскопа с высоким разрешением, этот материал, по-видимому, характеризуется различными размерами и переменной локализацией в канале ЯПК,

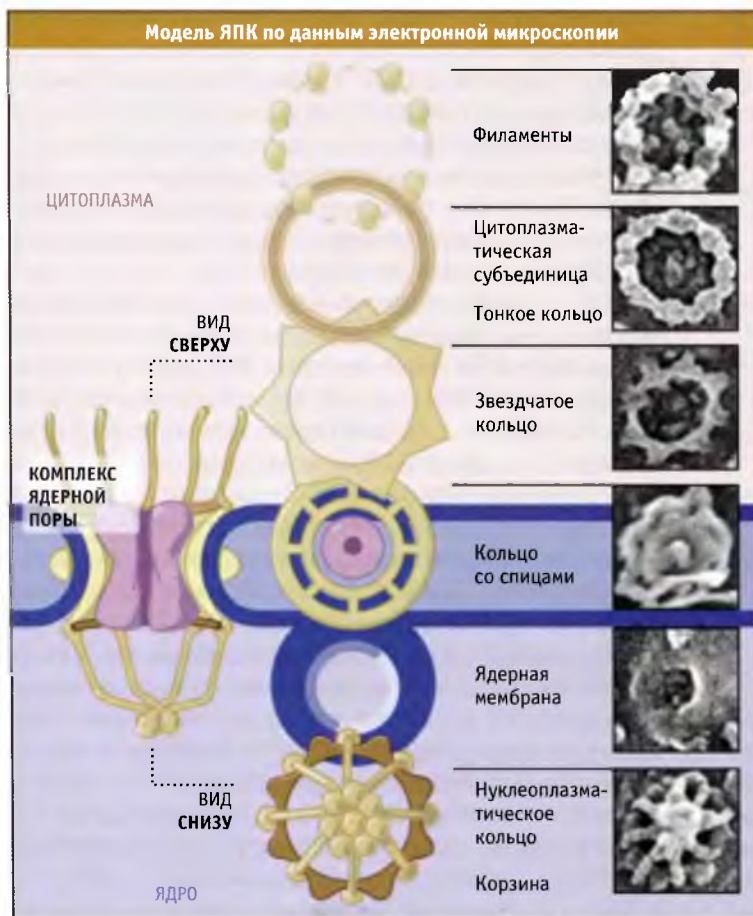


Рис. 5.25. Предполагается, что ЯПК собраны из модульных компонентов. Показаны фотографии этих компонентов, сделанные в электронном микроскопе на разных стадиях сборки ЯПК после митоза. Фотографии с оригинальных рисунков любезно предоставлены Мартином Голдбергом, Стивом Бегли и Терри Алленом

что более совместимо с точкой зрения о том, что он состоит из комплексов карго-рецептор.

В некоторых клетках ЯПК находятся не только в ядерной оболочке, но также в структурах, называемых **окончатыми мембранами**, которые представляют собой стопки двойных мембран, содержащих ЯПК и расположенных в цитоплазме. Часто ЯПК в слоях окончатых мембран располагаются так, как показано на рис. 5.26. Обычно окончатые мембраны присутствуют в ооцитах беспозвоночных и позвоночных, однако могут наблюдаться также и в других типах клеток. Происхождение и функции их остаются неизвестными. ЯПК клеток млекопитающих трудно отделить от ядерной оболочки, поскольку они обычно связаны с ламиной, представляющей собой нерастворимую структуру, и поэтому являются неудобным объектом исследования. Поскольку окончатые мембраны не имеют подстилающей ламины, они представляют собой ценный источник выделения ЯПК для последующих биохимических и цитологических исследований. Вероятно, ЯПК окончатых мембран имеют такое же строение и состав, как и комплексы пор ядерной оболочки.

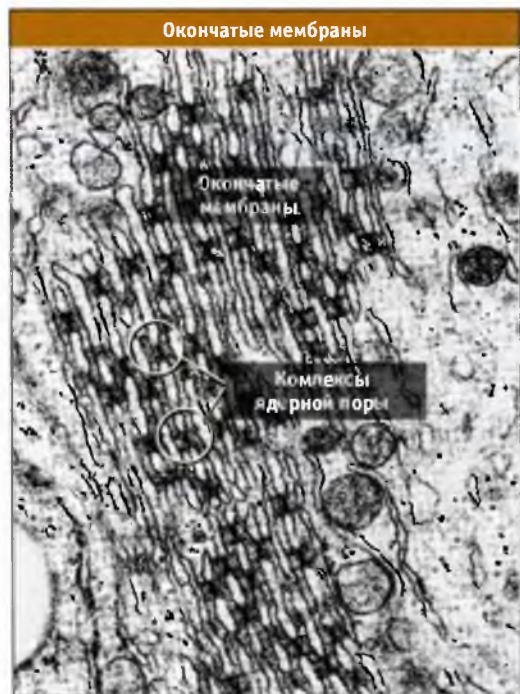


Рис. 5.26. Окончатые мембраны в ооцитах *Xenopus*. Фотография получена в трансмиссионном электронном микроскопе. Фотография любезно предоставлена д-ром Доном У. Фаусеттом. Воспроизведено из *The Cell*, 1981. Фотография выполнена Гектором Е. Кемесом. Отделение эндокринологии детского госпиталя Буэнос-Айрес, Аргентина

5.10 Ядерные поровые комплексы состоят из нуклеопоринов

Основные положения

- Белки ЯПК называются нуклеопорины
- Многие нуклеопорины содержат повторы коротких последовательностей, например, Gly-Leu-Phe-Gly, X-Phe-X-Phe-Gly и X-X-Phe-Gly. Предполагают, что в процессе транспорта они взаимодействуют с транспортными факторами
- Некоторые нуклеопорины представляют собой трансмембранные белки, которые привязывают ЯПК к ядерной оболочке
- Идентифицированы все нуклеопорины, входящие в ЯПК дрожжевых клеток
- В процессе митоза происходит разборка и сборка ЯПК
- Некоторые нуклеопорины проявляют свойства динамичности: они способны к быстрой ассоциации с ЯПК и к столь же быстрой диссоциации

Белки, из которых состоят ЯПК, называются **нуклеопорины**. Наиболее подробно изучены нуклеопорины пекарских дрожжей *S. cerevisiae*, и мы предполагаем, что в настоящее время уже идентифицированы все дрожжевые нуклеопорины. При идентификации этих белков использовали два методических подхода. В одном из подходов применялся генетический метод, т. е. изучали мутантов, дефектных по процессам ядерного транспорта. Другой подход представлял собой биохимический и включал выделение индивидуальных ЯПК из препаратов ядерной оболочки. Солюбилизация дрожжевых ЯПК облегчалась отсутствием у дрожжей ядерной ламины (см. 5.7 *Ядерная ламина подстилает ядерную оболочку*). Белки фракционировали с помощью гель-электрофореза, как показано на рис. 5.27, и идентифицировали масс-спектрометрическим методом. При совместном использовании генетического и биохимического подходов удалось идентифицировать примерно тридцать белков.

Были также идентифицированы нуклеопорины Metazoa, в частности клеток амфибий и млекопитающих. Хотя, в этом случае масса ЯПК примерно в два раза превышает массу дрожжевых комплексов ядерных пор, количество находящихся в них нуклеопоринов примерно одинаково. При исследованиях на позвоночных трудно использовать генетические подходы, и поэтому белки ядерных пор были идентифицированы с помощью биохимических и иммунологических методов. Отсутствие ядерной ламины в окончатых мембранах позволило выделить ЯПК из *Xenopus*.

Многие нуклеопорины характеризуются одной особенностью — наличием множественных повторов, состоящих из коротких последовательностей. Считается, что эти повторы являются сайтами, посредством которых молекулы карго связываются с ЯПК в процессе транспорта. Около 1/3 нуклеопоринов содержат такие последовательности, представленные остатками следующих аминокислот: Gly-Leu-Phe-Gly, X-Phe-X-Phe-Gly, или X-X-Phe-Gly, где X может быть

любой аминокислотой. Поскольку последовательности содержат пару фенилаланин-глицин (Phe-Gly), их часто называют **FG-повторы** (от англ. Phe-Gly). Последовательности разделяются спейсерами длиной 3–15 аминокислот. Обычно нуклеопорины содержат 10–30 повторов, однако некоторые могут содержать только один или два. Если белок содержит много повторов, они локализуются в одном участке молекулы. Предполагается, что FG-повторы выстилают центральный канал ЯПК, где они выполняют функцию сайтов причаливания для транспортных рецепторов. Еще одна группа нуклеопоринов, содержащих FG-повторы, является компонентами фибрилл цитоплазмы и ядерной корзины. Интересно, что у дрожжевых нуклеопоринов можно удалить много FG-повторов, однако это не сказывается на жизнеспособности клеток. Так, можно удалить все повторы, расположенные в фибриллах и в ядерной корзине, однако в центральном канале возможно удаление лишь нескольких FG-повторов без нарушения жизнедеятельности клетки.

Еще одна особенность многих нуклеопоринов — это присутствие в их структуре мотива, который носит название суперспираль (биспираль). Суперспиральные области представляют собой специфические α -спирали, основная функция которых заключается во взаимодействии с другими α -спиральными доменами с образованием мультимерной структуры. Образование суперспиралей, по-видимому, представляет собой очень важный этап в формировании общей структуры ЯПК.

Мы только начинаем понимать, каким образом нуклеопорины организованы в ЯПК. Для выделения субкомплексов ЯПК используются методы биохимического фракционирования, а затем идентифицируются отдельные компоненты и выясняется их общая структурная организация. Этот анализ позволяет выяснить наличие взаимодействия между нуклеопоринами. Локализацию определенного нуклеопорина в ЯПК можно определить с помощью иммуноэлектронной микроскопии. В этом методе для обнаружения специфических нуклеопоринов используются антитела, конъюгированные с частицами золота. Эти исследования позволяют получить информацию о том, какие нуклеопорины локализуются в цитоплазматических фибриллах, ядерной корзине и в центральной части ЯПК. Большинство нуклеопоринов находится в ядерной и цитоплазматической частях поры, и лишь немного обнаруживается в одной из терминальных структур (рис. 5.26).

Небольшое количество нуклеопоринов в ЯПК клеток Metazoa и дрожжей представляют собой трансмембранные белки. К такому выводу позволяют прийти три группы данных:

- Иммуноэлектронная микроскопия показывает, что эти нуклеопорины расположены очень близко к мембране ядерной поры
- Эти нуклеопорины обладают последовательностями аминокислот, достаточно длинными для того, чтобы пронизать липидный бислой

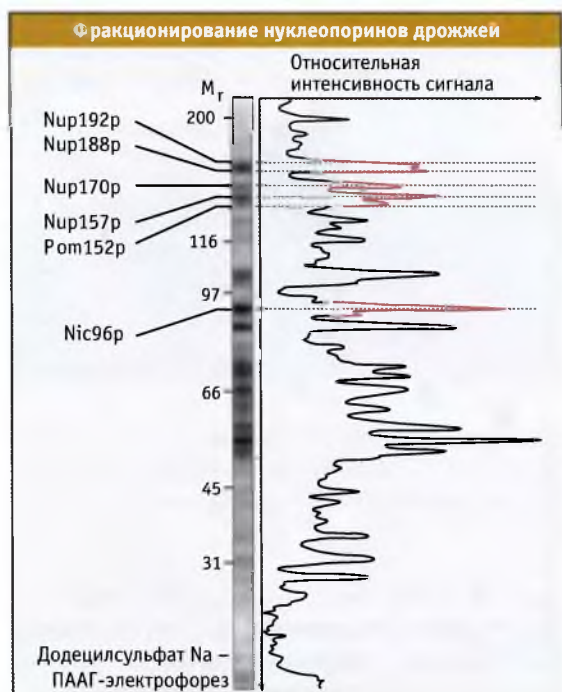


Рис. 5.25. ЯПК можно выделить из препаратов ядерной оболочки, а нуклеопорины расфракционировать электрофорезом в геле полиакриламида (ПААГ — полиакриламидный гель). Показан прокрашенный гель (слева) и результаты его денситометрического анализа (справа). Помечены некоторые нуклеопорины, присутствующие в больших количествах. По материалам *The Journal of Cell Biology*, 1995, vol. 131, pp. 1133–1148, с разрешения Rockefeller University Press. Фотография любезно предоставлена Майклом Рутон, Университет Рокфеллера

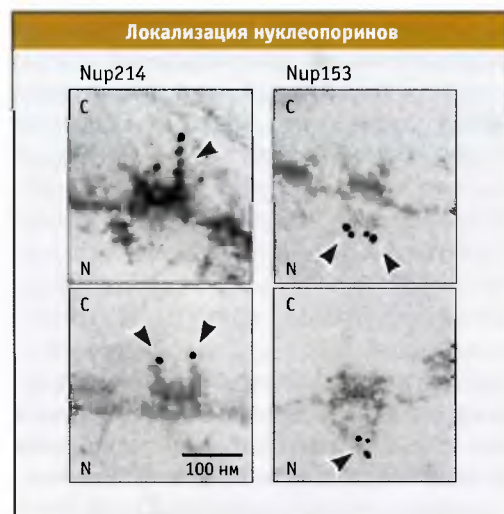
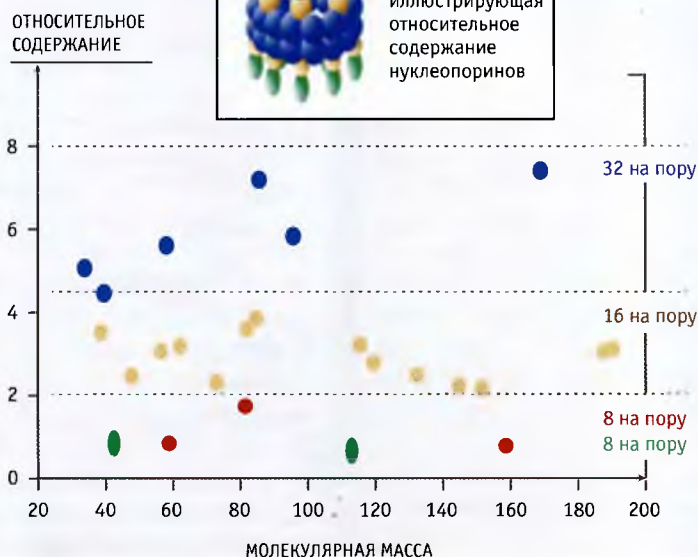


Рис. 5.26. В составе ЯПК с помощью метода иммуноэлектронной микроскопии можно обнаружить индивидуальные нуклеопорины. Воспроизведено из *The Journal of Cell Biology*, 1998, vol. 143, pp. 577–588. © The Rockefeller University Press. Фотографии любезно предоставлены Ули Эби, Университет Базеля



Относительное содержание каждого типа нуклеопоринов можно рассчитать на основании данных гель-электрофореза. Модель иллюстрирует относительное содержание различных нуклеопоринов, локализованных в разных частях ЯПК. Симметрично расположены только те нуклеопорины, которые находятся в терминальных структурах. Воспроизведено из *The Journal of Cell Biology*. 2000 Vol. 148, pp. 639–651, с разрешения The Rockefeller University Press

- Эти нуклеопорины находятся в препаратах ядерной оболочки после их обработки солевыми растворами с высокой ионной силой. После такой обработки остаются только интегральные мембранные белки.

Считают, что трансмембранные нуклеопорины способствуют сцеплению ЯПК с ядерной оболочкой.

рис. 5.29 схематически иллюстрирует относительную представленность нуклеопоринов в различных частях структуры ЯПК дрожжей. Некоторые белки встречаются гораздо чаще других. Поскольку ЯПК характеризуется симметрией 8-го порядка, мы предполагаем, что в одном комплексе находится не менее 8 копий молекулы нуклеопорина, и многие белки присутствуют в 16, 32 или даже большем числе копий. Наиболее редкие нуклеопорины находятся в цитоплазматических фибриллах и ядерной корзине. Значение молекулярной массы и представленность каждого нуклеопорина можно использовать для расчета общей массы дрожжевого ЯПК. Полученные значения хорошо совпадают с величинами, полученными при измерении размера комплексов с помощью электронной микроскопии, которые составляют 60 млн Да (см. 5.9 Ядерные поровые комплексы представляют собой симметричные каналы).

Экспериментально показано, что некоторые нуклеопорины прочно связаны друг с другом, в то время как другие проявляют более динамичные свойства. Исследования проводили с использованием метода

восстановления флуоресценции после фотоотбеливания (FRAP). Вначале получали клетки млекопитающих, экспрессирующие нуклеопорин, помеченный GFP белком. Затем маленький участок ядерной оболочки подвергался фотоотбеливанию и измеряли кинетику восстановления флуоресценции в отбеленной области. Показано, что примерно половина нуклеопоринов прочно связаны между собой и составляют структурную основу ЯПК. Остальные белки в течение нескольких часов могут находиться на определенных местах, а небольшое их количество обладают крайне высокой подвижностью, и остаются связанными с ЯПК лишь в продолжении нескольких минут или даже в течение более короткого времени.

В клетках некоторых организмов при митозе происходит разборка ядерной оболочки, и ЯПК диссоциируют на субкомплексы. На поздних стадиях митоза, при образовании ядерной оболочки, ЯПК собираются снова. *In vivo* процесс диссоциации и повторной сборки занимает менее часа. Используя электронную микроскопию, можно наблюдать разные стадии процесса сборки комплекса. Он состоит из нескольких воспроизводимых шагов. Мы мало знаем о механизме повторной сборки и о том, участвуют ли в нем другие белки, не обнаруженные в комплексе. Из вновь синтезированных нуклеопоринов в интерфазе также образуются новые ЯПК. Пока мы не знаем, происходит ли начальная сборка *de novo* и повторная сборка по одному механизму.

5.11 Белки избирательно транспортируются в ядро через ядерные поры

Общие положения

- В структуре зрелых ядерных белков содержится последовательность, в которой хранится информация об их ядерной локализации
- Белки избирательно поступают в ядро и выходят из него через ядерные поры
- Информация о ядерном импорте хранится в небольшом участке молекулы транспортируемого белка

Считается, что все макромолекулы поступают в ядро и выходят из него по большим каналам ядерных пор. На рис. 5.30 представлена скорость транспорта для некоторых белков карго.

Транспортный процесс начинается с причаливания (докинга) белков (транспортируемых белков карго) на фибриллы ЯПК, выходящие в цитоплазму. Это было показано с помощью электронной микроскопии, которая позволяет наблюдать отдельные этапы транспорта белков через ЯПК. При введении в цитоплазму ооцита электронно-плотных частиц золота, покрытых ядерным белком, они накапливаются в ядре. Некоторые частицы откладываются на фибриллах цитоплазмы или в канале ЯПК.

Процесс причаливания белков на ЯПК не требует поступления энергии извне, однако транспорт является энергозависимым процессом. Когда клетки инкубируются при низкой температуре или обрабатываются ингибиторами энергетических процессов, частицы золота, покрытые белком, остаются связанными с цитоплазматическими компонентами ЯПК, но не проходят в канал комплекса и в ядро.

Транспорт белков через ЯПК представляет собой высокоселективный процесс (см. 5.8 *Между ядром и цитоплазмой осуществляется активный транспорт больших молекул*). Во многих случаях транспортируемые белки содержат информацию о направлении их в ядро. Белок, не содержащий адресного сигнала, может импортироваться, присоединившись к белку, обладающему таким сигналом. Существование на белках сигнала импорта нагляднее всего демонстрируется при выделении ядерных белков из ооцитов *Xenopus* и их последующего введения в цитоплазму. Белки быстро проникают в ядро, что подтверждает наличие у них соответствующей информации.

Эти эксперименты также показывают, что в отличие от большинства сигнальных последовательностей, несущих информацию о транслокации белков в ЭПР, сигналы ядерного адресования не отщепляются при транспорте белка в компартмент. Способность ядерного белка к возобновлению транспорта имеет важное значение: при делении оболочка ядра разрушается, и ядерные белки распределяются по клетке. После митоза белки должны снова поступить во вновьобразованное ядро.

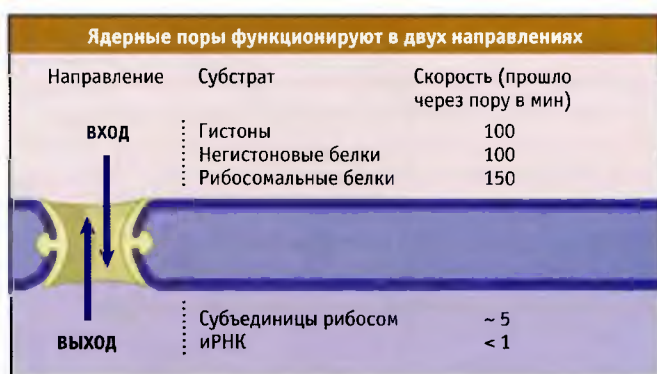


РИС. 5.30 Скорость входа и выхода некоторых макромолекул, которые транспортируются через ядерные поры. Скорость отражает относительные количества каждого из транспортируемых белков

Последовательность структуры белка, несущая информацию о ядерной локализации, находится на небольшом участке его молекулы. Впервые она была обнаружена в классических экспериментах Ласки. Эксперименты проводились с нуклеоплазмином, представляющим собой распространенный ядерный белок. При введении нуклеоплазмина в цитоплазму ооцита *Xenopus* белок быстро накапливается в ядре (рис. 5.31). Поскольку ядро уже содержит большое количество нуклеоплазмина, вновь поступающий белок накапливается против концентрационного градиента. Нуклеоплазмин является относительно небольшим белком, с мол. массой 33 кДа. Однако он всегда образует пентамер с мол. массой, приближающейся к 150 кДа. Поэтому он слишком велик для того, чтобы проникать в ядро за счет простой диффузии.

Для проверки предположения о том, что информация о ядерном импорте может находиться только в части молекул белка, пентамер нуклеоплазмина разрезали на две части с помощью протеазы. Одна часть («хвост»), размером 10 кДа, представляла собой фрагмент С-терминального участка каждого мономера, а другая, пентамерная, размером 100 кДа, содержала их остальную часть («сердцевина»). Различные фрагменты нуклеоплазмина вводили в ооциты *Xenopus* для того, чтобы определить, какие из них содержат информацию о транспорте в ядро. После введения в цитоплазму сердцевина не проникала в клеточное ядро. Поэтому она не несет информации о ядерной локализации. Однако при введении непосредственно в ядро сердцевина оставалась внутри органеллы и не выходила назад в цитоплазму. Хвостовые фрагменты транспортировались из цитоплазмы в ядро и там удерживались. При частичной обработке протеазой получались сердцевинки, удерживающие один или несколько хвостов. Присутствие одного хвоста оказалось достаточным для транспорта белка в ядро.

Результаты этих экспериментов позволили прийти к заключению о том, что ядерные поры представляют собой избирательные каналы, которые пропускают только белки, содержащие соответствующую информацию в виде последовательности аминокислот. Информация о ядерном

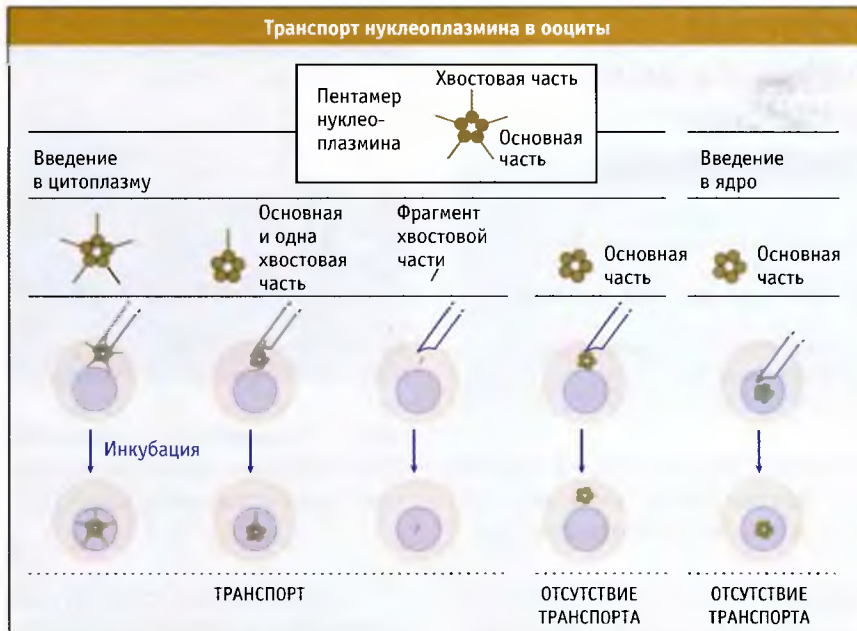


Рис. 5.31. Введение нуклеоплазмина в цитозоль или в ядро ооцитов *Xenopus* иллюстрирует важность фрагмента С-терминального хвоста для импорта белка в ядро

транспорте локализуется только в части молекулы белка — в случае нуклеоплазмина это фрагмент С-терминального участка, размером 10 кДа. Вместе с тем простая диффузия и удержание белка в ядре недостаточны для его транспорта из цитоплазмы в ядро. Это подтверждается наблюдением, что пентамерная сердцевина остается в ядре, если поместить ее туда, но сама по себе она там не накапливается.

5.12 Сигнал ядерной локализации направляет белки в ядро

Основные положения

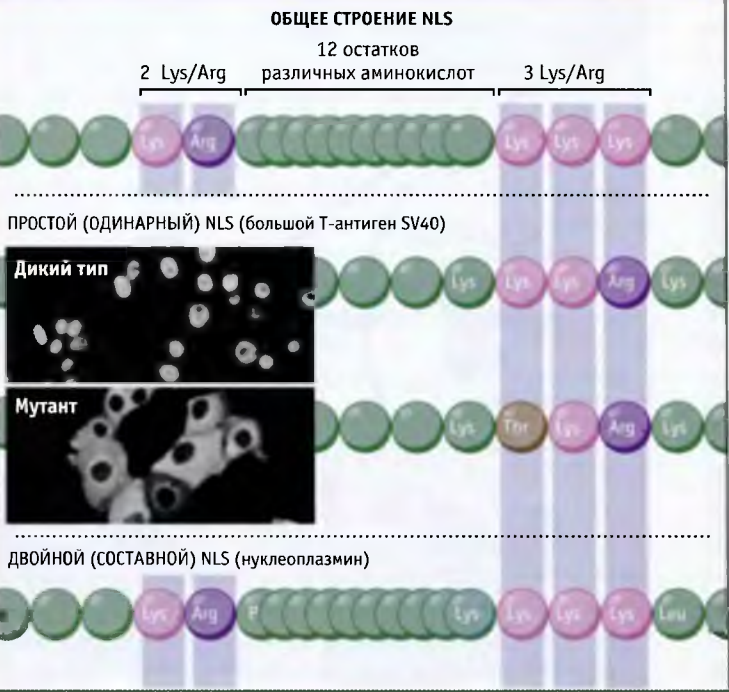
- Сигнал ядерной локализации (NLS) представляет собой короткую последовательность основных аминокислот
- Наличие NLS является необходимым и достаточным для импорта белков в ядро

Сигнал, присутствующий в молекуле белка и направляющий ее в ядро клетки, представляет собой короткую последовательность аминокислот, которая называется **сигнал ядерной локализации (NLS)**. Обычно NLS содержит основные аминокислоты, лизин и аргинин. К числу наиболее изученных относятся сигналы ядерной локализации большого Т-антигена вируса SV40. Когда вирус инфицирует клетку, в цитоплазме образуется его большой Т-антиген, который поступает в ядро и обеспечивает размножение вируса. Для проникновения в ядро большой Т-антиген использует арсенал средств клетки хозяина.

NLS большого Т-антигена SV40 представляет собой последовательность Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val, распо-

ложенную между аминокислотами 126–132 (рис. 5.32). Структура этой последовательности была установлена с помощью двух групп экспериментов. В первой группе экспериментов было показано, что замена в Т-антигене лизина 128 на треонин в результате мутации приводит к белку, который из-за инактивации NLS не может проникнуть в ядро. Мутации, приводящие к замене аминокислот вне NLS, не влияли на ядерный импорт белков. Эти результаты показывают, что для ядерного транспорта необходим NLS. Во второй группе экспериментов оказалось, что пептид, по составу соответствующий минимальному NLS, можно присоединить к неядерному белку, и образующийся химерный белок будет способен транспортироваться в ядро. Химерный белок с заменой аминокислоты в NLS не импортируется. Эти результаты показывают, что NLS достаточен для ядерного импорта. Для того чтобы последовательность аминокислот представляла собой NLS, она должна удовлетворять критериям *необходимости* и *достаточности* для ядерного импорта.

Многие ядерные белки содержат короткие основные NLS, аналогичные сигналу Т-антигена. Еще один тип NLS содержит две коротких последовательности основных аминокислот, разделенных примерно 12 различными аминокислотами. Такой NLS называется двойной сигнал и характерен для нуклеоплазмина (см. рис. 5.31). Оба типа сигналов относятся к типу «классических» и распознаются одними и теми же транспортными белками. Существуют, однако, дополнительные типы NLS, точная структура которых неизвестна, однако обычно они содержат основные аминокислоты. Таким образом, так же как и секреторные сигнальные последовательности, NLS характеризуются некоторыми общими свойствами, однако не имеют постоянной структуры.



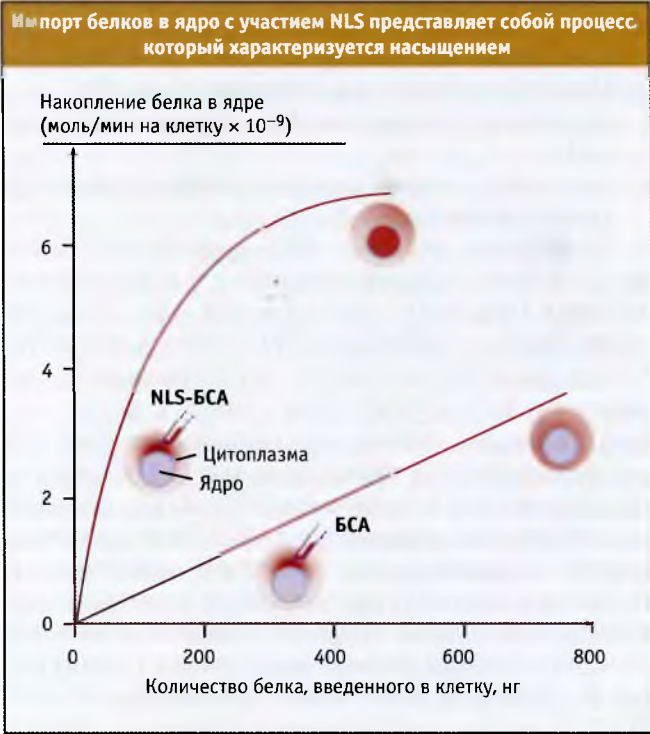
NLS большого Т-антигена SV40 содержит только одну последовательность остатков основных аминокислот и замена одного из остатков лизина на треонин приводит к утрате способности антигена к ядерной локализации. NLS в нуклеоплазмине является примером двойного сигнала. При таком сигнале два основных участка разделены 12 остатками различных аминокислот. Воспроизведено из *Cell*, vol. 39, Kalderon, D., et al., *A Short Amino Acid...*, pp. 499–509. © 1984 с разрешения Elsevier. Фотография любезно предоставлена Дэниелом Кальдероном

5.13 В импорте белков в ядро участвуют цитоплазматические рецепторы NLS

Основные положения

- Рецепторы для импорта белков в ядро представляют собой цитоплазматические белки, которые связываются с NLS транспортируемых белков
- Рецепторы ядерного импорта представляют собой часть большого семейства белков, которые называются кариофирины

Импорт белков в ядро представляет собой рецепторный процесс. На основании экспериментов, показавших, что процесс импорта белков характеризуется насыщением, предположили участие в нем рецепторов, узнающих сигнал ядерной локализации. В экспериментах измеряли кинетику ядерного импорта в ооциты *Xenopus* (). Короткие полипептиды, содержащие NLS, с помощью химических кросслинкеров сшивали с неядерным белком, бычьим сывороточным альбумином (БСА). Когда комплекс NLS–БСА вводили в цитоплазму ооцитов, он проникал в ядро, в то время как индивидуальный БСА оставался в цитоплазме. По мере увеличения концентрации NLS–БСА, процесс накопления белка в ядре характеризуется кривой с на-



После введения в цитоплазму ооцита комплекса NLS-БСА, импорт его в ядро характеризуется насыщением

высещением. Это согласуется с точкой зрения о наличии ограничивающего фактора (или факторов), узнающих NLS и осуществляющих импорт, что, в свою очередь, предполагает существование рецепторов, узнающих NLS-содержащие белки.

Сейчас мы знаем, что рецепторы NLS представляют собой растворимые цитоплазматические белки. Некоторые рецепторы были впервые идентифицированы с помощью метода, который *in vitro* воспроизводит события в клетке и позволяет выделить цитозольные факторы, обеспечивающие процесс импорта белков. Клетки обрабатывали детергентом дигитонином, чтобы сделать плазматическую мембрану проницаемой (рис. 5.34). Такая обработка позволяет белкам цитоплазмы выходить через отверстия в мембране, однако ядерная оболочка при этом не меняется. Когда к проницаемым клеткам добавляли NLS-содержащие белки, они поступали в клетку через отверстия в плазматической мембране, но не проникали в ядро, если к ним не добавляли экстракт цитоплазмы.

Из экстракта цитоплазмы были выделены два белка — один белок связывался с транспортируемым белком и ядерной порой, а другой участвовал в транслокации (рис. 5.34). Таким образом, импорт ядерных белков происходит в два этапа:

- NLS-зависимое причаливание белка к ядерной поре с последующей
- транслокацией его в нуклеоплазму.

Белок, обеспечивающий причаливание, был идентифицирован как NLS-рецептор. Этот рецептор присоединяется к транспортируемому белку (карго) через NPS, переносит транспортируемый белок в ядро и затем возвращается в цитоплазму для следующего цикла транспорта. Транслокацию через ЯПК обеспечивает Ran-ГТФаза.

Идентифицированы два типа рецепторов NLS:

- рецепторы, непосредственно связывающиеся с порой, и
- рецепторы, которым для причаливания белка к поре требуется адаптер.

Простейший рецептор NPS представляет собой молекулу белка, которая связывается с NLS-транспортируемым белком и с ядерной порой (рис. 5.35). Эти рецепторы очень напоминают импортин β . Напротив, у гетеродимерных рецепторов одна субъединица связывается с транспортируемым белком, а другая — с нуклеопоринами. Первый идентифицированный NLS рецептор состоял из импортинов α и β . Импортин α представляет собой белок массой 55–60 кДа, который непосредственно связывается с NLS. Этот импортин является специфическим адаптером классического NLS. Белки с таким NLS преобладают и используют импортин α как адаптер, позволяя большому количеству транспортируемых белков переноситься с импортин α . Последний представляет собой белок порядка 90 кДа, и вместе с импортин α удерживает белок в ядерной поре. Импортин α — только один из многих белков, которые узнают NLS и взаимодействуют с импортин β .

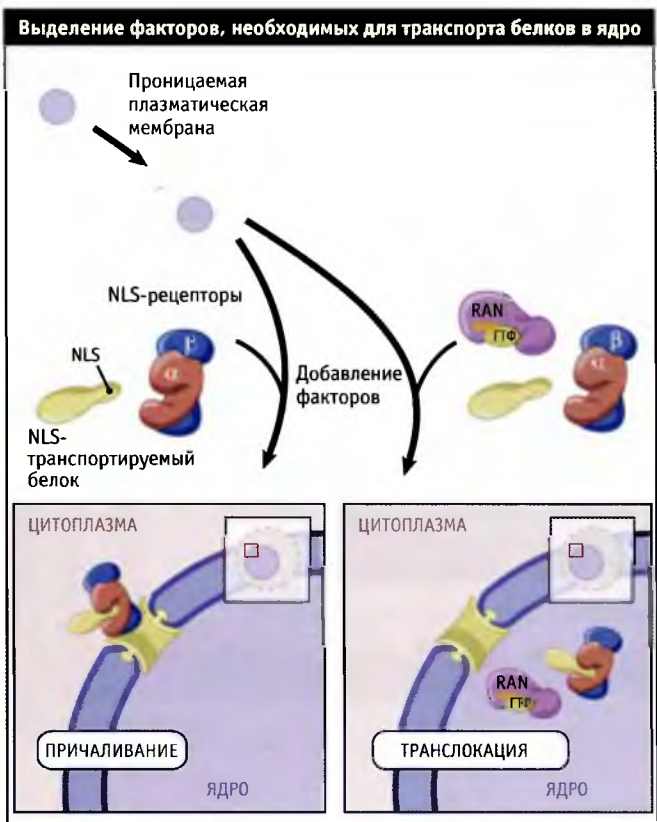


РИС. 5.34 Для очистки цитоплазматических белков, необходимых для ядерного транспорта, были использованы клетки с полупроницаемой мембраной

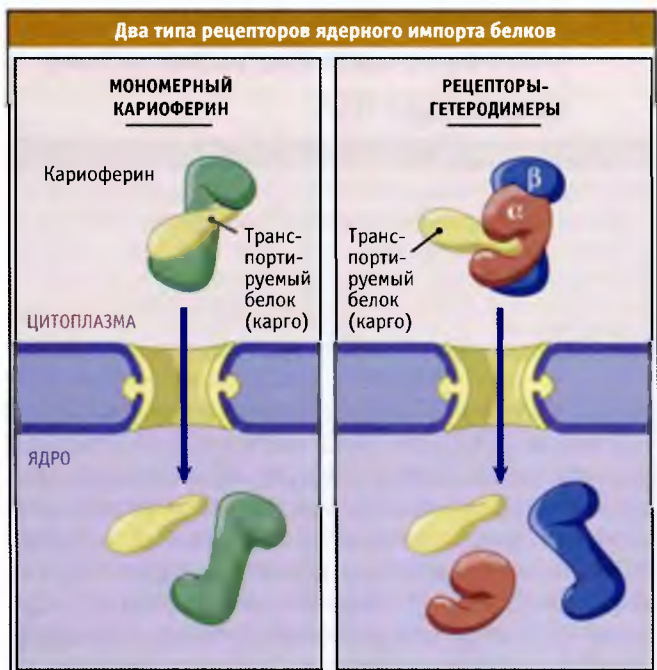


РИС. 5.35 Многие белки поступают в ядро, непосредственно связываясь с кариоферинами, белками, родственными импортину β (левая часть рисунка). Вход в ядро других белков происходит с участием гетеродимера $\alpha\beta$ импортинов (показано справа)

В трехмерной структуре импортина α , связанного с NLS SV40, присутствуют два связывающих кармана для NLS. Это объясняет способность двойных и простых NLS (см. рис. 5.32) взаимодействовать с одним и тем же рецептором. Третий лизиновый остаток в NLS участвует в создании трех критических контактов между аминокислотами и играет наиболее важную роль в связывании NLS. Это позволяет объяснить, почему даже столь незначительные вариации в первичной последовательности NLS, как замена лизина в третьем положении, полностью лишает белок функции (см. 5.12 *Сигнал ядерной локализации направляет белки в ядро*).

После связывания с цитоплазматическими элементами ЯПК-комплексы кариоферин-транспортируемый белок проходят через канал поры, однако механизм этого процесса остается неизвестным. Для того чтобы выяснить, сколько последовательных контактов комплекса с нуклеопорином необходимо для транспорта и по какому механизму происходит этот процесс, необходимы дальнейшие исследования. Ниже рассматриваются две модели транспорта белков через пору (см. 5.16 *Для описания механизма ядерного транспорта предложено несколько моделей*).

Некоторые транспортируемые белки для импорта используют более одного рецептора ядерного транспорта. Наличие нескольких рецепторов может помочь обеспечить эффективный импорт и/или сформировать другой уровень регуляции. Более того, не все белки импортируются в ядро с участием кариоферина. Некоторые белки, такие как сигнальные молекулы β -катенина, распределяются между любыми типами транспортеров и при импорте непосредственно взаимодействуют с нуклеопоринами. Почему некоторые белки способны к транспорту без участия кариоферина, неизвестно, однако это может быть вызвано необходимостью отдельной регуляции ядерного импорта, независимо от других транспортных процессов.

Некоторые белки вирусов приспособили собственные ядерные факторы для взаимодействия с нуклеопоринами и клеточными переносчиками. Например, вирусный белок Vpr, необходимый для инфицирования неделящихся клеток ВИЧ, связывает импортин α и нуклеопорин, что способствует импорту в ядро генетического материала вируса. Таким образом, Vpr имитирует участие импортина β в ядерном транспорте.

Хотя вначале считалось, что импортин β участвует только в процессе ядерного транспорта, в настоящее время известно, что он связан с регуляцией различных клеточных функций. Этот белок может взаимодействовать с карго и микротрубочками и, таким образом, обеспечивать продвижение ядерных белков вдоль микротрубочек к периферии ядра. Вместе с другими ядерными транспортными факторами импортин β играет роль в сборке митотического веретена и ЯПК, а также в формировании ядра после завершения митоза.

5.14 Экспорт белков из ядра также происходит с участием рецепторов

Основные положения

- Небольшие последовательности аминокислот, богатые лейцином, представляют собой наиболее распространенные сигналы ядерного экспорта
- Рецептор ядерного экспорта связывает в ядре белки, которые содержат сигналы ядерного экспорта (NES), и транспортирует их в цитоплазму

Некоторые белки образуются в цитоплазме и транспортируются в ядро, а затем выходят из ядра. Многие такие белки-челноки (шаттлы) представляют собой факторы транскрипции, активность которых контролируется их местонахождением. Некоторые белки постоянно перемещаются из ядра в цитоплазму. Этот процесс обозначают как ядерно-цитоплазматическая циркуляция белков. Циркулирующие белки содержат не только NLS, направляющий их в ядро, но также сигнал выхода из ядра, который называется **сигнал ядерного экспорта (NES)**. Общие закономерности экспорта ядерных белков такие же, как и для их импорта. Однако существуют важные различия в способах регуляции процесса, которые мы обсудим ниже (см. 5.17 *Ядерный транспорт может регулироваться*).

NES были обнаружены при изучении размножения вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в инфицированных клетках. ВИЧ представляет собой РНК-й вирус, и часть вирусной РНК, образующейся в ядре, выходит в цитоплазму для трансляции и упаковки в новые вирионы. Небольшой вирусный белок, называемый Rev, поступает в ядро инфицированной клетки, где специфически связывается с РНК вируса. Комплекс РНК-Rev выходит из ядра в цитоплазму, где РНК отделяется, а Rev опять транспортируется в ядро и выполняет повторный цикл экспорта РНК. Белок Rev содержит информацию об импорте в форме классического NLS, и отдельно информацию об экспорте (NES) (рис. 5.36).

NES были обнаружены при исследовании мутантов Rev, которые не поддерживали репликацию вируса. Сравнение мутанта и дикого типа Rev показало, что для экспорта необходима короткая последовательность из десяти аминокислот, содержащая четыре лейциновых остатка, расположенных на определенном расстоянии друг от друга. Нарушение этого расположения объясняет утрату функции у мутанта Rev. Аналогичные богатые лейцином последовательности встречаются во многих клеточных белках, которые циркулируют между ядром и цитоплазмой. На рис. 5.37 представлены некоторые примеры NES. Эти последовательности относятся к «классическим» NES, которые необходимы и достаточны для обеспечения экспорта белков из ядра.

NES присутствует на многих белках, которые не поступают в ядро. Некоторые из этих белков содержат NES, чтобы обеспечить свою внеядерную локализацию. У большинства клеток при делении ядерная оболочка распадается и в конце митоза вокруг каждого набора хромосом

Циркуляция белка Rev вируса иммунодефицита человека между ядром и цитоплазмой

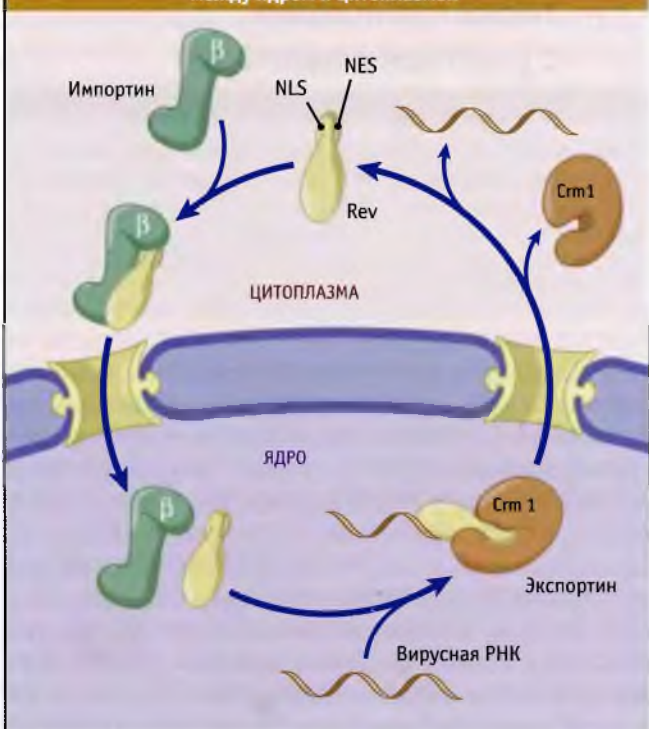


Рис. 5.35. Некоторые белки, например Rev ВИЧ, постоянно циркулируют между ядром и цитоплазмой. Для простоты не показаны остальные белки, участвующие в транспорте



Для некоторых хорошо изученных последовательностей сигналов ядерного экспорта характерно высокое содержание лейцина. Вместо лейцина там могут находиться другие гидрофобные аминокислоты, например изолейцин и валин

образуется снова. При этом в ядро могут попадать неядерные белки. После сборки ядерной оболочки NES на этих белках могут обеспечивать их быстрый экспорт.

Если белок, содержащий NES, входит в ядро, он узнается рецептором сигнала ядерного экспорта, **экспортином**, который является представителем семейства кареоферин. Основной экспортер, обнаруженный во всех клетках, представлен белком Crm1. Комплекс белок-экспортер мигрирует из ядра в цитоплазму через канал ядерной поры. В цитоплазме карго высвобождается. Затем экспортер опять входит в ядро, и цикл экспорта повторяется (рис. 5.36).

Лептомицин представляет собой природный продукт, выделенный из грибов, который подавляет функции белка Rev и размножение ВИЧ. Лептомицин блокирует ядерный экспорт Rev за счет ковалентного взаимодействия с Crm1 и нарушения его способности связываться с NES. Поскольку лептомицин блокирует весь ядерный экспорт, зависящий от классического NES, он токсичен для клеток, что препятствует его применению в качестве лекарственного препарата. Однако вещество широко используется в экспериментальных исследованиях для выяснения роли классических NES в экспорте белков.

Наряду с Crm1, в экспорте белков участвуют также другие кареоферины. В качестве примера приведем импортер α , который поступает в ядро вместе с транспортируемым белком и импортином β , а затем должен быть экспортирован, чтобы функционировать в последующих циклах импорта. Специальный экспортер, называемый CAS, связывает импортер α и направляет его назад, в цитоплазму. Некоторые РНК, которые экспортируются из ядра, служат в качестве карго для различных экспортеров (см. 5.19 Субъединицы рибосом собираются в ядрышке и экспортируются с участием экспортина 1; 5.20. тРНК экспортируются с участием специального экспортина; 5.24. УляРНК экспортируются, модифицируются, собираются в комплексы и импортируются и 5.25. Предшественники микроРНК экспортируются из ядра и подвергаются процессингу в цитоплазме).

5.15 Направление ядерного транспорта контролируется Ran-ГТФазой

Основные положения

- Ran представляет собой небольшую ГТФазу, которая присутствует в ядре и цитоплазме всех эукариотических клеток
- Комплекс Ran-GAP способствует гидролизу ГТФ под действием Ran, а комплекс Ran-GEF участвует в обмене ГДФ на ГТФ на Ran
- Ran-GAP цитоплазматического происхождения, в то время как Ran-GEF находится в ядре
- Ran контролирует ядерный транспорт за счет ассоциации с кареоферинами и влияя на их способность связываться с карго

В каждый момент времени в клетке множество белков транспортируются в ядро и выходят из него. Перемещение белков происходит при взаимодействии NLS или NES белков карго с белками семейства кареоферринов. Переносчики мигрируют в обоих направлениях, связывая карго в одном компартменте и высвобождая его по другую сторону ЯПК. Каким образом контролируется направление транспорта? Ответить на этот вопрос помогает исследование свойств небольшого мономерного белка Ran, связывающего ГТФ. Этот белок ассоциирует с транспортерами и мигрирует между ядром и цитоплазмой. В белке Ran нет сигналов NLS и NES.

Как и другие белки, связывающие ГТФ, Ran способен очень медленно гидролизовать ГТФ, образуя ГДФ. Существуют белки-регуляторы, стимулирующие ферментативную активность Ran. К их числу относятся два белка, Ran-GAP и Ran-GEF. Первый представляет собой белок, активирующий ГТФазу Ran и приводит к быстрому гидролизу связанного ГТФ с образованием формы Ran, находящейся в комплексе с ГДФ (см. **МБИО:5-0007**). Ran-GEF представляет собой фактор, обменивающий гуаниловый нуклеотид, и присоединяет к Ran новые молекулы ГТФ. Этот белок обеспечивает удаление связанного ГДФ и замещение его на ГТФ. Таким образом, в зависимости от регулятора, с которым он взаимодействует, Ran находится в форме, связанной либо с ГТФ, либо с ГДФ. Ran-GEF (который также обозначается как Rcc1) и Ran также участвуют в сборке митотического веретена (см. **МБИО:5-0008**).

Ключ к пониманию того, каким образом обеспечивается направленность ядерного транспорта, лежит в различной локализации Ran-GAP и Ran-GEF. Как показано на рис. 5.38, Ran-GAP локализован в цитоплазме, и некоторое количество комплекса связано с филаментами на цитоплазматической стороне ЯПК. Это означает, что в цитоплазме Ran находится в форме, связанной с ГДФ, поскольку Ran-GAP будет стимулировать гидролиз связанного ГТФ. Напротив, Ran-GEF локализован в ядре. Таким образом, в ядре Ran должен быть в ГТФ-связанной форме, поскольку после импорта Ran-ГДФ в ядро Ran-GEF может заменить связанный с Ran-ГДФ на ГТФ. Это асимметричное распределение эффекторов Ran предполагает, что концентрация Ran-ГДФ должна быть выше в цитоплазме, а концентрация Ran-ГТФ — в ядре. Такое предположение было подтверждено изящным экспериментом, схема которого представлена на рис. 5.39. Из белка, который связывался с Ran-ГТФ, но не с Ran-ГДФ, и двух флуоресцирующих белков получали белковый гибрид. Флуоресцирующие белки включали желтый (YFP) и голубой белки (CFP). Затем в клетке вызвали экспрессию белкового гибрида. Когда этот белок не связан с Ran-ГТФ, его флуоресцирующие домены располагаются рядом, и между ними происходит взаимодействие. Это взаимодействие называется флуоресцентным резонансным переносом энергии (FRET), и его можно наблюдать с помощью флуоресцентного микроскопа (см. **ТЕСН:5-0001**). Таким образом, FRET будет наблюдаться, когда белковый гибрид находится в присутствии Ran-ГДФ. Напротив,

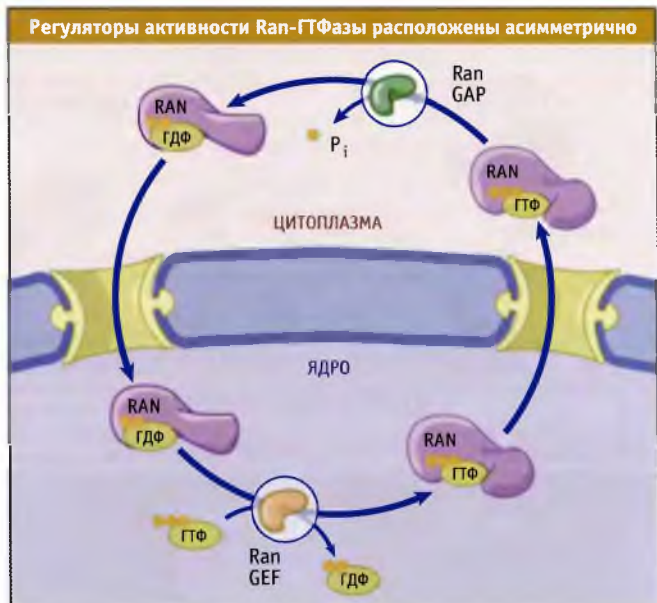
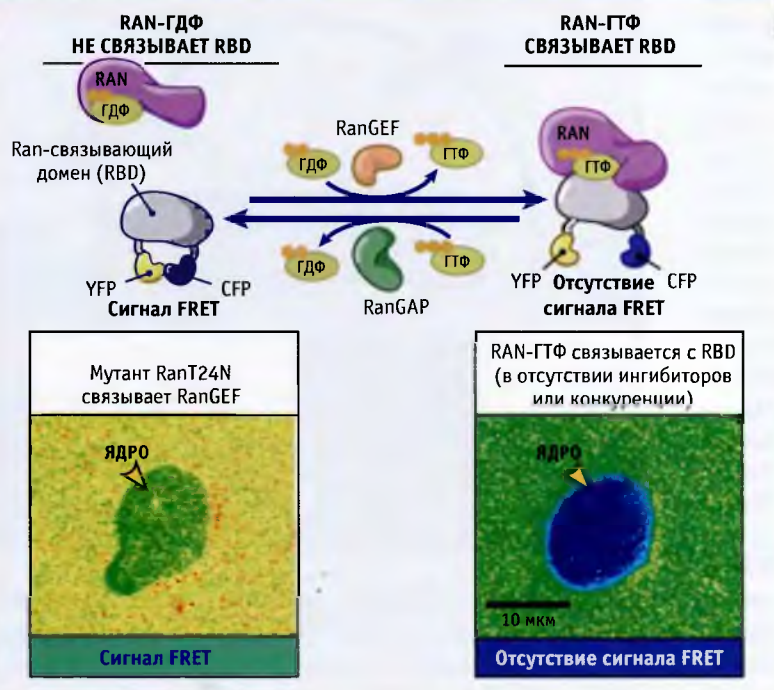


РИС. 5.38. В цитоплазме Ran существует в форме, связанной с ГДФ, а в ядре фермент связан с ГТФ. Это обусловлено характером распределения ферментов, влияющих на его способность связываться с ГТФ и гидролизовать нуклеотид. Для простоты остальные белки, участвующие в транспорте, не показаны

если присутствует Ran-ГТФ, то белковый гибрид с ним связывается. Это связывание предотвращает взаимодействие доменов YFP и CFP, и FRET не наблюдается. На микрофотографии, представленной на рис. 5.39 справа внизу, видно присутствие в ядре голубого сигнала FRET, что свидетельствует о наличии больших количеств Ran-ГТФ именно в этой органелле, а не в цитоплазме. Слева представлены результаты контрольного эксперимента, выполненного на клетках, экспрессирующих мутантную форму Ran (RanT24N), которая связывается с Ran-GEF и препятствует замещению ГДФ связанного с Ran дикого типа на ГТФ. Эти клетки характеризуются пониженным содержанием Ran-ГТФ в ядре, что проявляется наличием слабого зеленого сигнала FRET. Эти результаты показывают, что Ran преимущественно связан с ГТФ в ядре клетки, и с ГДФ — в цитоплазме. Установлено, что концентрация Ran-ГТФ в ядре примерно в 200 раз превышает его концентрацию в цитоплазме.

Ran контролирует направление ядерного транспорта, взаимодействуя с кареоферинами и влияя на их способность связываться с карго. Эффект Ran зависит от того, связывается он с импортером или с экспортером транспортируемого белка. Рассмотрим импортин, рецептор ядерного импорта. В цитоплазме он связывается с белком карго, содержащим NLS (рис. 5.40). Попадая в ядро, комплекс импортин-каargo связывается с Ran-ГТФ, что приводит к его перегруппировке и к отщеплению карго. Таким образом, комплексы импортин-каargo, находящиеся в цитоплазме, устойчивы, но диссоциируют после связывания в ядре с Ran-ГТФ. Отметим, что, хотя концентрация Ran-ГДФ в цитоплазме высока, он не явля-



С помощью Ran-связывающего домена (RBD), способного связываться только с Ran-ГТФ, можно определить относительные концентрации Ran-ГТФ и Ran-ГДФ, характерные для различных клеточных компартментов. Фотографии воспроизводятся с разрешения Kalab, P., Weis, K. and Heald, R. 2002, *Science*. 295: 2452–2456. ©2002 AAAS. Фотографии любезно предоставлены Ребеккой Хилд, Калифорнийский университет, Беркли

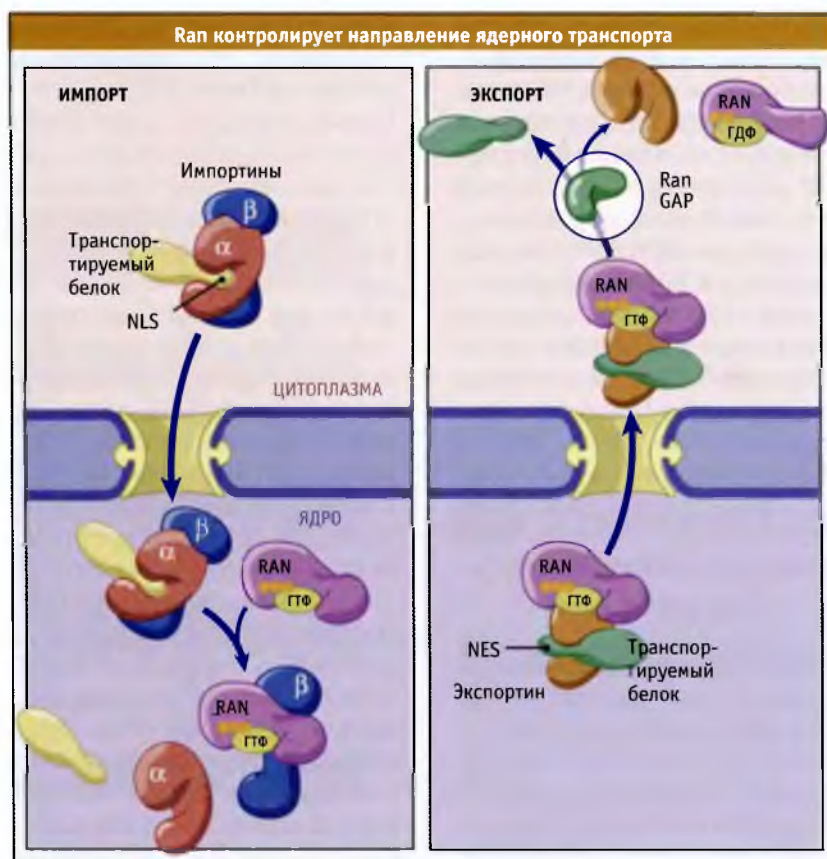


Рис. 5.40. Импортин связывают белки в цитоплазме и высвобождают их в ядре после ассоциации с Ran-ГТФ. Напротив, с Ran-ГТФ в ядре образуются комплексы для экспорта. Экспортируемый белок высвобождается в цитоплазму при гидролизе ГТФ

ется необходимым ни для связывания импортина с карго, ни для осуществления процесса импорта.

Напротив, для связывания экспортинов с белками карго, содержащими NES, необходим комплекс Ran-ГТФ. В присутствии Ran-GEF в ядре поддерживается высокий уровень Ran-ГТФ. Ran-ГТФ, экспортин и карго кооперативно связываются, образуя трехмерный комплекс (рис. 5.40). После того как этот комплекс через пору вышел в цитоплазму, он вступает в контакт с Ran-GAP, который гидролизует ГТФ. При этом тримерный комплекс диссоциирует, и белок карго высвобождается.

Критическую роль в процессах ядерного транспорта играет распределение Ran, связанного с ГТФ и ГДФ в ядре и цитоплазме. В большинстве случаев Ran концентрируется в ядре. Однако из ядра вместе с экспортином постоянно выходит некоторое количество Ran-ГТФ. После гидролиза ГТФ и высвобождения карго, Ran-ГДФ поступает назад в ядро при участии собственного транспортного рецептора, который называется Ntf2 (рис. 5.41). В ядре, под действием Ran-GEF, связанный с Ran ГДФ замещается на ГТФ, что приводит к отщеплению Ntf2 от Ran. После этого Ntf2 выходит из ядра и принимает участие в повторном цикле импорта Ran-ГДФ.

Наряду с Ran-GAP и Ran-GEF, существуют другие белки, которые связывают Ran и изменяют его активность. Один из таких белков, RanBP1 находится на поверхности ЯПК, обращенной в сторону цитоплазмы. Этот белок стимулирует ГТФазную активность Ran при участии Ran-GAP, увеличивая эффективность высвобождения карго. Второй белок — RanBP3, находится в ядре, где обеспечивает взаимодействие экспортина с ЯПК. Для того чтобы

создать высокую концентрацию Ran на ЯПК, некоторые нуклеопорины связывают Ran с ядерной и цитоплазматической стороны. Один из них, Nur 358, также называется RanBP2.

Ran также выполняет важную роль в митозе, и за счет взаимодействия с импортином β регулирует доставку ключевых белков к митотическому веретену.

5.16 Для описания механизма ядерного транспорта предложено несколько моделей

Основные положения

- Взаимодействие между кариоферинами и нуклеопоринами играет критическую роль в транслокации белков через ядерную пору
- Направление транспорта частично определяется взаимодействием кариоферина с некоторыми нуклеопоринами

Сейчас известно, что связывание карго с транспортным рецептором и закрепление его на комплексе ядерной поры являются ключевыми событиями процесса ядерного адресования белков. Однако механизм, по которому комплексы белок-карго-кариоферин транспортируются через канал ядерной поры, остается невыясненным. При этом длина транспортного пути может достигать 200 нм, причем неизвестно, насколько перемещение связано с кинезином, миозином или с гидролизом АТФ.

В ранних экспериментах было показано, что для транспорта через ЯПК необходим гидролиз АТФ. Однако позже оказалось, что АТФ требуется для поддержания оптимального уровня ГТФ, участвующего в транспорте. Единственным процессом ядерного транспорта, для протекания которого необходим гидролиз ГТФ, является контроль его направления, который осуществляется с участием Ran.

Неизвестно, каким образом комплексы кариоферин-карго продвигаются по каналу ядерной поры. При рассмотрении возможных механизмов транслокации необходимо принимать во внимание известные группы фактов.

- Кариоферины взаимодействуют с большинством нуклеопоринов через повторы, содержащие фенилаланин и глицин (FG), причем эти повторы выстилают центральный канал поры.
- Исследования связывания показывают, что некоторые кариоферины проявляют повышенное сродство к определенным нуклеопоринам.
- Ran участвует не только во взаимодействии между карго и кариоферинами, но также между кариоферинами и нуклеопоринами.
- Кариоферины могут продвигаться вдоль поры в двух направлениях, хотя наиболее вероятен перенос ими карго только в одном направлении.

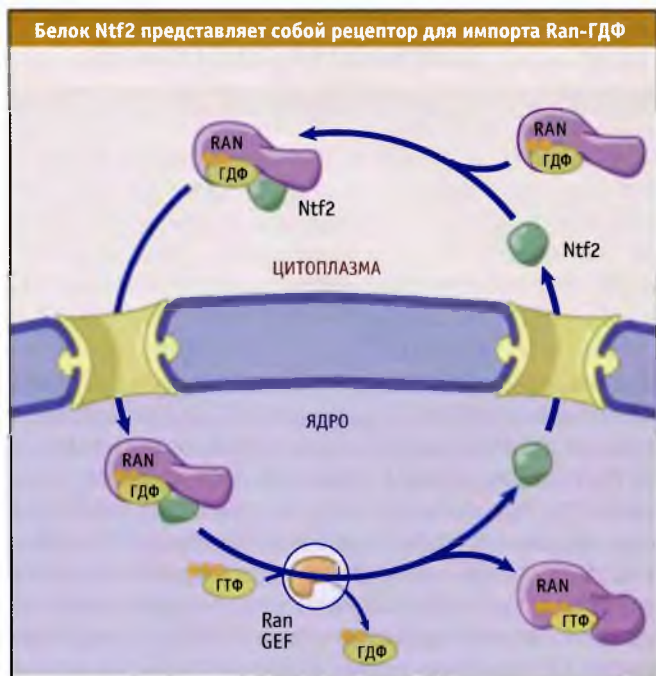
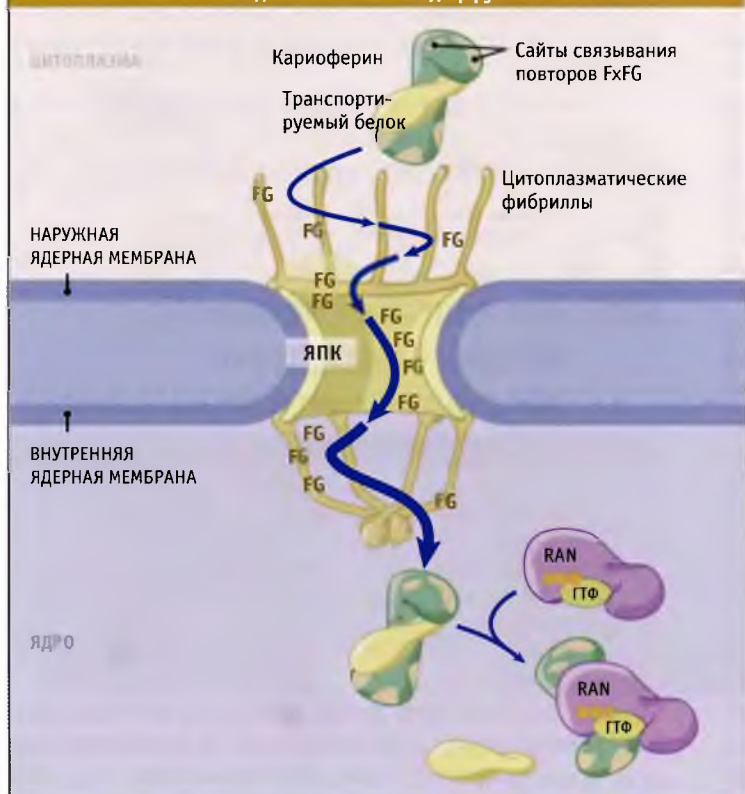


Рис. 5.41 Транспорт Ran в ядро происходит с участием небольшого белка, который называется Ntf2

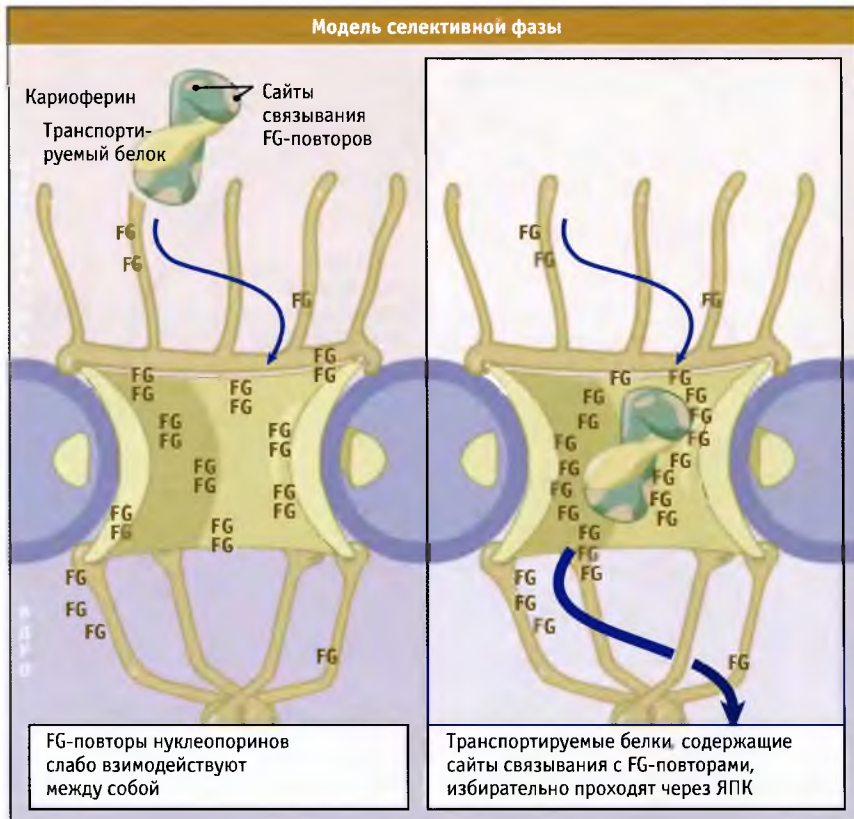


Простая модель транспорта предполагает, что движение белка по каналу происходит за счет облегченной диффузии. Согласно этой модели, транспортный рецептор вступает с нуклеопоринами во временное слабое взаимодействие, но при этом направление транспорта не учитывается. Оно определяется позже, Ran-зависимым процессом, который может происходить с любой стороны поры, как это показано для импорта (Рис. 5.42). Более сложная версия этой модели предполагает, что направление транспорта задается постепенным увеличением сродства между транспортным рецептором и нуклеопорином по мере движения комплекса карго/рецептор через канал ЯПК. Согласно этой модели, сродство нуклеопоринов к комплексу вдоль транспортного пути постепенно увеличивается.

Еще одна модель предложена на основании данных о том, что канал поры выстлается многими нуклеопоринами, содержащими гидрофобные FG-последовательности. Предполагается, что FG домены этих нуклеопоринов не структурированы и создают в канале гидрофобную среду. Как предполагает модель селективной фазы, представленная на Рис. 5.43, при притяжении FG-богатых регионов нуклеопоринов друг к другу в центре канала образуется барьер, через который не проходит большинство белков. Эта модель также предполагает наличие у кариоферина избирательного сродства к окружению в канале

ЯПК, что обеспечивает способность ядерной поры не пропускать многие белки через канал, и облегчать диффузию кариоферинных комплексов. Однако способность кариоферина взаимодействовать с FG нуклеопоринами позволяет им селективно продвигаться вдоль канала поры, и транспортировать связанные с ними белки карго. Доказательства в пользу реальности такой модели носят пока предварительный характер. К их числу относится быстрый характер кинетики импорта белков, а также взаимодействие кариоферина с FG повторами нуклеопоринов. Однако модель не объясняет, каким образом происходит транспорт больших комплексов, таких как рибосомы и иРНК-белковые комплексы.

По мере появления новых биофизических методов, использующих флуоресцентную микроскопию, которые позволяют проследить судьбу отдельных молекул, они применяются для исследования ядерного транспорта. Проведенные исследования дают возможность предполагать, что прохождение комплекса кариоферин-карго через канал ЯПК происходит очень быстро (в среднем занимает 10 мс); в основном движение носит стохастический характер, и стадией лимитирующей скоростью является выход комплекса из канала в ядро. По-видимому, через ЯПК может одновременно транспортироваться по крайней мере десять молекул субстрата (со своими рецепторами), и по нему может проходить примерно 1000 молекул белков в секунду.



Модель селективной фазы транслокации предполагает, что взаимодействия между FG-повторами предотвращают транслокацию большинства белков чере ЯПК. Белки, содержащие сайты связывания с FG-повторами, нарушают эти взаимодействия и проходят через ЯПК

5.17 Ядерный транспорт может регулироваться

Основные положения

- Импорт и экспорт белков являются регулируемыми процессами
- Ядерный транспорт используется клеткой для регуляции многих функций, включая прохождение по циклу и восприятие внешних сигналов
- Регуляцию ядерного транспорта можно проиллюстрировать на примере движения транскрипционного фактора NF-κB

Наличие у клеток эукариот ядерной оболочки создает такой уровень регуляции экспрессии генов и клеточного цикла, какой невозможен у прокариот. Как импорт, так и экспорт белка являются регулируемыми процессами. Существует много примеров, иллюстрирующих важность регулируемого ядерного транспорта для контроля транскрипции. В ответ на стресс и сигналы, контролирующие рост, клетки регулируют движение транскрипционных факторов между ядром и цитоплазмой. Например, циркадные ритмы контролируются регулируемым ядерным транспортом транскрипционных факторов PER (period) и TIM (timeless). Также в прохождении клетки по циклу и ее реакции на внешние сигна-

лы важную роль играет движение протеинкиназ и их регуляторов между ядром и цитоплазмой.

Поступление белков в ядро и выход из него может регулироваться на нескольких уровнях. Во-первых, способность карго взаимодействовать с транспортным рецептором может меняться при прямой модификации карго, за счет, например, фосфорилирования. Во-вторых, карго может закрепиться в каком-либо компартменте, и, таким образом, оказаться неспособным к дальнейшему транспорту. В-третьих, может меняться способность самой ЯПК к транспорту белков.

Многие ключевые аспекты регулируемого транспорта можно проиллюстрировать на примере транскрипционного фактора NF-κB (Рис. 5.44). В ответ на сигналы различной природы фактор мигрирует из цитоплазмы в ядро и активирует транскрипцию многих генов, участвующих в иммунном ответе. Для того чтобы активация фактора NF-κB обеспечивалась только определенным сигналом, он связан с ингибиторным белком, находящимся в цитоплазме, который называется I-κB (ингибитор κB). Это взаимодействие не позволяет NLS NF-κB взаимодействовать с импортином α. По получению клеткой сигнала активации NF-κB, происходит фосфорилирование и быстрая деградация I-κB. При этом открывается NLS в NF-κB,

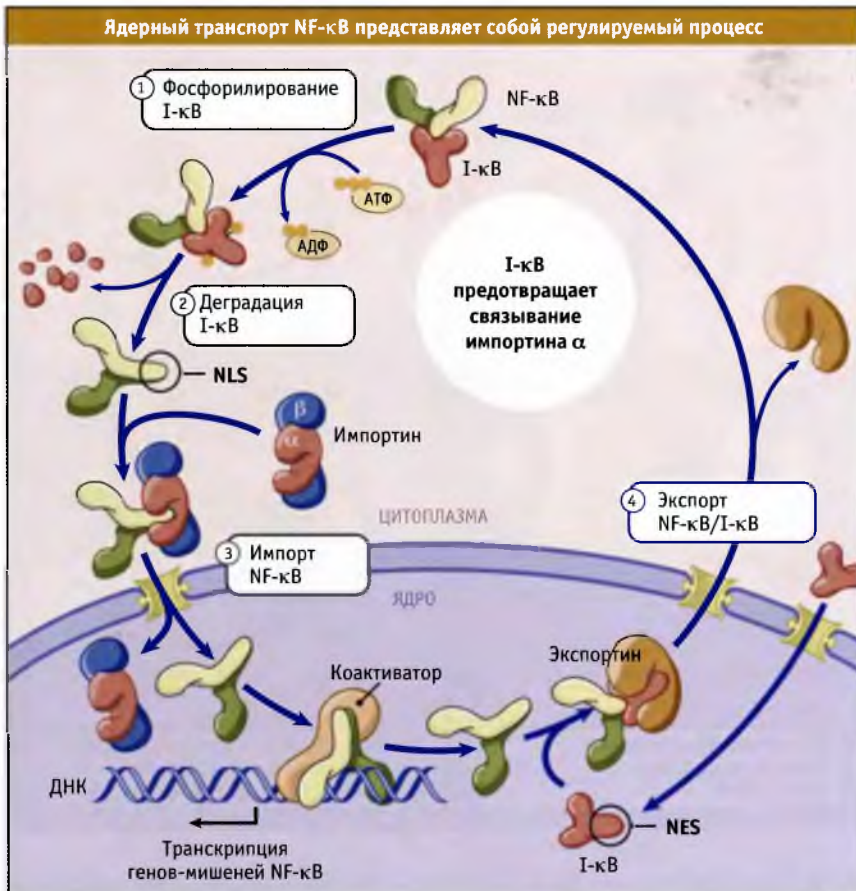


РИС. 5.44. Вход и выход из ядра белка NF-κB является тонко регулируемым процессом. Это достигается с помощью ковалентной модификации предсуществующего цитоплазматического белка заякоривания, I-κB, и синтеза его новых молекул, соответственно. Для простоты Rap не показана

происходит взаимодействие фактора с рецептором, и он поступает в ядро, где активирует транскрипцию гена-мишени.

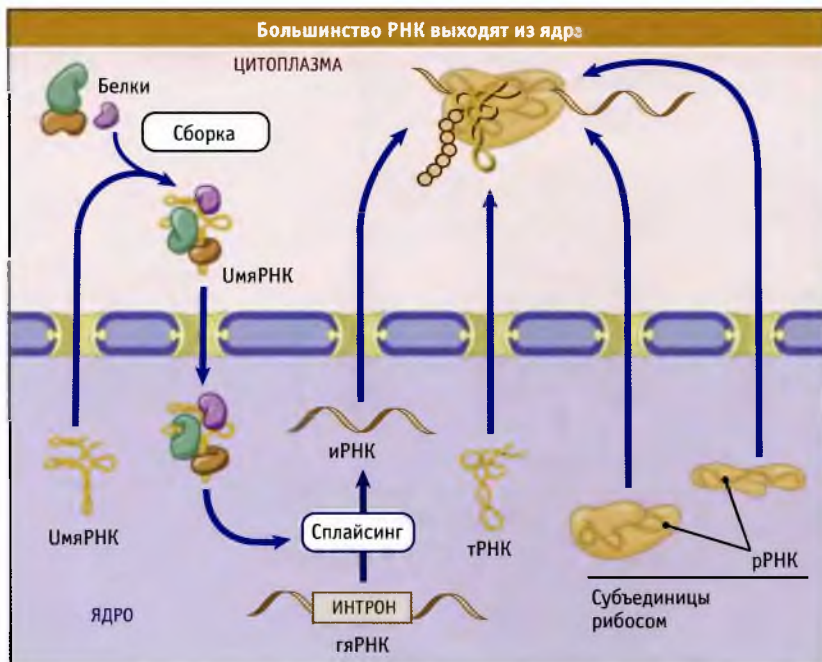
Напротив, экспорт NF-κB происходит при необходимости прекращения транскрипции в определенный момент времени. Ингибитор κB (I-κB) содержит элементы NLS и NES и циркулирует между ядром и цитоплазмой. Вновь синтезированные молекулы I-κB поступают в ядро, где связываются с NF-κB, и способствуют его выходу. Наряду с экранированием NLS в NF-κB, взаимодействие между NF-κB и I-κB экранирует NLS в I-κB. Поскольку NLS обоих белков оказываются экранированными, комплекс NF-κB и I-κB остается в цитоплазме, что предотвращает дальнейшую NF-κB-зависимую активацию транскрипции. Таким образом, путем регуляции входа транскрипционного фактора в ядро и выхода из него клетка контролирует реакцию на действие различных сигналов. Ответ развивается быстро, поскольку фосфорилирование I-κB и транспорт NF-κB происходят в течение нескольких минут после получения клеткой сигнала. В то же время для образования нового активного фактора с участием транскрипции и трансляции требуется от 30 до 60 мин.

5.18 Из ядра экспортируется много типов РНК

Основные положения

- В ядре образуются иРНК, тРНК и рибосомные субъединицы, которые выходят через ЯПК и в цитоплазме участвуют в трансляции
- В экспорте РНК участвуют те же ЯПК, что и в транспорте белка
- Процесс экспорта происходит с участием рецепторов и является энергозависимым
- Для транспорта каждого типа РНК необходимо участие различных растворимых транспортных факторов

Почти все типы РНК образуются в ядре и принимают участие в трансляции в цитоплазме (см. MBIO:5-0009). Поэтому иРНК, тРНК и рРНК-содержащие субъединицы рибосом должны выходить из ядра (рис. 5.45). Большая часть РНК не содержит сигналов экспорта, и для того, чтобы выйти из ядра она должна связаться с NES-содержащими белками. В клетке молекулы РНК фактически всегда находятся в комплексе с белками, что помогает защитить РНК от деградации и влияет на ее взаимодействие с другими клеточными компонентами.



мРНК, тРНК и субъединицы рибосом выходят из ядра и принимают участие в синтезе белка в цитоплазме. УмяРНК экспортируются, подвергаются процессингу и сборке в РНК-белковые комплексы, а затем импортируются в ядро, где они участвуют в процессинге РНК

Так же как и транспорт белка, транспорт РНК происходит через ЯПК. Это подтверждается данными электронно-микроскопических исследований. В ядра ооцитов *Xenopus* вводили частицы коллоидного золота, покрытые РНК. При последующем исследовании клеточных срезов в электронном микроскопе частицы обнаруживались в каналах ЯПК. Когда в ядро вводили золотые частицы в количестве, близком к насыщающему, то в большинстве каналов обнаруживались одна или несколько частиц. В специальном эксперименте было показано, что если в цитоплазму вводится достаточное количество частиц, покрытых NLS, то они обнаруживаются в большинстве пор. Эти результаты позволяют предположить, что в экспорте РНК и импорте белка используются одни и те же ЯПК. При введении в цитоплазму частиц одного размера, покрытых белком, а в ядро частиц другого размера, покрытых РНК, оказалось, что многие поры содержат золотые частицы обоих размеров (рис. 5.46).

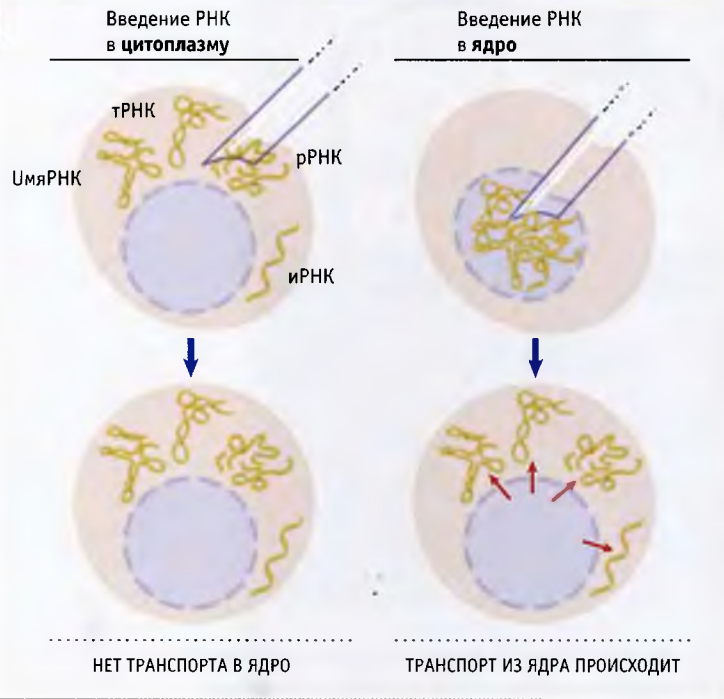
Почти все типы РНК экспортируются из ядра. Это было показано в исследованиях, в которых в ядра ооцитов *Xenopus* вводили меченую РНК. Клетки некоторое время инкубировали с тем, чтобы прошел транспорт, а затем фракционировали, выделяя ядерную и цитоплазматическую фракции. Результаты этих экспериментов показали, что тРНК, мРНК и УмяРНК выходят в цитоплазму (рис. 5.47). Наоборот, если РНК вводили в цитоплазму, то она оставалась там. Это свидетельствует о том, что транспорт РНК представляет собой односторонне направленный процесс. Если эксперименты по введению РНК в ядро проводили при 0 °С, экспорт РНК не происходил. Таким образом, эк-



РИС. 5.46. В цитоплазму ооцитов *Xenopus* вводили крупные частицы золота, покрытые нуклеоплазмином, несущим NLS. В ядро инъецировали мелкие частицы, покрытые РНК. На каждой фотографии видна одна ядерная пора и покрытые белком частицы, которые транспортируются с цитоплазматической на ядерную сторону ЯПК и частицы, покрытые РНК, которые транспортируются из ядра в цитоплазму через тот же ЯПК. Фотография воспроизведена из *The Journal of Cell Biology*, 1988, vol. 106, pp. 575–584. © Rockefeller University Press. Фотография любезно предоставлена Карлом Фельдхером и Стивом Дворецким

спорт РНК, так же как и экспорт белка, является энергетически зависимым процессом.

Участвуют ли в экспорте РНК различных типов одни и те же транспортные рецепторы? Это можно выяснить, определив, способен ли один тип РНК в процессе экспорта конкурировать с другим. В соответствующих экс-



периментах меченную РНК одного типа вводили в ядра вместе с немеченной РНК того же или другого типа. После инкубации клеток из них выделяли ядерную и цитоплазматическую фракции, которые анализировали методом гель-электрофореза с тем, чтобы определить, произошел ли экспорт введенной РНК.

На Рис. 5.48 представлена схема эксперимента, в котором меченную РНК вводили в ядра ооцитов совместно с возрастающими количествами немеченной тРНК или U1 мРНК. При этом оказалось, что в отличие от немеченной U1 РНК (или других ее типов) немеченная тРНК конкурирует с меченной тРНК в процессе экспорта. Наличие такой конкуренции говорит о том, что экспорт тРНК, также как и импорт белка, представляет собой процесс, для которого характерно насыщение. Это означает, что некоторые белки, или другие компоненты, с которыми тРНК взаимодействует при экспорте, присутствуют в клетке в ограниченных количествах. Отсутствие конкуренции со стороны других типов РНК указывает, что факторы, ограничивающие их экспорт, не участвуют в экспорте тРНК. Сходные результаты были получены при совместном введении меченных РНК других типов и различных немеченных РНК.

Из этих исследований можно сделать вывод о том, что для экспорта каждого типа РНК необходим, по крайней мере, один специфический фактор, влияющий на скорость процесса. Мы знаем, что в экспорте всех типов РНК используются одни и те же ЯПК, и, таким образом, их количество не является лимитирующим фактором. Подобные эксперименты не дают информации о количестве факторов, участвующих в транспорте каждого типа РНК, или о том, сколько таких факторов являются общими для

различных типов РНК, а сколько уникальными, участвующими в экспорте определенного типа молекул.

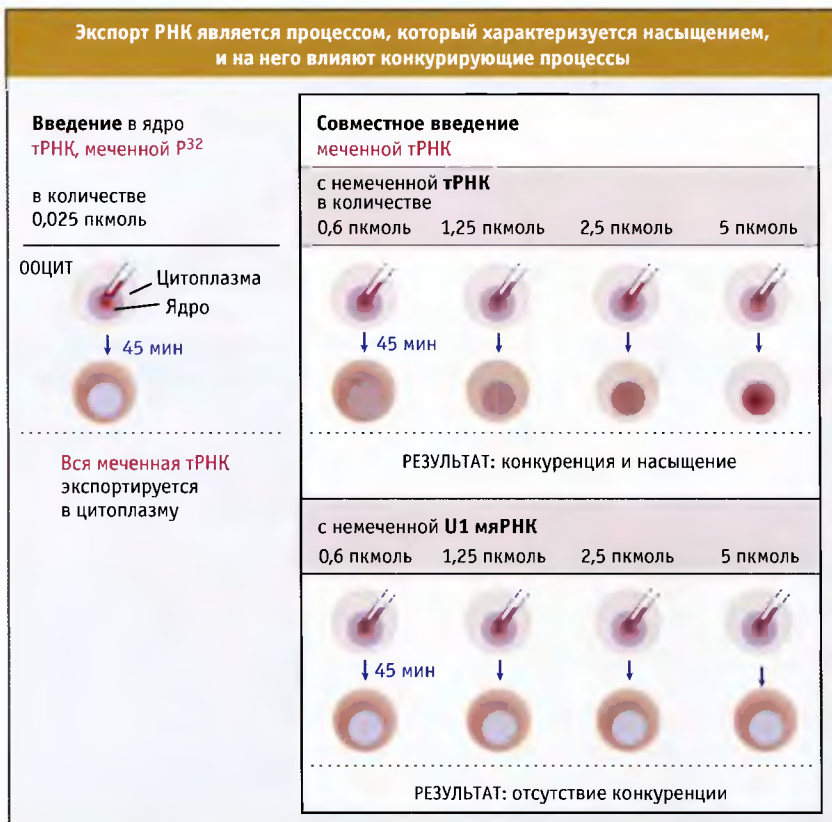
(Более подробные сведения об экспорте различных типов РНК содержатся в разделах 5.19. Субъединицы рибосом собираются в ядрышке и экспортируются с участием экспортина 1, 5.20. тРНК экспортируются с участием специального экспортина; 5.21. Информационные РНК экспортируются из ядра в виде РНК-белковых комплексов, 5.23 Экспорт иРНК требует участия нескольких новых факторов; 5.24. УмяРНК экспортируются, модифицируются, собираются в комплексы и импортируются; 5.25. Предшественники микроРНК экспортируются из ядра и подвергаются процессингу в цитоплазме.)

5.19 Субъединицы рибосом собираются в ядрышке и экспортируются с участием экспортина 1

Основные положения

- Субъединицы рибосом собираются в ядрышке, где образуется рРНК
- Для сборки в субъединицы рибосом белки импортируются из цитоплазмы
- В экспорте субъединиц рибосом участвуют белки-переносчики и Rap

Рибосомы представляют собой большие нуклеопро-теидные комплексы, состоящие из двух субъединиц,



5.48. Процесс экспорта РНК характеризуется насыщением. Экспорт различных классов РНК из ядра происходит с участием различных транспортных белков, количество которых определяет скорость процесса

содержащих около 80 белков и 4 молекулы рРНК. Они начинают собираться по отдельности в ядрышке и для окончательной сборки экспортируются в цитоплазму. Субъединицы рибосом принадлежат к числу самых крупных комплексов, способных транспортироваться через ЯПК. Их размер находится на верхнем пределе пропускания ядерной поры. Из-за большой величины субъединиц другие макромолекулы не транспортируются, когда через канал проходит рибосомная субъединица. Выше обсуждалось, что в одном ЯПК могут одновременно находиться РНК и белок (см. 5.18 Из ядра экспортируется много типов РНК). Таким образом, в случае рибосомных субъединиц мы имеем дело с другой ситуацией.

Сборка и экспорт двух субъединиц рибосом представляет собой чрезвычайно сложный процесс и в значительной степени зависит от ядерного транспорта. В биогенезе рибосом может участвовать до 50% транспортных ресурсов ядра. К числу компонентов рибосом относится значительная часть клеточных белков и РНК. Рибосомные белки образуются в цитоплазме, импортируются в ядро и поступают в ядрышко. Там они взаимодействуют с предшественниками рРНК и с факторами сборки. Предшественники рРНК образуются в ядрышке. После сборки каждая субъединица экспортируется через ЯПК. В цитоплазме субъедини-

цы объединяются с факторами инициации трансляции и с иРНК, образуя зрелые трансляционно-активные рибосомы.

В ядерном импорте всех известных рибосомных белков участвуют представители семейства кариоферринов и Ran-ГТФаза. Однако, по крайней мере для некоторых рибосомных белков, используется более одного специфического импортера. Например, у дрожжей в импорте одних и тех же белков участвуют два разных представителя семейства кариоферринов. Поскольку биогенез рибосом играет критическую роль в жизни клетки, избыточность обеспечивает достаточное количество компонентов для сборки.

Так же как и в случае других макромолекул, процесс экспорта субъединиц рибосом характеризуется насыщением, что свидетельствует в пользу его рецепторной природы. Это было продемонстрировано в экспериментах с введением субъединиц рибосом в ядра ооцитов *Xenopus*. Более того, в процессе экспорта субъединицы не конкурируют с другими РНК-белковыми комплексами, что позволяет предполагать использование разных транспортных рецепторов для субъединиц рибосом. Могут экспортироваться даже рибосомы бактерий. Это свидетельствует о том, что система экспорта в клетках эукариот может узнавать эти рибосомы. Не исключено, что в ходе эволюции

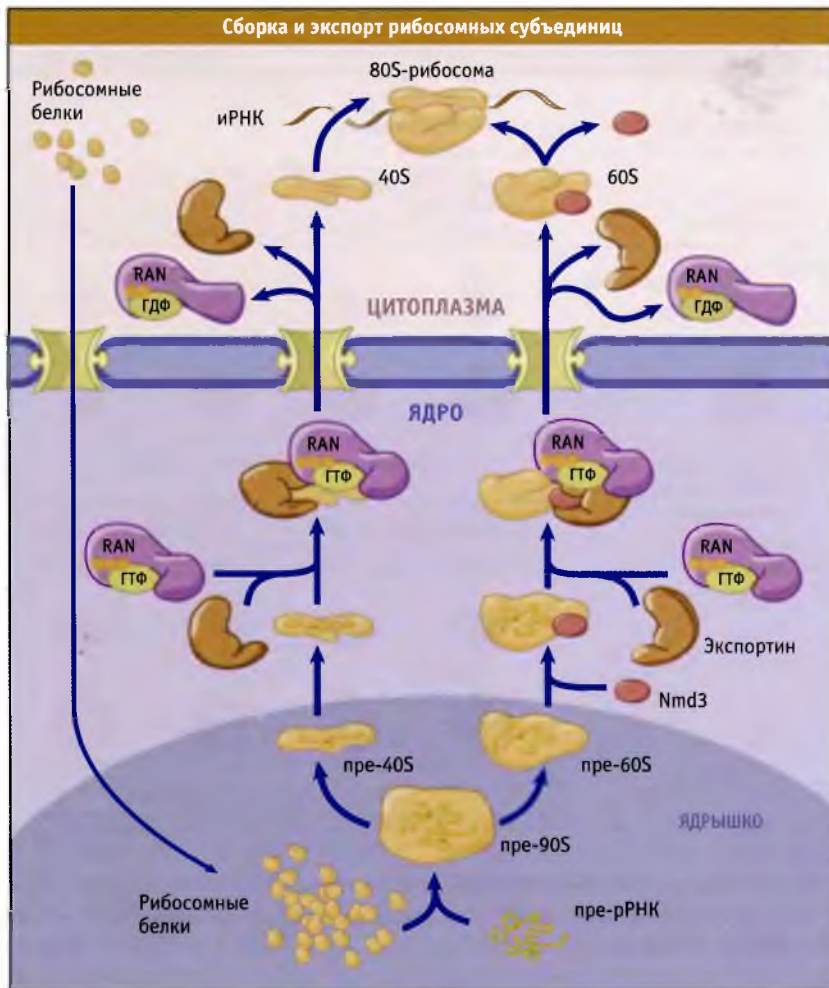


РИС. 5.45 Сборка субъединиц рибосом из рРНК и импортированных рибосомных белков происходит в ядрышке. После этого субъединицы экспортируются при участии Crm1 экспортина. Процесс зависит от Ran. Связыванию Crm1 с большой субъединицей способствует Nmd3

эукариот системы экспорта образовались достаточно рано для того, чтобы приспособиться к рибосомам своих прокариотических предков.

Что представляет собой рецептор экспорта рибосомальных субъединиц? На основании исследований мутантов дрожжей мы знаем, что экспорт большой (60S) и малой (40S) субъединиц происходит с участием экспортина Crm I (и Ran). В случае 60S-субъединицы с ней связывается адаптерный белок, называемый Nmd3, который способствует присоединению Crm I (рис. 5.45). В экспорте 40S-субъединицы также участвует экспортер, однако в данном случае белок Nmd3 не требуется, и адаптер пока не обнаружен. Другая группа исследований, проведенных на дрожжах, показывает, что в экспорте рибосомных субъединиц также участвует другой белок, Rrp12. Этот белок структурно близок к кариоферину-овому семейству рецепторов и, как и в случае кариоферина-ов, связывается как с FG-повторами нуклеопоринов, так и с Ran. Он также связывается с пре-рРНК.

5.20 тРНК экспортируются с участием специального экспортина

Основные положения

- Транспортным рецептором для тРНК является экспортер-t
- Экспорт тРНК требует участия Ran
- На экспорт тРНК влияют модификации ее молекулы
- тРНК может повторно импортироваться в ядро

тРНК образуются в ядре, где они подвергаются процессингу, и затем выходят в цитоплазму. Там они аминокислотилируются и принимают участие в трансляции. Экспортируются из ядра только такие тРНК, которые прошли полный процессинг (MBIO:5-0010).

Экспорт тРНК из ядра происходит с участием специальных транспортных рецепторов и Ran. Экспериментально доказано, что экспорт тРНК представляет собой рецепторный процесс, поскольку введение в ядра ооцитов *Xenopus* тРНК в возрастающих количествах приво-

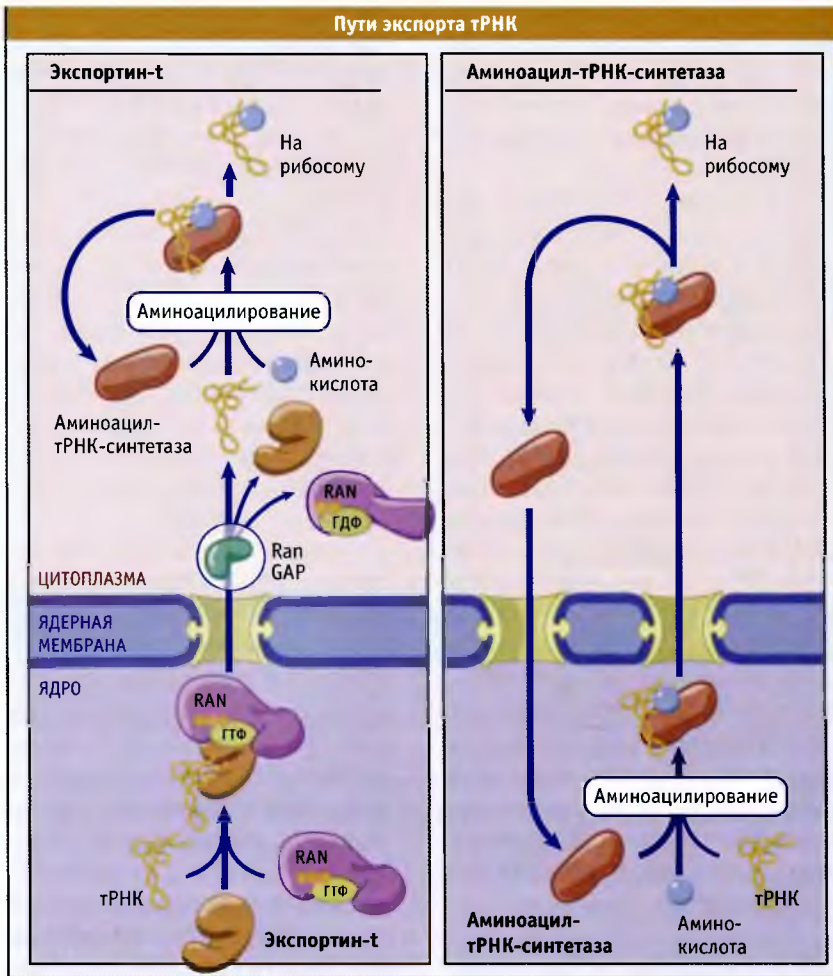


Рис. 5.20. Транспорт тРНК из ядра может происходить с участием Ran. При этом тРНК связывается с экспортином- t (показано слева). В экспорте тРНК также может играть роль ее аминокислотное ацилирование (показано справа)

дит к насыщению процесса ее экспорта. Для экспорта тРНК также оказывается критическим поддержание асимметричного распределения Ran (Ran-ГТФ в ядре и Ran-ГДФ в цитоплазме). Необходимость наличия Ran для экспорта тРНК продемонстрирована в экспериментах по введению в ядро Ran-GAP, обычно находящегося в цитоплазме. Поскольку Ran-GAP стимулирует гидролиз ГТФ под действием Ran, он предотвращает накопление в ядре Ran-ГТФ и тем самым ингибирует экспорт тРНК.

Экспортером для тРНК служит экспортин- t , представитель семейства карьофертинов. Этот белок непосредственно связывается с РНК. Более того, он предпочтительнее связывается с полностью процессированной тРНК. Тем самым гарантируется, что РНК, которая не подверглась процессингу, не будет экспортирована преждевременно. Как показано на рис. 5.20, в ядре экспортин- t непосредственно связывается с тРНК в присутствии Ran-ГТФ, образуя тримерный комплекс тРНК-экспортин-Ran-ГТФ. Этот комплекс аналогичен образующимся между другими экспортинами и белками, содержащими NES. Тримерный комплекс проходит через ядерную

пору в цитоплазму. После стимуляции гидролиза ГТФ под действием Ran-GAP происходит его диссоциация с высвобождением тРНК.

Для участия в трансляции тРНК должны подвергнуться аминокислотному ацилированию, которое обычно происходит в цитоплазме. Однако этот процесс также может осуществляться в ядре. В некоторых исследованиях было показано, что аминокислотная тРНК экспортируется более эффективно и является лучшим субстратом для экспортина- t . Поскольку аминокислотное ацилирование зависит от того, насколько полно и точно прошел процессинг предшественников тРНК, это служит еще одним механизмом сверки, позволяющим убедиться в том, что в цитоплазму выходят только функционально полноценные тРНК, которые будут участвовать в трансляции.

Некоторые тРНК созревают за счет сплайсинга, механизм которого отличается от механизма сплайсинга пре-иРНК. В клетках дрожжей некоторые ферменты сплайсинга тРНК находятся в цитоплазме. Поэтому в цитоплазме мутантов, дефектных по процессу сплайсинга, накапливается незрелая тРНК. Однако в ядре были най-

дены зрелые формы этих тРНК. Это позволяет предполагать, что тРНК могли быть импортированы в ядро после сплайсинга, а затем ре-экспортированы. Этот процесс может обеспечить более тонкую сверку, позволяющую убедиться в том, что в синтезе белка принимают участие только зрелые молекулы тРНК.

У дрожжей существует один ген, *Los1*, который кодирует экспортин-1. Интересно, что *Los1* не является для дрожжей критическим геном, обеспечивающим выживаемость клеток. Это позволяет предполагать, что для тРНК существуют альтернативные пути экспорта. Молекулы тРНК достаточно малы (около 30 000 Да) и могли бы выходить из ядра просто за счет диффузии. Если бы это действительно имело место, то привело бы к выравниванию концентрации тРНК по клетке. Однако, как известно, большая часть тРНК находится в цитоплазме. Существуют ли еще какие-либо рецепторы, обеспечивающие экспорт тРНК? Если дрожжевая клетка несет мутацию, в результате которой замедляется синтез тРНК, то она теряет жизнеспособность, если нарушена структура экспортин-1. Эти наблюдения позволяют прийти к выводу о том, что ферменты, которые присоединяют аминокислоты к тРНК — аминокил-тРНК-синтетазы, могут функционировать как экспортные рецепторы для тРНК (рис. 5.50). Эта модель предполагает, что тРНК-синтетазы обладают челночной функцией. Они должны связываться с тРНК и аминокилировать ее в ядре, затем сопровождать аминокилированную форму в цитоплазму, высвобождать там тРНК для трансляции и снова поступать в ядро.

5.21 иРНК экспортируются из ядра в виде РНК-белковых комплексов

Основные положения

- Белки, которые связываются с иРНК в процессе транскрипции, отмечают места процессинга на пре-иРНК, и, вероятно, также участвуют в упаковке иРНК для экспорта
- Большинство белков в ядре, связанных с иРНК, после экспорта теряют с ней связь и возвращаются в ядро. Некоторые белки удаляются непосредственно перед экспортом
- На белках, связанных с иРНК, могут присутствовать сигналы для ее экспорта
- Экспорт иРНК может регулироваться, однако механизм этой регуляции остается неизвестным

Как уже отмечалось, большинство РНК образуются в ядре и экспортируются в цитоплазму, где осуществляют свои функции (см. 5.18 Из ядра экспортируется много типов РНК). Все процессы биогенеза иРНК, происходящие в ядре, начиная от транскрипции и заканчивая экспортом, являются взаимосвязанными. РНК не экспортируются в свободном виде, а в комплексе с белками. В случае иРНК, с ее предшественниками (пре-иРНК) по мере синтеза ассоциируются многочисленные белки (рис. 5.52) (см. MBIO:5-0011). Образующиеся РНК-белковые комплексы называются **гетерогенные ядер-**

ные рибонуклеопротеиновые частицы (гЯРНК частицы). Соответствующие белки (отличные от кэп-связывающих и поли(А) связывающих белков) называются белками гЯ-РНК частиц.

В клетках человека присутствует по крайней мере 20 различных белков гЯРНК частиц. Некоторые из них участвуют в формировании структуры пре-иРНК, необходимой для того, чтобы процессинг осуществлялся в нужном направлении. Это важно, поскольку экспортируются только те иРНК, которые прошли полный и правильный процессинг (см. 5.23 Экспорт иРНК требует участия нескольких новых факторов). Используя инструменты, позволяющие отличать иРНК, которые прошли неправильный процессинг, клетка предотвращает экспорт дефектных иРНК, способных образовывать неправильные белки, присутствие которых может оказаться для нее вредным.

Считается, что функция многих белков, связывающихся с иРНК в ядре, состоит в облегчении ими упаковки иРНК, предназначенной для экспорта. Большинство клеток эукариот содержит от 3000 до 15 000 различных иРНК. Эти РНК сильно варьируют по размерам, последовательности и вторичной структуре, которая образуется при скручивании их молекул. Предполагают, что, образуя РНК-белковые комплексы до начала экспорта, различные иРНК приобретают общие структурные особенности, важные для их эффективного экспорта. Некоторые из белков, связанных с иРНК, могут содержать специфические сигналы экспорта.

Ассоциация белков с иРНК носит временный характер. Некоторые из них удаляются до момента прохождения гЯРНК частицы через ЯПК. Другие сопровождают РНК во время выхода из ядра. После транслокации через ЯПК, большая часть остающихся белков удаляется и возвращается обратно в ядро для участия в экспорте других иРНК.

Поскольку гЯРНК представляют собой большие комплексы, поскольку для того, чтобы пройти через ЯПК, они могут изменить свою конформацию. Уникальная особенность клеток насекомого *Chironomus tentans* позволяет наблюдать стадии экспорта гЯРНК из ядра. На определенной стадии развития, когда происходит индукция транскрипции нескольких генов, этот организм образует набор крайне больших иРНК. Сайты, на которых происходит активный процесс транскрипции, называются **кольцами Бальбиани** (см. 6.14 Политенные хромосомы образуют вздутия в местах экспрессии генов). Образующиеся иРНК характеризуются очень большими размерами, и, подобно другим видам иРНК, связаны с гЯРНК частицами. Эти частицы называются **гранулами колец Бальбиани**. Как показано на рис. 5.52, они транспортируются через ядерные поры.

Диаметр гранул кольца Бальбиани гораздо больше диаметра канала ЯПК, который составляет около 27 нм. Гранулы можно визуализировать в электронном микроскопе, исследуя клеточные препараты, зафиксированные на разных стадиях процесса транспорта. Как показано на рис. 5.52, при прохождении через

Различные иРНК, которые образуются в клетке, обладают лишь немногими общими чертами, способными функционировать в качестве сигналов экспорта. Однако такие черты могут быть свойственны белкам, и вполне вероятно, что один или несколько белков гЯРНП частиц содержат сигнал ядерного экспорта. Согласно этому представлению, белки, обладающие NES, связываются с иРНК, а транспортный рецептор узнает NES. По крайней мере на некоторых белках гЯРНП частиц находятся NES, а на других белках они отсутствуют. Экспорт некоторых иРНК происходит с участием сигналов, которые локализованы на белках, связывающихся с иРНК, но не принадлежащих к белкам гЯРНП частиц.

Хотя обычно до завершения процессинга иРНК не экспортируются, известно, что некоторые РНК вирусов, содержащие интронные последовательности, могут выходить в цитоплазму. Ярким примером тому является РНК ВИЧ-1. Как и другие ретровирусы, ВИЧ-1 продуцирует набор перекрывающихся молекул иРНК, и некоторые из них подвергаются сплайсингу. Однако экспортироваться также должны полноразмерные вирусные РНК, не прошедшие сплайсинг, поскольку они представляют собой форму вирусной РНК, необходимую для воспроизводства новых инфекционных вирусных частиц. Также они функционируют как иРНК при образовании некоторых ВИЧ-белков.

Для того чтобы обеспечить экспорт иРНК, не прошедших сплайсинг, ВИЧ-1 обладает специальным механизмом. При трансляции одного из вариантов сплайсинга иРНК вируса образуется белок Rev. Этот белок связывается с последовательностью, которая присутствует в иРНК ВИЧ-1, не прошедших сплайсинг, и называется участок активации Rev (RRE). Белок Rev содержит NES, богатый лейцином. (см. 5.14 *Экспорт белков из ядра также происходит с участием рецепторов*). Этот сигнал участвует в экспорте как свободного белка Rev, так и связанного с иРНК, которая содержит RRE. Сигнала RRE оказывается достаточным для того, чтобы обеспечить связывание Rev и экспорт иРНК в цитоплазму. При этом экспорт происходит таким же образом, как и экспорт белка, с участием экспортина 1 (см. рис. 5.36).

Как и экспорт белка, экспорт иРНК меняется в ответ на внешний стимул и изменения внутриклеточной среды (см. 5.17 *Ядерный транспорт может регулироваться*). Наилучшим примером регуляции экспорта иРНК в соответствии с реакцией клетки служит такое стрессорное воздействие, как температура. Эта реакция носит название тепловой шок, хотя она также развивается и при других видах стресса (например, при осмотическом шоке, действии токсических металлов или этанола в высокой концентрации).

Реакция теплового шока проявляется также в том, что большинство полиаденилированных РНК не экспортируются и накапливаются в ядре. В клетке происходит экспрессия генов теплового шока, которые кодируют белки, играющие защитную роль, и из ядра

должны выходить иРНК белков теплового шока. Поэтому при тепловом шоке предотвращается экспорт некоторых иРНК и происходит экспорт иРНК белков теплового шока. Механизм такого переключения экспорта остается невыясненным. Мы знаем, что регуляция экспорта иРНК при тепловом шоке не требует синтеза новых белков и может быть обнаружена уже через несколько минут после наступления теплового шока. Это позволяет предполагать, что индуцируется система передачи сигнала, изменяющая аппарат ядерного транспорта таким образом, что он начинает селективно экспортировать иРНК стрессорных белков или биогенез иРНК меняется в таком направлении, что правильно упаковываются и идентифицируются для экспорта только те иРНК, которые обеспечивают синтез стрессорных белков.

5.22 гЯРНП транспортируются от мест процессинга к ЯПК

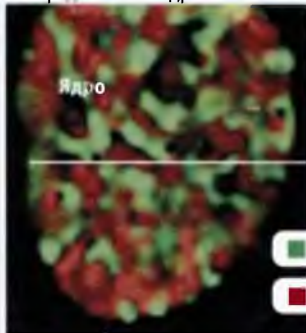
Основные положения

- После завершения процессинга пре-иРНК, иРНК выходят из территорий хромосом в межхромосомные домены
- иРНК продвигаются к периферии ядра за счет диффузии через межхромосомные пространства

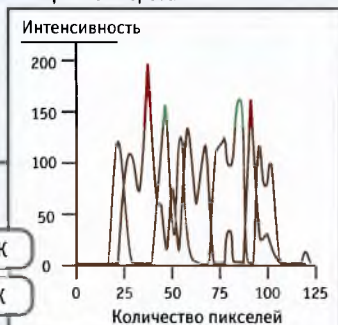
Транскрипция и процессинг иРНК происходят в ядре, что предполагает продвижение гЯРНП из мест транскрипции внутри ядра, на его периферию, к ЯПК. Обычно сайты транскрипции служат сайтами процессинга иРНК. 5'-кэпирование происходит, как только РНК достигнет такой величины, которая позволяет ей освободиться от холофермента РНК-полимеразы: сплайсинг начинается в процессе транскрипции, и 3'-концы образуются при деградации РНК, пока она еще представляет собой растущую цепь. При дефекте сплайсинга или 3'-процессинга, иРНК не экспортируются.

Мы предполагаем, что гЯРНП диффундируют от сайтов транскрипции и процессинга через межхромосомные пространства к ЯПК и затем выходят из ядра. Известно, что РНК находится во всех частях ядра, не заполненных хромосомами (рис. 5.53). Предположение о том, что гЯРНП диффундируют через эти места по направлению к ЯПК, подтверждается экспериментами, проведенными на клетках слюнной железы *Drosophila melanogaster*. В этих клетках ядра отличаются крайне большими размерами, поскольку содержат много копий генома. После процессинга гЯРНП продвигаются к периферии ядра с равной скоростью во всех направлениях. Скорость движения составляет примерно 1 мк/с, т. е. такая же, как и при пассивной диффузии. Молекулярные моторы транспортируют грузы со скоростью от нескольких десятых до десяти мк в с. Однако они обычно транспортируют грузы вдоль филаментов и строго в определенном направлении.

Распределение в ядре



Распределение по границе поперечного среза



■ ДНК
■ РНК

рис. 5.53. Полиаденилированная РНК и ДНК окрашивались флуоресцирующими красителями (красным и зеленым соответственно). При определении мест локализации красных и зеленых сигналов вдоль прямой линии, проведенной через ядро (справа), можно видеть, что позиции РНК и ДНК не перекрываются. Области иРНК примыкают к областям, занятым ДНК, и перекрещиваются с ними. Фотографии и график взяты из *Curr. Biol.*, vol. 9, Politz, J.C., *Movement of Nuclear...*, pp. 285–291. © 1999 с разрешения Elsevier. Фотографии любезно предоставлены Джоан С. Ритланд Политц, Медицинский факультет Массачусеттского университета

5.23 Экспорт иРНК требует участия нескольких новых факторов

Основные положения

- Известно много факторов, которые требуются для экспорта РНК
- Факторы, связывающиеся с иРНК и комплексом ядерной поры, способны влиять на экспорт иРНК
- Один из факторов, Dbr5, представляет собой АТФазу, использующую энергию гидролиза АТФ для удаления белков гЯРПН частиц при транспорте

Экспорт иРНК представляет собой гораздо более сложный процесс, чем транспорт белков через ядерную мембрану. Во-первых, для экспорта иРНК необходимо гораздо больше белковых факторов, чем для транспорта белков. Все эти факторы отличаются от Ran и от кареоферин, участвующих в транспорте белков. Во-вторых, экспорт иРНК скоординирован с транскрипцией и процессингом иРНК таким образом, что экспортируются только те иРНК, которые прошли процессинг. Фактически некоторые белки, участвующие в экспорте иРНК, могут принимать участие в процессинге, который должен правильно завершиться для экспорта иРНК. Что служит показателем готовности иРНК к экспорту, и каким образом распознается этот показатель? В настоящее время эти вопросы интенсивно исследуются.

Кэпирование иРНК не влияет на экспорт, но ускоряет этот процесс. Однако сплайсинг и 3'-процессинг связаны с экспортом. Факторы сплайсинга и полиаденилирования начинают связываться с иРНК даже во время транскрипции (рис. 5.51). На рис. 5.54 показано, что после сплайсинга у метазоа белковый комплекс, который называется комплексом сращивания экзонов (англ. *exon junctional complex*, EJC), остается на границе сплайсинга. Присутствие этого комплекса может свидетельствовать о том, что прошел сплайсинг иРНК. Однако этого может оказаться недостаточно для экспорта, поскольку EJC остается на иРНК уже после удаления одного интрона, однако экспорт возможен лишь после удаления всех интронов.

Среди белков, входящих в EJC, присутствует фактор экспорта иРНК, который называется Aly. Этот белок относится к REF семейству белков, связывающихся с РНК. Он взаимодействует с компонентом сплайсосомы UAP56, и с TAP, который связывается с FG-повторами некоторых нуклеопоринов (см. 5.10 Ядерные поровые комплексы состоят из нуклеопоринов). Белок TAP может играть в экспорте такую же роль, как экспортин 1, относящийся к группе кареоферин. (рис. 5.54). Он одновременно связывается с нуклеопоринами и с **информационными рибонуклеопротеидными частицами (иРНП)**, представляющими собой комплекс зрелой иРНК и связанных с ней белков. Таким образом, TAP можно рассматривать как рецептор для иРНП. Для экспорта некоторых иРНК клеток млекопитающих необходим экспортин1, в то время как кареоферины для экспорта большинства иРНК, вероятно, не требуются.

У дрожжей большинство генов характеризуется отсутствием интронов. Однако дрожжевые аналоги белков Aly и Yra1 играют столь же важную роль в экспорте иРНК, как и в клетках высших эукариот. В процессе транскрипции белки Sub2 (дрожжевой аналог белка UAP56) и Yra1, связываются с иРНК. Вначале они, вероятно, взаимодействуют с белковым комплексом, который носит название ТНО. Этот комплекс участвует в элонгации транскрипции и переносит белки на вновь синтезированную иРНК. Подобно тому как представлено на рис. 5.54 для метазоа, аналог TAP, называемый Mex67, связывается с Yra1.

Впервые белок TAP был обнаружен при исследовании вируса Мезон-Пфайзера (MPMV) обезьян, относящегося к группе ретровирусов. Хотя для всех ретровирусов характерен экспорт иРНК, происходящий как до сплайсинга, так и после него, большинство их не продуцирует белки, участвующие в экспорте, такие как ВИЧ-1 Rev (см. 5.14 Экспорт белков из ядра также происходит с участием рецепторов). Для экспорта незрелой РНК MPMV необходимо наличие короткой последовательности, называемой конститутивный транспортный элемент (СТЕ), которая связывается с TAP. Хотя такая последовательность как MPMV СТЕ, не

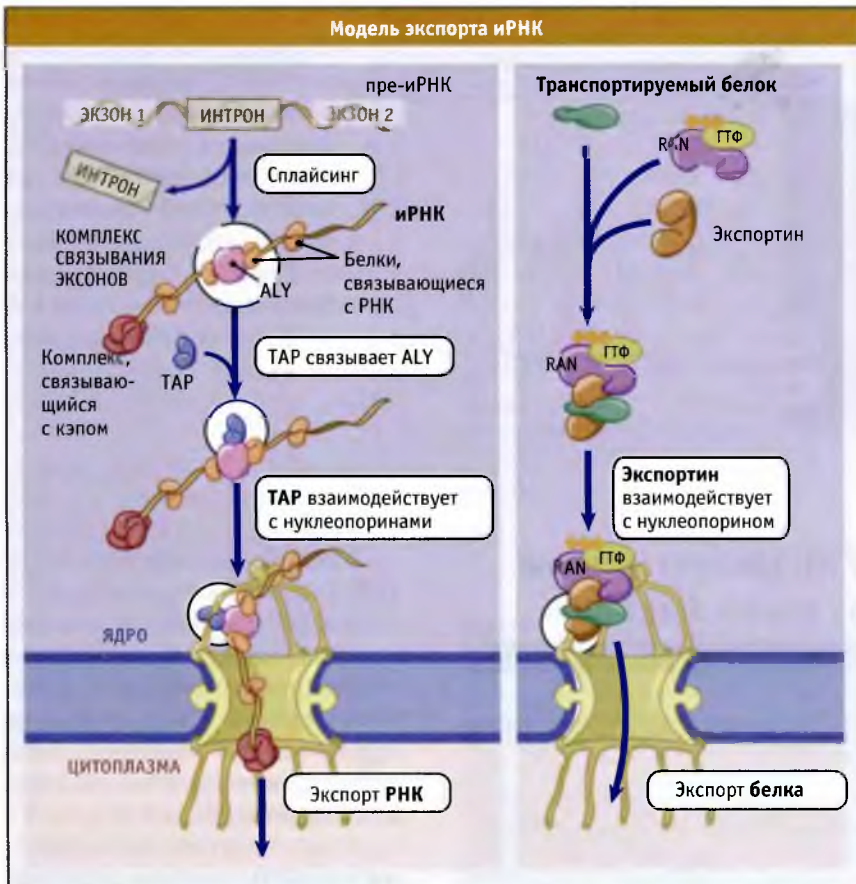


РИС. 5.54. ТАР связывается как с иРНК, так и с ЯПК и функционирует как экспортный рецептор для иРНК. Функция ТАР аналогична функции экспортина при транспортировке белков

является обязательным элементом клеточных иРНК, для их экспорта необходим комплекс ТАР/Мех67. Белок ТАР является представителем семейства NXF белков, которые, по-видимому, принимают участие в экспорте РНК.

Перед экспортом иРНК из ядра, вероятно, проверяется правильность процессинга и его полнота. По крайней мере, в клетках дрожжей, молекулы иРНК, процессинг которых не прошел полностью, удерживаются поблизости от сайтов транскрипции. Экзосома представляет собой комплекс рибонуклеаз, расположенный рядом с сайтами транскрипции, и разрушающий иРНК в случае ошибочного процессинга (см. также **MB10:5-0012**). Для того чтобы молекулы иРНК могли выйти из мест, где они удерживаются, они, по-видимому, должны подвергнуться правильному 3'-процессингу и полиаденилированию.

Состав иРНК-белковых комплексов, находящихся в ядре, отличается от их состава после прохождения через ЯПК. Ключевым событием транспорта является удаление некоторых белков, связанных с иРНК. В отличие от транспорта белка, когда по обеим сторонам ядерной оболочки находится один и тот же белок, а

направление транспорта определяется системой Rap ГТФаза (см. 5.15 *Направление ядерного транспорта контролируется Rap-ГТФазой*), направление экспорта иРНК контролируется изменением состава иРНК. Этот состав распознается как карго, только когда частица находится в ядре. Вместе с тем, для того чтобы обеспечить более тесное взаимодействие между рибосомой и иРНК при трансляции, может оказаться необходимым удаление части иРНК белков. Предполагается, что по мере того, как иРНК выходят из ЯПК, они ассоциируют с рибосомами, что может способствовать экспорту. Однако, поскольку ингибиторы синтеза белка не блокируют экспорт иРНК, функция рибосом не влияет на экспорт.

Каким образом удаляются белки из иРНК частиц? Точно мы этого не знаем, но можно представить три возможности. Некоторые белки иРНК частиц узнаются кариоферинами как белки, которые должны быть транспортированы в ядро. При связывании с кариоферинами они меняют свою конформацию и диссоциируют от иРНК. Другие белки после транспорта сами отделяются от иРНК и направляются назад в ядро до того, как успевают связаться с ней повторно. Однако многие

УмяРНК экспортируются, модифицируются, собираются в комплексы и импортируются

Основные положения

- Образующиеся в ядре УмяРНК (малые ядерные иРНК) экспортируются, модифицируются, упаковываются в УмяРНП, т. е. РНК-белковые комплексы, и поступают в ядро для участия в процессинге РНК

Малые ядерные рибонуклеопротеидные частицы (мяРНП) представляют собой РНК-белковые комплексы, которые играют центральную роль в сплайсинге пре-иРНК и в процессах созревания ядерной иРНК (см. **MB10:5-0013**). УмяРНК, входящая в состав мяРНП, образуется в ядре. Однако в клетках млекопитающих для образования функциональных мяРНП требуется экспорт УмяРНК, ее модификация и ассоциация с белками в цитоплазме, и импорт комплекса УмяРНП (рис. 5.56). Затем импортированный УмяРНП-комплекс собирается в мяРНП.

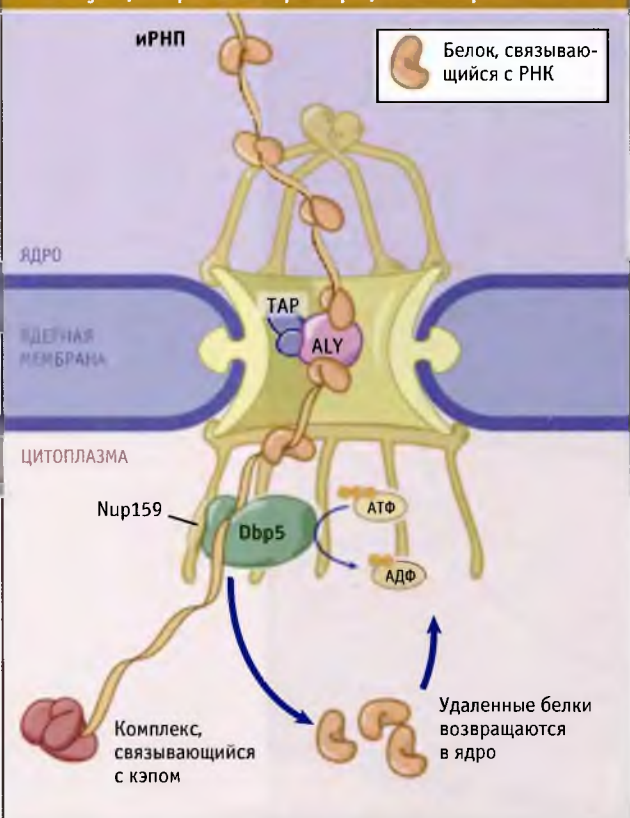
Большинство УмяРНК образуются при участии РНК-полимеразы II. Подобно иРНК, которые также являются продуктами действия РНК-полимеразы II, УмяРНК характеризуются присутствием монометилированного 5-кэпа, но отличаются от иРНК отсутствием поли(А)-последовательности. Наличие кэпа у УмяРНК служит ключевым сигналом экспорта. Когда РНК входит в цитоплазму, происходит метилирование с образованием триметил-Г кэпа, и при взаимодействии с набором белков, которые называются Sm, РНК собирается в РНК-белковый комплекс. Триметил кэп участвует в сплайсинге, а с помощью белков создается трехмерная структура каждой мяРНП. Эти комплексы, называемые УмяРНП, импортируются в ядро при участии транспортного рецептора, состоящего из адаптера (снурпортина) и импортина β . Белки, связывающиеся с кэпом, и Sm белки служат сигналом импорта.

Мы предполагаем, что у почкующихся дрожжей УмяРНК не экспортируются из ядра. У этих организмов УмяРНП собираются в ядре из РНК и импортированных белков. Пока мы не знаем, почему в клетках млекопитающих образование функционально полноценных мяРНП включает процессы экспорта и импорта.

Предшественники микроРНК экспортируются из ядра и подвергаются процессингу в цитоплазме

Основные положения

- МикроРНК образуются в ядре в результате транскрипции и подвергаются частичному процессингу с образованием предшественника шпильчатой структуры. Затем этот предшественник при участии экспортина-V экспортируется в цитоплазму, где происходит его окончательный процессинг



Dbp5 взаимодействует с терминальными филаментами

ЯПК, где он использует энергию АТФ для того, чтобы в процессе экспорта иРНК удалить белки иРНП

белки оказываются связанными с иРНК настолько прочно, что не удаляются.

Третья возможность состоит в том, что связанные с иРНК белки могут удаляться ферментативно. В клетках дрожжей и млекопитающих возможным кандидатом на роль такого фермента может являться один из белков экспорта иРНК, белок Dbp5. Этот белок перемещается между ядром и цитоплазмой и связывается с цитоплазматическими фибриллами ЯПК. Он является представителем семейства белков «домена смерти» (DEAD-box proteins), для которых характерна последовательность Glu(D)-Asp(E)-Ala(A)-Glu(D), и другие консервативные мотивы. Белки этого семейства гидролизуют АТФ и, возможно, участвуют во многих аспектах метаболизма иРНК. Некоторые из этих белков *in vitro* способны расплавлять небольшие двухспиральные молекулы РНК и таким образом вызывать диссоциацию связанных с ней белков. На рис. 5.55 представлена схема, иллюстрирующая удаление белков из иРНП частиц с участием Dbp5. Согласно этой схеме, белок Dbp5, связанный с цитоплазматическими фибриллами ЯПК, использует энергию гидролиза АТФ для удаления белков из иРНП частиц.

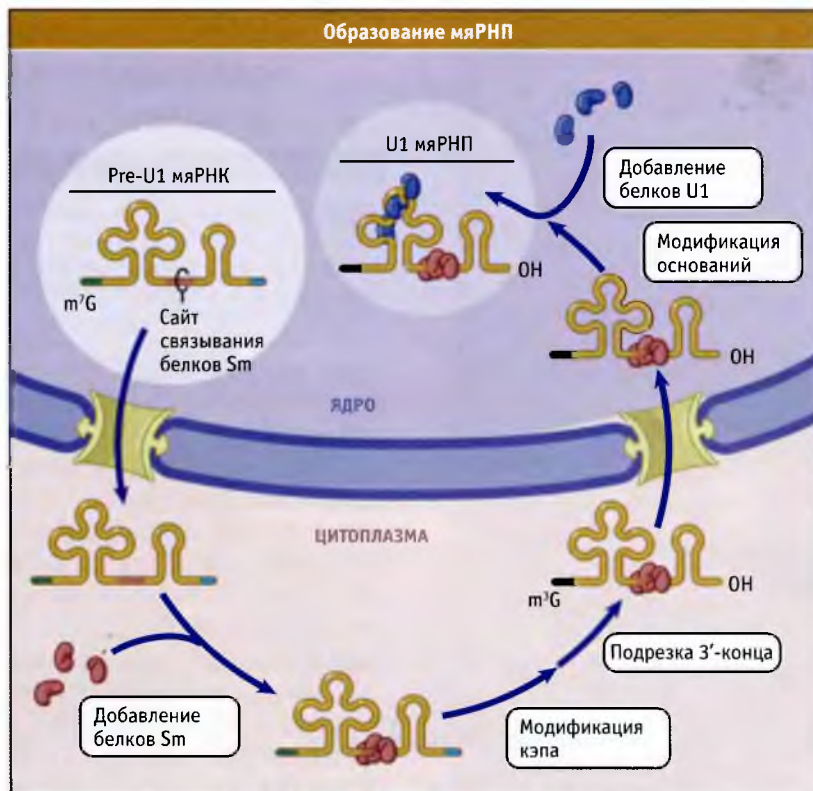


РИС. 5.56. Образование мяРНП включает экспорт пре-U1 мяРНК, модификацию мяРНК в цитоплазме и импорт мяРНП в ядро для дальнейших модификаций

Семейство маленьких РНК, называемых микроРНК, играет важную роль в регуляции экспрессии генов. В длину эти РНК составляют 21–22 нуклеотида и обнаружены у многоклеточных организмов как растительного, так и животного происхождения. В клетках человека находится более 250 типов микроРНК. Они играют регуляторную роль в процессах развития, дифференцировки, программированной гибели клеток (апоптоза), в органогенезе и клеточной пролиферации. Они функционируют, связываясь с иРНК, которые находятся в цитоплазме и являются для них мишенями, тем самым блокируя их трансляцию и, возможно, увеличивая скорость обмена.

МикроРНК представляют собой продукты транскрипции, происходящей с участием РНК-полимеразы II, и в клетках животных образуются из больших предшественников при действии комплекса, содержащего фермент, по свойствам близкий к РНКазе III. Гены, кодирующие микроРНК, обычно расположены в межгенных промежутках и в пределах интронных участков генов, кодирующих белки. Часто предшественник содержит много микроРНК и обладает сложной, частично шпильчатой структурой. В ядре при участии фермента DRISHA происходит процессинг предшественника с образованием шпильчатых структур, каждая из которых содержит одну молекулу микроРНК (рис. 5.57). Эти структуры экспортируются из ядра под действием экспортина-5, причем

процесс очень напоминает экспорт тРНК, в котором участвует экспортин-т. В цитоплазме предшественник подвергается воздействию другого фермента, напоминающего РНКазу III, который называется DICER. Вместе с другими белками этот фермент воздействует на шпильчатые структуры и образует функционально полноценную микроРНК (подробнее см. **MBIO:5-0014**)

5.26 Что дальше?

На сегодняшний день строение клеточного ядра и механизмы ядерного транспорта представляют собой две наиболее активно исследуемых области биологии клетки. Во взглядах на существование и функционирование опорных структур ядра господствует неопределенность. Содержатся ли в ядре скелетные структуры, которые играют роль, сходную с ролью цитоскелета в организации цитоплазмы и во внутриклеточном транспорте? При исчерпывающей экстракции ядер остаются короткие филаменты, частично организованные в нерастворимую сеть. Однако как они организованы в ядре живой клетки? Прикрепляются ли машины репликации в опорным ядерным структурам? Если да, то тогда ДНК, на которой работают эти машины, должна находиться в движении,

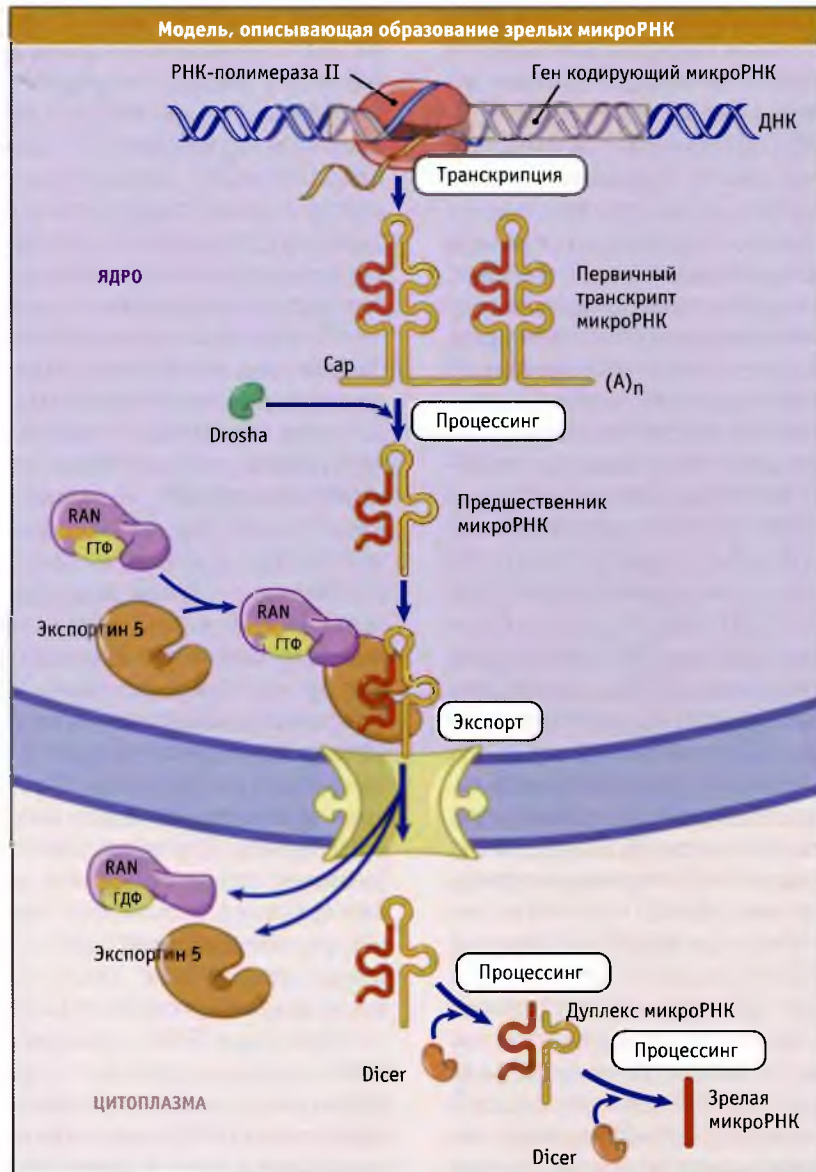


Рис. 5.57. микроРНК вначале подвергаются процессингу в ядре и экспортируются в цитоплазму, где, прежде чем превратиться в зрелые микроРНК, они претерпевают дальнейший процессинг

а сами машины должны быть фиксированы. Существуют ли аналогичные фабрики транскрипции?

Методами иммуногистохимии уже идентифицировано много ядерных субкомпарментов или телец, и ожидается, что это количество будет еще увеличиваться. Как построены эти тельца; какие белки они содержат; и что определяет их белковый состав и условия формирования? Хотя некоторые из этих компарментов, вероятно, функционируют как хранилища факторов, необходимых для процессинга, мы не знаем механизмов поступления макромолекул и их комплексов в эти структуры и выхода из них. Может быть, окажется возможным получить очищенные или обогащенные препараты этих субъядерных компарментов и использовать протеомные методы для определения их состава, подобно тому, как сделано для ядрышек и ядерных спеклов. Такие подходы могут дать ключ к выяснению фун-

кций субкомпарментов, и помочь сформулировать представления относительно их возможной роли.

Мы также не знаем, каким образом происходит позиционирование белков на внутренней и внешней мембранах ядра. По-видимому, для некоторых белков внутренней ядерной мембраны частью механизма адресования является транслокация в ЭПР. Эти белки мигрируют с внешней ядерной мембраны на внутреннюю через изгиб мембраны поблизости от ЯПК. Пересекают ли некоторые белки внутренней ядерной мембраны перинуклеарное пространство?

ЯПК по размеру в 40 раз превышает рибосому, однако из-за симметричной структуры она содержит меньше различных полипептидов, по сравнению с рибосомой. В митозе, при распаде ядерной оболочки, ЯПК пропадают. Это не означает полного их исчезновения, и полагают, что

нуклеопорины остаются открытыми в виде субкомплексов. Каков механизм сборки пор при повторном формировании ядерной оболочки? В течение интерфазы происходит удвоение количества ЯПК. Образуются ли новые поры по тому же механизму, по которому они собираются по окончании митоза? Сравнительно низкое относительное содержание нуклеопоринов придает этому вопросу особую остроту.

Как построен ЯПК? Можно ли решить этот вопрос с помощью рентгеноструктурного анализа? Необходимо принимать во внимание несколько факторов, сильно усложняющих проблему. Во-первых, для получения кристаллов необходимо большое количество очищенного материала, а ЯПК трудно выделяются в очищенном виде, даже если в качестве исходного материала используются перфорированные ламеллы цитоплазмы, не содержащие ядерной ламины. Во-вторых, для поддержания трехмерной нативной структуры ЯПК может оказаться необходимой связь комплекса с ядерной оболочкой. Хотя современное состояние экспериментальной базы позволило установить строение некоторых мембранных белков, исследование структуры ЯПК представляет собой гораздо более сложную задачу, чем для растворимых или небольших мембранных белков. Поскольку каждый ЯПК обычно окружен ядерной мембраной, получение кристаллов, для формирования которых необходима ассоциация с мембраной, может оказаться вообще невозможным. В дополнение ко всему, ЯПК представляют собой очень большие по размеру структуры; правда, оказалось возможным получить данные по строению вирусных частиц примерно таких же размеров. В настоящее время предпринимаются попытки использовать для исследования деталей структуры ЯПК новые методические подходы, такие как электронную микроскопию высокого разрешения и масс-спектрометрический анализ. Для дальнейших исследований ЯПК, вероятно, необходима комбинация различных экспериментальных подходов, включая очистку субкомплексов и установление их строения с помощью рентгеноструктурного анализа, сборку субкомплексов *in vitro*, и подходы к исследованию их организации *in vivo*, например, с использованием эффекта флуоресцентного резонансного переноса энергии. Вместе все эти подходы должны привести к установлению полной белковой карты ЯПК.

Хотя за последние десять лет в исследованиях ядерного транспорта был достигнут существенный прогресс, остается неясным, каким образом в действительности макромолекулы продвигаются через ЯПК. Сколько контактов при прохождении через пору должен образовать комплекс кариоферин-карго? Что обеспечивает диссоциацию комплекса ЯПК-кариоферин-карго? Для объяснения механизма транслокации белка через канал поры предложено несколько моделей, причем каждая подтверждена экспериментально (описание двух моделей см. в разделе 5.16 *Для описания механизма ядерного транспорта предложено несколько моделей*). Согласно представлениям одной из моделей, по мере продвижения по каналу к месту конечной локализации белка, комплексы кариоферин-транспортируемый белок находятся в области постепенного увеличения

сродства к нуклеопоринам. Другая модель предполагает, что за счет повторов, содержащих фенилаланин и глицин, образуется гидрофобный барьер, который преодолевается кариоферинами, что обеспечивает им возможность переносить транспортируемый белок через ЯПК. Мы не знаем, насколько состав окружения в канале ЯПК отличается от состава нуклеоплазмы и цитоплазмы, и как это влияет на транспорт. Для исследования транспорта отдельных молекул используются перспективные биофизические методы, которые позволяют получать ценную информацию.

Хотя для большинства кариоферинов были идентифицированы карго, мы не знаем, какие сигналы импорта они должны узнавать. Всегда ли эти сигналы представляют собой первичные последовательности, или являются структурами, иногда узнаваемыми, как при узнавании тРНК экспортином-1. В данном случае подход с использованием методов протеомики мог бы помочь определить полный набор карго для каждого кариоферина. В большинстве случаев транспорт регулируется путем модификации или изменения доступности карго. Возможна ли вообще регулировка транспорта на уровне рецепторов, и если да, то в каких случаях это происходит? Например, у многоклеточных больше распространены кариоферины, включающие несколько отдельных, но близко родственных кариоферин α . В клетках *S. cerevisiae* присутствует только один кариоферин α . Играют ли различные кариоферины α специфическую роль в развитии, дифференцировке, или в реализации тканевых функций? В делящихся клетках дрожжей *S. pombe* обнаружены два импортина α , но клеткам необходим только один из них. Это позволяет предполагать, что они выполняют различные роли.

Транспорт иРНК и субъединиц рибосом происходит более сложным образом, чем транспорт белков и тРНК. Идентифицированы факторы, участвующие в экспорте некоторых иРНК и субъединиц рибосом, однако функции других остаются невыясненными. Некоторые белки, экспортирующиеся вместе с иРНК, в процессе транскрипции связываются с РНК-полимеразой, и переносятся на иРНК. У многоклеточных, по крайней мере 20 белков способны связываться с иРНК в ядре, хотя возможно, что не все эти белки связываются с определенной иРНК. Считается, что они определяют места процессинга и упаковки иРНК для экспорта. Какова общая структура, которую обеспечивают эти белки для иРНК? Насколько специфично они связываются с иРНК? Какими дополнительными белками и как регулируется связывание этих белков с РНК? Существуют ли еще какие-либо белки, способные до начала экспорта связываться с белками уже находящимися на РНК? Какие функции они выполняют?

Каким изменениям подвергаются иРНК в процессе синтеза и экспорта? В экспериментах *in vitro* подробно изучены процессы транскрипции, 5'-кэпирования, сплайсинга и 3'-процессинга иРНК. Однако *in vivo* все эти процессы связаны не только между собой, но и с экспортом иРНК. Каким образом достигается их скоординированность? Что обеспечивает полноту и точность процессинга иРНК? Каким образом дифференцируются

ядерные РНК, подлежащие деградации, от тех, которые должны экспортироваться? Одна из возможностей заключается в том, что ассоциация с аппаратом сплайсинга физически ограничивает движение иРНК до момента завершения процессинга с участием сплайсосомы. В данном случае может действовать механизм некой кинетической сверки, при которой ядерные экзонуклеазы разрушают любую иРНК, в течение определенного времени не освободившуюся от сплайсосомы. Хотя нет данных, указывающих на непосредственное участие любого кариоферина и Ran-ГТФазы в экспорте иРНК, мы не можем с уверенностью утверждать, что они не участвуют в этом процессе. В отношении экспорта субъединиц рибосом, мы не знаем, чем обеспечивается их готовность выйти из ядрышек, и каков механизм их миграции в ЯПК? В экспорте рибосомальных субъединиц определенную роль играет экспортин 1. Однако эти субъединицы по размерам гораздо крупнее, чем обычные белки карго кариоферина, и их продвижение по каналу ЯПК, вероятно, осуществляется гораздо более сложным образом, и с участием большего количества факторов, чем транспорт полипептидов.

События ядерного транспорта играют важную роль в проникновении в ядро многих вирусов. Слишком крупные вирусы перед прохождением через ЯПК подвергаются частичной разборке, однако более мелкие проникают в ядро в интактном состоянии. Что направляет вирусы в ядро? Узнаются ли некоторые типы вирусных частиц растворимыми рецепторами или другими факторами? Аденовирусы, например, слишком велики, чтобы интактными проникнуть в ядро. Вероятно, попадание в ядро вирусной ДНК обеспечивается формированием тесного контакта между вирусом и ЯПК с цитоплазматической стороны. Важно отметить, что вирус и ЯПК должны содержать определенные детерминанты, обеспечивающие такое взаимодействие. Характерна ли такая стратегия для большинства крупных вирусов или только для некоторых? Поступают ли геном и белки вируса в цитоплазму после прохождения через ЯПК? Возможно ли разработать противовирусные препараты, которые воздействуют на миграцию вируса в ядро, не влияя на другие процессы клеточного транспорта?

5.27 Резюме

Ядро представляет собой важную микроструктуру эукариотической клетки, которая содержит все ее хромосомы. Хотя в ядре нет субкомпарментов, ограниченных мембранами, оно содержит отдельные домены, выполняющие специфические функции. Ядро окружено двойной мембраной, которая пронизана ЯПК, являющимися единственными каналами сообщения между ядром и цитоплазмой. Внутренняя организация ядра характеризуется динамичной природой. Репликация ДНК, а возможно, и транскрипция иРНК, сосредоточена в спе-

циальных сайтах, называемых факторами. Факторы, участвующие в процессинге РНК, циркулируют между местами их депонирования и сайтами транскрипции.

Небольшие по размеру молекулы и макромолекулы менее 40 кДа диффундируют через ЯПК, однако для транспорта больших макромолекул необходимо наличие специфических сигналов. Большинство процессов ядерного транспорта происходит с участием группы близких по структуре белков, называемых кариоферинами, узнающих специфические сигналы и взаимодействующих с ЯПК. В ядро импортируется много белков, а некоторые челночные белки могут также из него экспортироваться.

Для того чтобы обеспечить транспорт белков только в необходимом направлении, в клетке находится ГТФаза, которая называется Ran. Ran-ГТФ присутствует в ядре, а Ran-ГДФ в основном в цитоплазме. Ran-ГТФ взаимодействует с рецепторами импорта, что приводит к диссоциации белка, транспортированного в ядро. Он кооперативно связывается с рецепторами экспорта и челночными белками, обеспечивая образование экспортного комплекса. После доставки белка по назначению, рецепторы возвращаются в исходные компартменты, некоторые в качестве карго для других рецепторов, а некоторые в качестве тех же рецепторов.

Ядерный транспорт является важнейшим механизмом, посредством которого клетка контролирует экспрессию генов и другие процессы. Многие факторы транскрипции транспортируются в ядро только при поступлении в клетку специфического сигнала или другого импульса. В основе регулируемого транспорта лежит много механизмов. Это модификации транскрипционных факторов или других белков (фосфорилирование или дефосфорилирование), происходящие в ответ на получение клеткой сигнала, после чего они могут узнаваться транспортными рецепторами. Иногда белки находятся в цитоплазме как часть комплекса. В некоторых случаях фосфорилирование других компонентов комплекса приводит к высвобождению транскрипционного фактора, который затем может транспортироваться в ядро.

Почти все РНК, образующиеся в ядре, функционируют в цитоплазме и поэтому должны из него экспортироваться. Экспорт не начинается до тех пор, пока не завершатся все этапы процессинга РНК в ядре. тРНК и микроРНК экспортируются с участием рецепторов, относящихся к семейству кариоферина, и напоминающих рецепторы, которые транспортируют белки. Субъединицы рибосом собираются в ядрышке и экспортируются при участии нескольких дополнительных факторов. После завершения процессинга пре-иРНК происходит экспорт иРНК в виде РНК-белковых комплексов. Транскрипция, процессинг пре-иРНК и экспорт иРНК представляют собой согласованные процессы. Важные для процессинга и экспорта факторы в момент транскрипции связаны с РНК-полимеразой II, и некоторые остаются с иРНК до момента экспорта. Экспорт также требует участия многочисленных специфических факторов. Чтобы убедиться, что в цитоплазму экспортируются РНК, которые прошли полный и безошибочный процессинг, в ядре существует эффективная система проверки.

Список литературы

5.3 Каждая хромосома занимает отдельную территорию

Обзор

- Gilbert, N., Gilchrist, S., and Bickmore, W. A., 2005. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int. Rev. Cytol.* v. 242 p. 283–336.
- Parada, L., and Misteli, T., 2002. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol.* v. 12 p. 425–432.
- Singer, R. H., and Green, M. R., 1997. Compartmentalization of eukaryotic gene expression: causes and effects. *Cell* v. 91 p. 291–294.

Исследование

- Casolari, J. M., Brown, C. R., Komili, S., West, J., Hieronymus, H., and Silver, P. A., 2004. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. *Cell* v. 117 p. 427–439.
- Fay, F. S., Taneja, K. L., Shenoy, S., Lifshitz, L., and Singer, R. H., 1997. Quantitative digital analysis of diffuse and concentrated nuclear distributions of nascent transcripts, SC35 and poly(A). *Exp. Cell Res.* v. 231 p. 27–37.
- Mathog, D., Hochstrasser, M., Gruenbaum, Y., Saumweber, H., and Sedat, J., 1984. Characteristic folding pattern of polytene chromosomes in *Drosophila* salivary gland nuclei. *Nature* v. 308 p. 414–421.
- Politz, J. C., Tuft, R. A., Pederson, T., and Singer, R. H., 1999. Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr. Biol.* v. 9 p. 285–291.
- Zachar, Z., Kramer, J., Mims, I. P., and Bingham, P. M., 1993. Evidence for channeled diffusion of pre-mRNAs during nuclear RNA transport in metazoans. *J. Cell Biol.* v. 121 p. 729–742.

5.4 Ядро содержит субкомпарменты, которые не окружены мембраной

Обзор

- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., and Campos, I., 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* v. 2 p. E107–12.
- de Jong, L., Grande, M. A., Mattern, K. A., Schul, W., and van Driel, R., 1996. Nuclear domains involved in RNA synthesis, RNA processing, and replication. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* v. 6 p. 215–246.
- Dundr, M. and Misteli, T., 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem. J.* v. 356 p. 297–310.
- Gall, J. G., 2000. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 16 p. 273–300.
- Huang, S., and Spector, D. L., 1996. Dynamic organization of pre-mRNA splicing factors. *J. Cell. Biochem.* v. 62 p. 191–197.
- Lamond, A. I., and Sleeman, J. E., 2003. Nuclear substructure and dynamics. *Curr. Biol.* v. 13 p. R825–R828.
- Matera, A. G., 1999. Nuclear bodies: multifaceted subdomains of the interchromatin space. *Trends Cell Biol.* v. 9 p. 302–309.
- Misteli, T., and Spector, D. L., 1998. The cellular organization of gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 10 p. 323–331.
- Olson, M. O., Dundr, M., and Szebeni, A., 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* v. 10 p. 189–196.
- Scheer, U., and Hock, R., 1999. Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 11 p. 385–390.

- Spector, D. L., 1993. Prokaryotic domains within the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 9 p. 265–315.
- Spector, D. L., 2001. Nuclear domains. *J. Cell Sci.* v. 114 p. 2891–2893.
- Sternsdorf, T., Grotzinger, T., Jensen, K., and Will, H., 1997. Nuclear dots: actors on many stages. *Immunobiology* v. 198 p. 307–331.

Исследование

- Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M., and Lamond, A. I., 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* v. 12 p. 1–11.
- O'Keefe, R. T., Mayeda, A., Sadowski, C. L., Krainer, A. R., and Spector, D. L., 1994. Disruption of pre-mRNA splicing in vitro results in reorganization of splicing factors. *J. Cell Biol.* v. 124 p. 249–260.
- Scherl, A., Couté, Y., Doné, C., Callé, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C., Greco, A., Hochstrasser, D., and Diaz, J. J., 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol. Biol. Cell* v. 13 p. 4100–4109.
- Verheggen, C., Lafontaine, D. L., Samarsky, D., Mouaikel, J., Blanchard, J. M., Bordonne, R., and Bertrand, E., 2002. Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. *EMBO J.* v. 21 p. 2736–2745.

5.5 Некоторые процессы происходят в определенных ядерных сайтах и определяются их структурами

Обзор

- Cook, P. R., 1999. The organization of replication and transcription. *Science* v. 284 p. 1790–1795.
- de Jong, L., Grande, M. A., Mattern, K. A., Schul, W., and van Driel, R., 1996. Nuclear domains involved in RNA synthesis, RNA processing, and replication. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* v. 6 p. 215–246.
- Jackson, D. A., 2003. The principles of nuclear structure. *Chromosome Res* v. 11 p. 387–401.
- Nickerson, J. A., Blencowe, B. J., and Penman, S., 1995. The architectural organization of nuclear metabolism. *Int. Rev. Cytol.* v. 162A p. 67–123.
- Penman, S., 1995. Rethinking cell structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 92 p. 5251–5257.
- Singer, R. H., and Green, M. R., 1997. Compartmentalization of eukaryotic gene expression: causes and effects. *Cell* v. 91 p. 291–294.

Исследование

- Capco, D. G., Wan, K. M., and Penman, S., 1982. The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition. *Cell* v. 29 p. 847–858.
- Fay, F. S., Taneja, K. L., Shenoy, S., Lifshitz, L., and Singer, R. H., 1997. Quantitative digital analysis of diffuse and concentrated nuclear distributions of nascent transcripts, SC35 and poly(A). *Exp. Cell Res.* v. 231 p. 27–37.
- He, D. C., Nickerson, J. A., and Penman, S., 1990. Core filaments of the nuclear matrix. *J. Cell Biol.* v. 110 p. 569–580.
- Hozak, P., Jackson, D. A., and Cook, P. R., 1994. Replication factories and nuclear bodies: the ultrastructural characterization of replication sites during the cell cycle. *J. Cell Sci.* v. 7 p. 2191–2202.
- O'Keefe, R. T., Henderson, S. C., and Spector, D. L., 1992. Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences. *J. Cell Biol.* v. 116 p. 1095–1110.

5.6 Ядро окружено ядерной оболочкой

Обзор

- Andersson, S. G. and Kurland, C. G., 1999. Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr. Opin. Microbiol.* v. 2 p. 535–544.
- Fahrenkrog, B., Stoffler, D., and Aebi, U., 2001. Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v. 259 p. 95–117.
- Lang, B. F., Gray, M. W., and Burger, G., 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* v. 33 p. 351–397.
- McFadden, G. I., 1999. Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr. Opin. Plant Biol.* v. 2 p. 513–519.
- Rout, M. P. and Aitchison, J. D., 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 16593–16596.

Исследование

- Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., and Ellenberg, J., 2001. Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J. Cell Biol.* v. 154 p. 71–84.
- Maul, G. G., Price, J. W., and Lieberman, M. W., 1971. Formation and distribution of nuclear pore complexes in interphase. *J. Cell Biol.* v. 51 p. 405–418.
- Stoffler, D., Goldie, K. N., Feja, B., and Aebi, U., 1999. Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* v. 287 p. 741–752.
- Winey, M., Yasar, D., Giddings, T. H., Jr., and Mastronarde, D. N., 1997. Nuclear pore complex number and distribution throughout the *S. cerevisiae* cell cycle by three-dimensional reconstruction from electron micrographs of nuclear envelopes. *Mol. Biol. Cell* v. 8 p. 2119–2132.

5.7 Ядерная ламина подстилает ядерную оболочку

Обзор

- Broers, J. L., Hutchison, C. J., and Ramaekers, F. C., 2004. Laminopathies. *J. Pathol* v. 204 p. 478–488.
- Dabauvalle, M. C. and Scheer, U., 1991. Assembly of nuclear pore complexes in *Xenopus* egg extract. *Biol. Cell* v. 72 p. 25–29.
- Goldman, R. D., Gruenbaum, Y., Moir, R. D., Shumaker, D. K., and Spann, T. P., 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* v. 16 p. 533–547.
- Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R. D., Shumaker, D. K., and Wilson, K. L., 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 6 p. 21–31.
- Hutchison, C. J., Alvarez-Reyes, M., and Vaughan, O. A., 2001. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J. Cell Sci.* v. 114 p. 9–19.
- Taddei, A., Hediger, F., Neumann, F. R., and Gasser, S. M., 2004. The function of nuclear architecture: a genetic approach. *Annu. Rev. Genet.* v. 38 p. 305–345.
- Wilson, K. L., Zastrow, M. S., and Lee, K. K., 2001. Lamins and disease: insights into nuclear infrastructure. *Cell* v. 104 p. 647–650.

5.8 Между ядром и цитоплазмой осуществляется активный транспорт больших молекул

Исследование

- Feldherr, C. M., 1969. A comparative study of nucleocytoplasmic interactions. *J. Cell Biol.* v. 42 p. 841–845.

5.9 Ядерные поровые комплексы представляют собой симметричные каналы

Обзор

- Fahrenkrog, B., Stoffler, D., and Aebi, U., 2001. Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v. 259 p. 95–117.
- Kessel, R. G., 1992. Annulate lamellae: a last frontier in cellular organelles. *Int. Rev. Cytol.* v. 133 p. 43–120.
- Rout, M. P. and Aitchison, J. D., 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 16593–16596.
- Schwartz, T. U., 2005. Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* v. 15 p. 221–226.
- Wischnitzer, S., 1970. The annulate lamellae. *Int. Rev. Cytol.* v. 27 p. 65–100.

Исследование

- Akey, C. W., and Radermacher, M., 1993. Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Cell Biol.* v. 122 p. 1–19.
- Arlucea, J., Andrade, R., Alonso, R., and Arechaga, J., 1998. The nuclear basket of the nuclear pore complex is part of a higher-order filamentous network that is related to chromatin. *J. Struct. Biol.* v. 124 p. 51–58.
- Beck, M., Förster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., and Medalia, O., 2004. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* v. 306 p. 1387–1390.
- Fahrenkrog, B., Hurt, E. C., Aebi, U., and Panté, N., 1998. Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex: localization of Nsp1p subcomplexes. *J. Cell Biol.* v. 143 p. 577–588.
- Goldberg, M. W., and Allen, T. D., 1993. The nuclear pore complex: three-dimensional surface structure revealed by field emission, in-lens scanning electron microscopy, with underlying structure uncovered by proteolysis. *J. Cell Sci.* v. 106 p. 261–274.
- Goldberg, M. W., and Allen, T. D., 1996. The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy. *J. Mol. Biol.* v. 257 p. 848–865.
- Hinshaw, J. E., Carragher, B. O., and Milligan, R. A., 1992. Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* v. 69 p. 1133–1141.
- Jarnik, M., and Aebi, U., 1991. Toward a more complete 3-D structure of the nuclear pore complex. *J. Struct. Biol.* v. 107 p. 291–308.
- Rout, M. P., and Blobel, G., 1993. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* v. 123 p. 771–783.
- Yang, Q., Rout, M. P., and Akey, C. W., 1998. Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell* v. 1 p. 223–234.

5.10 Ядерные поровые комплексы состоят из нуклеопоринов

Обзор

- Conti, E. and Izaurralde, E., 2001. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 13 p. 310–319.
- Doye, V., and Hurt, E. C., 1995. Genetic approaches to nuclear pore structure and function. *Trends Genet.* v. 11 p. 235–241.

Panté, N., 2004. Nuclear pore complex structure: unplugged and dynamic pores. *Dev. Cell* v. 7 p. 780–781.

Rout, M. P., and Aitchison, J. D., 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 16593–16596.

Suntharalingam, M., and Wenthe, S. R., 2003. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev. Cell* v. 4 p. 775–789.

Исследование

Amberg, D. C., Goldstein, A. L., and Cole, C. N., 1992. Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *S. cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev.* v. 6 p. 1173–1189.

Fahrenkrog, B., Aris, J. P., Hurt, E. C., Panté, N., and Aebi, U., 2000. Comparative spatial localization of protein-A-tagged and authentic yeast nuclear pore complex proteins by immunogold electron microscopy. *J. Struct. Biol.* v. 129 p. 295–305.

Kadowaki, T., Zhao, Y., and Tartakoff, A. M., 1992. A conditional yeast mutant deficient in mRNA transport from nucleus to cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 89 p. 2312–2316.

Miller, B. R., and Forbes, D. J., 2000. Purification of the vertebrate nuclear pore complex by biochemical criteria. *Traffic* v. 1 p. 941–951.

Rabut, G., Doye, V., and Ellenberg, J., 2004. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat. Cell Biol.* v. 6 p. 1114–1121.

Rout, M. P., and Blobel, G., 1993. Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* v. 123 p. 771–783.

Strawn, L. A., Shen, T., Shulga, N., Goldfarb, D. S., and Wenthe, S. R., 2004. Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. *Nat. Cell Biol.* v. 6 p. 197–206.

Yang, Q., Rout, M. P., and Akey, C. W., 1998. Three-dimensional architecture of the isolated yeast nuclear pore complex: functional and evolutionary implications. *Mol. Cell* v. 1 p. 223–234.

5.11 Белки избирательно транспортируются в ядро через ядерные поры

Исследование

Dingwall, C., Sharnick, S. V., and Laskey, R. A., 1982. A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* v. 30 p. 449–458.

Feldherr, C. M., Kallenbach, E., and Schultz, N., 1984. Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.* v. 99 p. 2216–2222.

5.12 Сигнал ядерной локализации направляет белки в ядро

Исследование

Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E., 1984. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* v. 39 p. 499–509.

5.13 В импорте белков в ядро участвуют цитоплазматические рецепторы NLS

Обзор

Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T., and Adam, S. A., 2004. Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* v. 14 p. 505–514.

Harel, A., and Forbes, D. J., 2004. Importin beta: conducting a much larger cellular symphony. *Mol. Cell* v. 16 p. 319–330.

Mosammaparast, N., and Pemberton, L. F., 2004. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* v. 14 p. 547–556.

Исследование

Adam, S. A., Marr, R. S., and Gerace, L., 1990. Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.* v. 111 p. 807–816.

Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G., and Kuriyan, J., 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* v. 94 p. 193–204.

Goldfarb, D. S., Gariapy, J., Schoolnik, G., and Kornberg, R. D., 1986. Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* v. 322 p. 641–644.

Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A., and Hartmann, E., 1994. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* v. 79 p. 767–778.

Gorlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E., and Laskey, R. A., 1995. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* v. 377 p. 246–248.

Moore, M. S. and Blobel, G., 1992. The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* v. 69 p. 939–950.

Vodicka, M. A., Koepp, D. M., Silver, P. A., and Emerman, M., 1998. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev.* v. 12 p. 175–185.

5.14 Экспорт белков из ядра также происходит с участием рецепторов

Обзор

Ullman, K. S., Powers, M. A., and Forbes, D. J., 1997. Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* v. 90 p. 967–970.

Исследование

Fritz, C. C., and Green, M. R., 1996. HIV Rev uses a conserved cellular protein export pathway for the nucleocytoplasmic transport of viral RNAs. *Curr. Biol.* v. 6 p. 848–854.

Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., and Weis, K., 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* v. 90 p. 1041–1050.

Wolff, B., Sanglier, J. J., and Wang, Y., 1997. Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.* v. 4 p. 139–147.

5.15 Направление ядерного транспорта контролируется Ran-ГТФазой

Обзор

Bayliss, R., Corbett, A. H., and Stewart, M., 2000. The molecular mechanism of transport of macromolecules through nuclear pore complexes. *Traffic* v. 1 p. 448–456.

Dasso, M., 2002. The Ran GTPase: theme and variations. *Curr. Biol.* v. 12 p. R502–R508.

Исследование

Kalab, P., Weis, K., and Heald, R., 2002. Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science* v. 295 p. 2452–2456.

- 5.16 Для описания механизма ядерного транспорта предложено несколько моделей**
- Обзор**
- Becskei, A., and Mattaj, I. W., 2005. Quantitative models of nuclear transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 17 p. 27–34.
- Rout, M. P., and Aitchison, J. D., 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* v. 276 p. 16593–16596.
- Исследование**
- Ben-Efraim, I., and Gerace, L., 2001. Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J. Cell Biol.* v. 152 p. 411–417.
- Ribbeck, K., and Gorlich, D., 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* v. 20 p. 1320–1330.
- Yang, W., Gelles, J., and Musser, S. M., 2004. Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 101 p. 12887–12892.
- 5.17 Ядерный транспорт может регулироваться**
- Обзор**
- Hood, J. K., and Silver, P. A., 2000. Diverse nuclear transport pathways regulate cell proliferation and oncogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1471 p. M31–M41.
- Kaffman, A., and O'Shea, E. K., 1999. Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 15 p. 291–339.
- Poon, I. K., and Jans, D. A., 2005. Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* v. 6 p. 173–186.
- 5.18 Из ядра экспортируется много типов РНК**
- Исследование**
- Dworetzky, S. I., and Feldherr, C. M., 1988. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J. Cell Biol.* v. 106 p. 575–584.
- Hamm, J., Dathan, N. A., and Mattaj, I. W., 1989. Functional analysis of mutant *Xenopus* U2 мРНКs. *Cell* v. 59 p. 159–169.
- Hamm, J., and Mattaj, I. W., 1990. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* v. 63 p. 109–118.
- Jarmolowski, A., Boelens, W. C., Izaurralde, E., and Mattaj, I. W., 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* v. 124 p. 627–635.
- 5.19 Субъединицы рибосом собираются в ядрышке и экспортируются с участием экспортина 1**
- Обзор**
- Johnson, A. W., Lund, E., and Dahlberg, J., 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* v. 27 p. 580–585.
- Исследование**
- Bataille, N., Helser, T., and Fried, H. M., 1990. Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: a generalized, facilitated process. *J. Cell Biol.* v. 111 p. 1571–1582.
- Ho, J. H., Kallstrom, G., and Johnson, A. W., 2000. Nmd3p is a Crmlp-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J. Cell Biol.* v. 151 p. 1057–1066.
- Moy, T. I., and Silver, P. A., 1999. Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev.* v. 13 p. 2118–2133.
- Oeffinger, M., Dlakic, M., and Tollervy, D., 2004. A pre-ribosome-associated HEAT-repeat protein is required for export of both ribosomal subunits. *Genes Dev.* v. 18 p. 196–209.
- 5.20 тРНК экспортируются с участием специального экспортина**
- Исследование**
- Arts, G. J., Fornerod, M., and Mattaj, I. W., 1998. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.* v. 8 p. 305–314.
- Jarmolowski, A., Boelens, W. C., Izaurralde, E., and Mattaj, I. W., 1994. Nuclear export of different classes of RNA is mediated by specific factors. *J. Cell Biol.* v. 124 p. 627–635.
- Lund, E., and Dahlberg, J. E., 1998. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* v. 282 p. 2082–2085.
- Shaheen, H. H., and Hopper, A. K., 2005. Retrograde movement of tRNAs from the cytoplasm to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 102 p. 11290–11295.
- Takano, A., Endo, T., and Yoshihisa, T., 2005. tRNA actively shuttles between the nucleus and cytosol in yeast. *Science* v. 309 p. 140–142.
- 5.21 иРНК экспортируются из ядра в виде РНК-белковых комплексов**
- Обзор**
- Aguilera, A., 2005. mRNA processing and genomic instability. *Nat. Struct. Mol. Biol.* v. 12 p. 737–738.
- Daneholt, B., 1997. A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* v. 88 p. 585–588.
- Daneholt, B., 1999. Pre-mRNP particles: From gene to nuclear pore. *Curr. Biol.* v. 9 p. R412–R415.
- Fukumori, T., Kagawa, S., Iida, S., Oshima, Y., Akari, H., Koyama, A. H., and Adachi, A., 1999. Rev-dependent expression of three species of HIV-1 mRNAs. *Int. J. Mol. Med.* v. 3 p. 297–302.
- Nakielný, S., and Dreyfuss, G., 1999. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* v. 99 p. 677–690.
- Pollard, V. W., and Malim, M. H., 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* v. 52 p. 491–532.
- Saguez, C., Olesen, J. R., and Jensen, T. H., 2005. Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 17 p. 287–293.
- Исследование**
- Choi, Y. D., and Dreyfuss, G., 1984. Isolation of the heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (гЯРНТ): a unique supramolecular assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 81 p. 7471–7475.
- Mehlin, H., Daneholt, B., and Skoglund, U., 1992. Translocation of a specific premessenger ribonucleoprotein particle through the nuclear pore studied with electron microscope tomography. *Cell* v. 69 p. 605–613.
- Pinol-Roma, S., Choi, Y. D., Matunis, M. J., and Dreyfuss, G., 1988. Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA binding proteins. *Genes Dev.* v. 2 p. 215–227.
- Saavedra, C., Tung, K.-S., Amberg, D. C., Hopper, A. K., and Cole, C. N., 1996. Regulation of mRNA export in response to stress in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* v. 10 p. 1608–1620.
- Visa, N., Izaurralde, E., Ferreira, J., Daneholt, B., and Mattaj, I. W., 1996. A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *J. Cell Biol.* v. 133 p. 5–14.

5.22 **гяРНП транспортируются от мест процессинга к ЯПК**

Исследование

- Politz, J. C., Tuft, R. A., Pederson, T., and Singer, R. H., 1999. Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr. Biol.* v. 9 p. 285–291.
- Zachar, Z., Kramer, J., Mims, I. P., and Bingham, P. M., 1993. Evidence for channeled diffusion of pre-mRNAs during nuclear RNA transport in metazoans. *J. Cell Biol.* v. 121 p. 729–742.

5.23 **Экспорт иРНК требует участия нескольких новых факторов**

Обзор

- Cullen, B. R., 2003. Nuclear RNA export. *J. Cell Sci.* v. 116 p. 587–597.
- de la Cruz, J., Kressler, D., and Linder, P., 1999. Unwinding RNA in *S. cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* v. 24 p. 192–198.
- Jensen, T. H., Dower, K., Libri, D., and Rosbash, M., 2003. Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Mol. Cell* v. 11 p. 1129–1138.

Исследование

- Braun, I. C., Rohrbach, E., Schmitt, C., and Izaurralde, E., 1999. TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *EMBO J.* v. 18 p. 1953–1965.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T. H., 2001. Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* v. 413 p. 538–542.
- Hodge, C. A., Colot, H. V., Stafford, P., and Cole, C. N., 1999. Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *EMBO J.* v. 18 p. 5778–5788.
- Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S., and Pyle, A. M., 2000. The DExH protein NPH-II is a processive and directional motor for unwinding RNA. *Nature* v. 403 p. 447–451.
- Jankowsky, E., Gross, C. H., Shuman, S., and Pyle, A. M., 2001. Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science* v. 291 p. 121–125.

Kang, Y., and Cullen, B. R., 1999. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev.* v. 13 p. 1126–1139.

- Lei, E. P. and Silver, P. A., 2002. Intron status and 3'-end formation control cotranscriptional export of mRNA. *Genes Dev.* v. 16 p. 2761–2766.
- Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M., and Jensen, T. H., 2002. Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. *Mol. Cell Biol.* v. 22 p. 8254–8266.
- Strässer, K. et al., 2002. TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature* v. 417 p. 304–308.
- Tseng, S. S., Weaver, P. L., Liu, Y., Hitomi, M., Tartakoff, A. M., and Chang, T. H., 1998. Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)+ RNA export. *EMBO J.* v. 17 p. 2651–2662.

5.24 **ИмЯРНК экспортируются, модифицируются, собираются в комплексы и импортируются**

Исследование

- Hamm, J., and Mattaj, I. W., 1990. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* v. 63 p. 109–118.
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M., and Luhrmann, R., 1998. Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.* v. 17 p. 4114–4126.
- Palacios, I., Hetzer, M., Adam, S. A., and Mattaj, I. W., 1997. Nuclear import of U мяРНПs requires importin beta. *EMBO J.* v. 16 p. 6783–6792.

5.25 **Предшественники микроРНК экспортируются из ядра и подвергаются процессингу в цитоплазме**

Обзор

- Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* v. 431 p. 350–355.
- Kim, V. N., 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 6 p. 376–385.
- Zamore, P. D., and Haley, B., 2005. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* v. 309 p. 1519–1524.

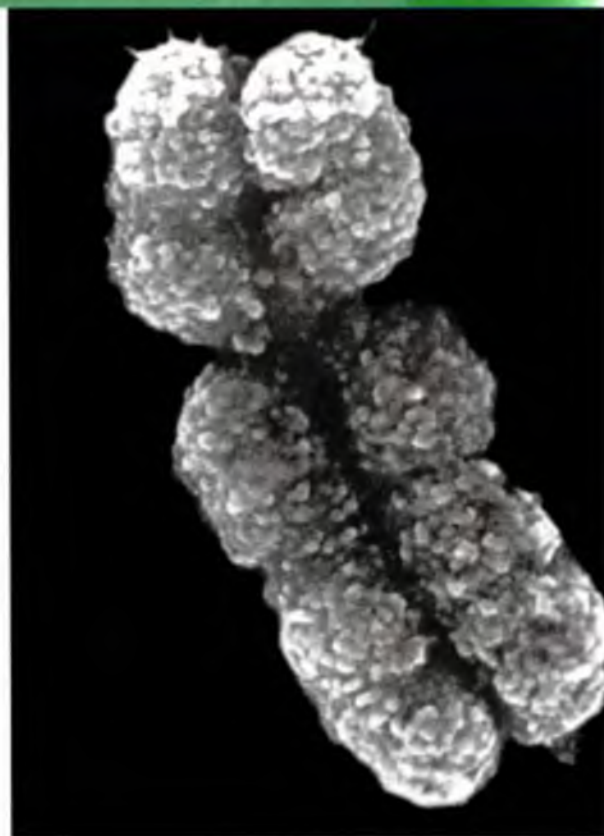
Хроматин и хромосомы

Бенджамин Льюин

Издатель/Редактор Cell Press и Virtual Text

Автор монографии «Гены»

Хромосома человека. Фотография любезно предоставлена Дэниелем Л. Хартлом, Гарвардский университет



КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛАВЫ

- 6.1** Введение
 - 6.2** Хроматин подразделяется на эухроматин и гетерохроматин
 - 6.3** Хромосомы обладают характерной полосатостью
 - 6.4** В молекуле ДНК эукариот существуют петли и домены, посредством которых она прикрепляется к опорным структурам
 - 6.5** ДНК присоединяется к интерфазному матриксу посредством специфических последовательностей
 - 6.6** Существенную роль в сегрегации хромосом играет центромера
 - 6.7** Центромеры хромосом *S.cerevisiae* содержат короткие последовательности ДНК
 - 6.8** Центромера связывает белковый комплекс
 - 6.9** В области центромеры могут содержаться повторяющиеся последовательности ДНК
 - 6.10** Теломеры реплицируются по особому механизму
 - 6.11** Теломеры замыкают концы хромосом
 - 6.12** Хромосомы типа ламповых щеток деспирализованы
 - 6.13** Политенные хромосомы образуют полосы-диски
 - 6.14** Политенные хромосомы образуют вздутия в местах экспрессии генов
 - 6.15** Основной структурной единицей хроматина является нуклеосома
 - 6.16** ДНК обматывает множество нуклеосом
 - 6.17** Нуклеосомы обладают одинаковой структурой
 - 6.18** Различная структура ДНК на поверхности нуклеосом
 - 6.19** Организация октамера гистонов
 - 6.20** Организация нуклеосом в фибрилле хроматина
 - 6.21** Репродукция хроматина требует сборки нуклеосом
 - 6.22** Занимают ли нуклеосомы определенные места на ДНК?
 - 6.23** Домены определяют области, содержащие активные гены
 - 6.24** Организованы ли транскрибирующиеся гены в нуклеосомы?
 - 6.25** При транскрипции октамеры гистонов удаляются
 - 6.26** Удаление нуклеосом и их последующая сборка требуют участия специфических факторов
 - 6.27** Сайты с повышенной чувствительностью к ДНКазе меняют структуру хроматина
 - 6.28** Ремоделирование хроматина представляет собой активный процесс
 - 6.29** Ацетилирование гистонов связано с генетической активностью
 - 6.30** Гетерохроматин формируется за счет распространения события нуклеации
 - 6.31** Образование гетерохроматина зависит от взаимодействия белков с гистонами
 - 6.32** X-хромосомы подвергаются глубоким изменениям
 - 6.33** Конденсация хромосом происходит под действием конденсинов
 - 6.34** Что дальше?
 - 6.35** Резюме
- Список литературы

Весь генетический материал клетки находится в упакованном виде в относительно ограниченном объеме. У бактерий генетический материал находится в виде **нуклеоида**, который образует в клетке дискретную массу. В интерфазном ядре эукариотической клетки генетический материал упакован в массу **хроматина**. Упаковка хроматина характеризуется гибкостью и на протяжении клеточного цикла меняется. Во время деления (митоза или мейоза), когда становятся видимыми отдельные **хромосомы**, интерфазный хроматин становится упакованным более плотно.

Хромосомы представляют собой форму изоляции генетического материала при клеточном делении. Характерной структурной особенностью, благодаря которой это достигается, является **центромера**, представляющая собой перетяжку на теле хромосомы, видимую в световом микроскопе. При достаточно высоком разрешении видно, что центромера включает **кинетохор**, структуру, посредством которой она прикрепляется к микротрубочкам. Обычно эукариотические хромосомы состоят из очень длинных линейных молекул ДНК, и еще одной их характерной особенностью является наличие **теломеры**, которая стабилизирует концы хромосом и достраивается по специальному механизму, в обход трудности репликации концов линейной ДНК.

ДНК упакована с высокой плотностью. Для нуклеоида бактерий она составляет около 10 мг/мл, для ядра клетки эукариот порядка 100 мг/мл, а для головки фага Т4 более 500 мг/мл. Растворы такой концентрации представляют собой вязкий гель, и по непонятной причине столь высокая концентрация необходима для проявления белками способности находить сайты связывания на ДНК. Различные процессы, протекающие с участием ДНК, например репликация и транскрипция, должны осуществляться в очень ограниченном пространстве. Организация ядерного материала должна соответствовать переходам от неактивного к активному состоянию хроматина. Рис. 6.1 иллюстрирует сильные различия в размере генома и в содержании ДНК хромосом некоторых организмов.

Длина линейной молекулы ДНК существенно превышает размер того региона, в котором она находится. Плотная упаковка структуры образуется в результате связывания ДНК с основными белками. Положительно заряженные группы белков нейтрализуют отрицательно заряженные группы в ДНК. Организация нуклеопротеидного комплекса определяется взаимодействием белков с ДНК, в результате чего образуется плотно спирализованная структура. Таким образом, в отличие от распространенной картинки, на которой ДНК представлена в виде протяженной двойной спирали, она, как правило, подвержена структурным деформациям сгиба или скручивания, обеспечивающим образование более компактной структуры.

Большая часть хроматина обладает довольно рыхлой структурой; он называется **эухроматин** и содержит активные гены. Отдельные участки хроматина упакованы более плотно; они соответствуют генетически неактивному **гетерохроматину**.

Какова общая структура хроматина и какие существуют различия между активными и неактивными последовательностями? Высокая плотность упаковки генетического материала позволяет предполагать, что ДНК не может быть прямо упакована в конечную структуру хроматина. Должна существовать определенная *иерархия* ее пространственной организации. Основной вопрос заключается в *специфичности* упаковки. Следует ли скручивание ДНК *определенному* общему принципу или же происходит по разному в каждой индивидуальной копии генома? Каким образом меняется вид упаковки при репликации или транскрипции сегмента ДНК?

Основная структурная единица хроматина во всех эукариотических клетках одна и та же. Нуклеосома содержит примерно 200 пн ДНК и является октамером, состоящим из небольших основных белков, имеющим форму бусины. Эти белки представляют собой гистоны. Они образуют внутреннее ядро частицы, а ДНК находится на ее поверхности. В интерфазном ядре и в митотических хромосомах нуклеосомы являются постоянным компонентом эу- и гетерохроматина. Нуклеосомы обеспечивают начальный уровень организации хроматина. Они обеспечивают упаковку молекулы ДНК для

Размеры хромосом существенно варьируют				
Организм	Геном (мбаз)	Гаплоидные хромосомы	Длина хромосом (мбаз ДНК)	Общее число генов
<i>E. coli</i>	4,6	1	4,6	4,401
<i>S. cerevisiae</i>	12,1	16	(0,2)–1,5	6,702
<i>D. melanogaster</i>	165	4	(1,3)–28	14,399
Рис	389	12	24–45	37,544
Мышь	2 500	20	60–195	26,996
Человек	2 900	23	49–245	24,194

Рис. 6.1. Количество хромосом в гаплоидном геноме и их размеры существенно варьируют

ной 67 нм в структуру, диаметром 11 нм. Компоненты нуклеосом и их строение хорошо изучены. Последовательность нуклеосом, расположенная линейно образует «10-нм нуклеосомную нить».

Следующий уровень организации представляет собой скручивание последовательности нуклеосом в спиральные витки. При этом создается фибрилла диаметром около 30 нм; она присутствует в интерфазном хроматине и в митотических хромосомах (рис. 6.2). В результате плотность упаковки увеличивается в 6–7 раз на ед. длины. Упаковка в такую структуру требует участия дополнительных белков и исследована недостаточно.

Окончательная плотность достигается на третьем уровне организации, включающем упаковку самой 30-нм фибриллы. Этот уровень приводит к 50-кратному увеличению плотности упаковки в эухроматине по сравнению с упаковкой в 30-нм фибрилле. Эухроматин периодически упаковывается в митотические хромосомы, при этом плотность упаковки возрастает в 5–10 раз. Обычно плотность упаковки гетерохроматина такая же, как в митотических хромосомах.

В хроматине содержится примерно в два раза больше белка, чем ДНК. Примерно половина всего количества белка сосредоточена в нуклеосомах. Количество РНК составляет менее 10% от содержания ДНК. Большая часть РНК представлена вновь образованными транскриптами, еще связанными с матричной ДНК.

Изменения структуры хроматина обеспечиваются связыванием дополнительных или модификациями существующих белков. Репликация и транскрипция требуют раскручивания ДНК, и, таким образом, должны включать разупаковку структуры, которая позволяет соответствующим ферментам работать на ДНК. Вероятно, это сопровождается изменениями на всех уровнях организации.

Все белки хроматина, за исключением гистонов, относятся к **негистоновым** белкам. По сравнению с гистонами, в разных тканях и организмах эти белки характеризуются более разнообразным составом, и в хроматине их содержится меньше, чем гистонов. Они также составляют более многочисленную группу, так что любой индивидуальный негистоновый белок присутствует в количествах гораздо меньших, чем любой гистон.

Каждая хромосома содержит очень длинную двойную цепь ДНК, которая скручена в фибриллу, расположенную по всей хромосоме. Таким образом, при разрабатке модели структуры интерфазного хроматина и митотических хромосом, мы должны предусмотреть упаковку одной, крайне длинной молекулы ДНК в форму, которая позволяет транскрипцию и репликацию, и периодически может менять степень своей упаковки.

В клетках эукариот индивидуальные хромосомы заметны только в момент деления, когда отчетливо видна каждая из них. На рис. 6.2 представлена фотография пары сестринских хроматид в метафазе, полученная в электронном микроскопе. (Сестринские хроматиды представляют собой дочерние хромосомы, образовавшиеся при репликации, но на этой стадии митоза еще остающиеся связанными друг с другом.) Каждая хроматида состоит из фибриллы мозаичного вида диаметром около 30 нм. Плотность упаковки ДНК в хромосоме в 5–10 раз превышает плотность ее упаковки в интерфазном хроматине.



РИС. 6.2. Пара сестринских хроматид в митозе, каждая из которых содержит фибриллу (диаметром 30 нм), компактно упакованную в хромосому. Фотография любезно предоставлена Дэниел Л. Хартль, Гарвардский университет

6.2 Хроматин подразделяется на эухроматин и гетерохроматин

Основные положения

- Индивидуальные хромосомы могут быть видны только в митозе
- В интерфазе основная масса хроматина находится в форме эухроматина, который по сравнению с митотическими хромосомами упакован менее плотно
- В интерфазе гетерохроматиновые области остаются плотно упакованными

Однако в течение большей части цикла эукариотической клетки, ее генетический материал занимает в ядре пространство, в котором нельзя различить отдельные хромосомы. 30-нм фибрилла, составляющая основу хроматина, организована так же, как митотическая хромосома, или близка к ней по структуре.

Хроматин обладает двумя типами структуры, каждую из которых можно наблюдать на ядерных препаратах (рис. 6.3):

- В большинстве областей фибриллы упакованы гораздо менее плотно, чем в митотических хромосомах. Эти области содержат эухроматин. Он отличается относительно менее плотной упаковкой и занимает большую часть ядра (рис. 6.3).
- Некоторые области, содержащие хроматин, очень плотно упакованы фибриллами, что напоминает упаковку митотических хромосом. Эти области содержат гетерохроматин. Обычно гетерохроматин локализуется в области центромеры, но также может располагаться и в других местах. На протяжении клеточного цикла степень конденсации гетерохроматина практически не изменяется. В ядре гетерохроматин расположен в виде отдельных скоплений (рис. 6.3), но чаще его области агрегируют, образуя интенсивно прокрашивающийся **хромосомный центр**. (Этот термин применяется к областям ядра, которые всегда содержат гетерохроматин, называемый конститутивным гетерохроматином. Наряду с этим, существует другой вид гетерохроматина, который называется факультативный гетерохроматин. Для него характерна возможность перехода в эухроматиновое состояние.)

Одна и та же фибрилла находится в области эу- и гетерохроматина. Это позволяет предполагать, что два вида хроматина отражают различную степень конденсации генетического материала. Точно так же различной степенью конденсации характеризуются области

эухроматина в интерфазе и митозе. Таким образом, генетический материал организован таким образом, чтобы обеспечить одновременное существование в хроматине альтернативных состояний и циклических изменений его упаковки между интерфазой и делением. Далее мы обсудим молекулярные основы такой организации.

Структурное состояние генетического материала коррелирует с его функциональной активностью. Конститутивный гетерохроматин характеризуется следующими особенностями:

- Он постоянно находится в конденсированном состоянии.
- В нем часто присутствуют многократные повторы небольших нетранскрибируемых участков ДНК.
- В гетерохроматиновой области плотность генов гораздо ниже, чем в эухроматине, и гены, которые транслоцируются в эту или расположенную поблизости область, часто инактивируются.
- По-видимому, из-за своей плотной упаковки гетерохроматин реплицируется позже, чем эухроматин, и отличается низкой частотой генетических рекомбинаций.

Известны некоторые молекулярные маркеры, позволяющие констатировать изменения свойств ДНК и белковых компонентов хроматина (см. 6.31 *Образование гетерохроматина зависит от взаимодействия белков с гистонами*). К числу их относится снижение степени ацетилирования гистонов, усиление метилирования одного из этих белков, и гиперметилирование цитозиновых остатков в ДНК (см. рис. 6.72). Эти молекулярные изменения приводят к конденсации хроматина, которая является причиной отсутствия у него метаболической активности.

Хотя в эухроматине находятся активные гены, в каждый данный момент времени транскрибируется лишь небольшое количество последовательностей ДНК. Таким образом, локализация гена в эухроматине является необходимым, но недостаточным условием для его экспрессии.



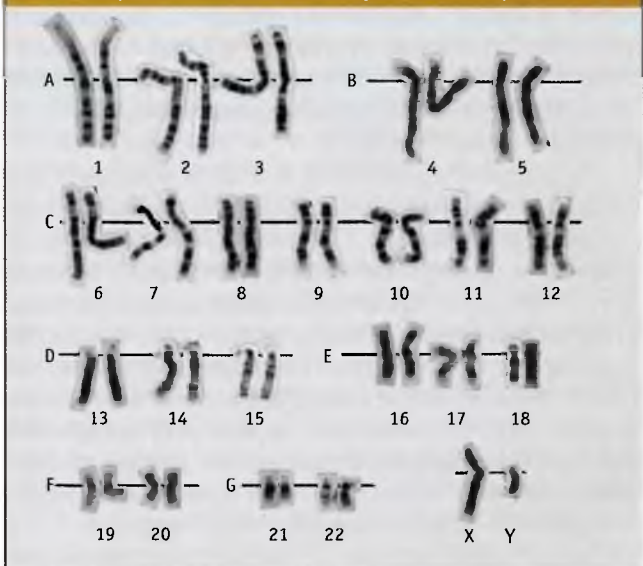
Срез клетки в области клеточного ядра, окрашенный по Фельгену. Видны области компактного гетерохроматина, расположенные преимущественно в области ядрышек и ядерной оболочки. Фотография любезно предоставлена Эдмон Пьювон, Национальный центр научных исследований

6.3 Хромосомы обладают характерной полосатостью

Основные положения

- При использовании некоторых приемов окрашивания на хромосомах можно наблюдать серию полос, которые называются G-полосы
- По сравнению с промежутками, интенсивно окрашенные полосы характеризуются низким содержанием ГЦ-пар
- Гены преимущественно локализованы в промежутках, богатых ГЦ-парами

Из-за диффузного характера состояния хроматина мы не можем прямо оценить специфику его организации. Однако мы можем задаться вопросом, является ли упорядоченной структура (митотической) хромосомы? Всегда ли конкретные последовательности ДНК нахо-



G-полосы образуют характерную поперечную исчерченность каждой хромосомы. Фотография любезно предоставлена Лизой Шеффер, Университет штата Вашингтон, Спокан

дятся на соответствующих местах или сворачивание фибриллы в определенную структуру происходит в значительной степени случайно?

Каждый компонент хромосомы имеет свою воспроизводимую ультраструктуру. После определенной обработки хромосом и последующем окрашивании красителем Гимза, на них обнаруживается серия **G-полос**. На в качестве примера представлен хромосомный набор человека.

До разработки техники специального окрашивания хромосомы можно было отличить только по размерам и по относительному расположению центromеры. Наличие G-полос дает возможность идентифицировать каждую хромосому по их характерному расположению. Благодаря этому оказалось возможным идентифицировать транслокации между хромосомами, сравнивая их с исходным диплоидным набором. На рис. 6.5 схематически представлено распределение полос на X-хромосоме человека. Полосы представляют собой большие участки ДНК (около 10^7 пн), включающие многие сотни генов.

Техника обнаружения полосатости хромосом получила широкое распространение в практических целях, однако остается неизвестным, чем вызывается наблюдаемый характер окрашивания. Твердо установлено, что без предварительной обработки хромосом они прокрашиваются более или менее равномерно. Таким образом, образование полос зависит от характера предварительной обработки, при которой изменяется окрашиваемость хромосомы (по-видимому, при предварительной обработке из неокрашиваемых областей удаляются компоненты, которые связывают краску). Однако при разной предварительной обработке хромосом можно получить одинаковое распределение полос.

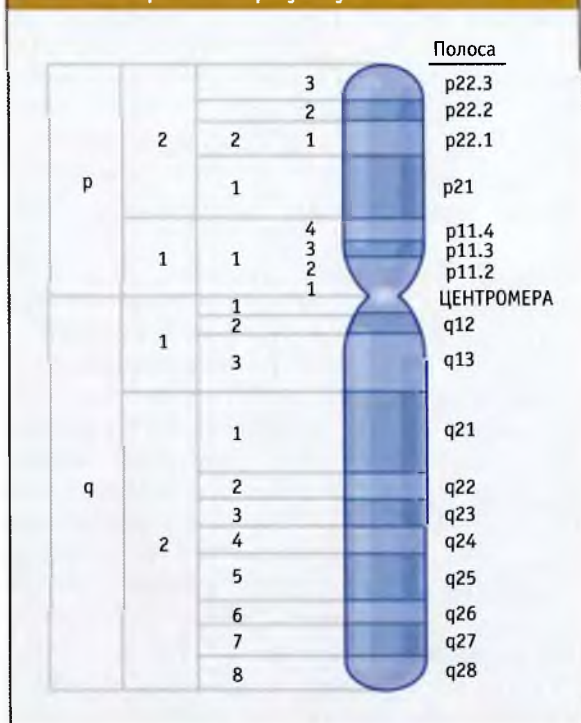


РИС. 6.5. Полосы на X-хромосоме человека соответствуют отдельным областям. Короткое плечо обозначается *p*, а длинное плечо — *q*; каждое плечо подразделяется на большие области, а последние на более мелкие. Эта карта хромосомы показывает ее структуру при низком разрешении; при более высоком разрешении некоторые полосы подразделяются дальше, на более мелкие полосы и промежутки; например *p21*, подразделяется на *p21.1*, *p21.2*, и *p21.3*



РИС. 6.6. На протяжении коротких участков ДНК существуют значительные вариации в содержании ГЦ-элементов. Каждый столбик представляет собой представленность в ДНК фрагментов длиной 20 пн, (в %) с определенным содержанием ГЦ-элементов

Единственное различие между областями полос и промежутков состоит в том, что по сравнению с промежутками области полос характеризуются меньшим содержанием ГЦ-пар. Если большая хромосома, размером порядка 100 Мпн, содержит около 10 полос, то это означает, что она разделена на регионы, примерно 5 Мпн каждый, с низким (полоса) и высоким (промежуток) содержанием ГЦ-пар. Методом гибридизации с иРНК установлено, что гены преимущественно локализованы в промежутках. Все эти данные указывают на существование организации хромосом, которая зависит от первичной структуры ДНК и носит дистантный характер.

Результаты, полученные при секвенировании генома человека, подтверждают основные наблюдения. РИС. 6.6 иллюстрирует, что при делении генома на небольшие доли отмечаются отчетливые флуктуации содержания ГЦ-пар. В среднем, геном типичной клетки млекопитающих содержит 41% ГЦ-пар. Существуют области с минимальным (30%) и максимальным (65%) их содержанием. Если исследовать более крупные фрагменты, то наблюдаются меньшие вариации. Средняя величина фрагментов, содержащих более, чем 43% ГЦ-пар, составляет 200–250 тпн. Это позволяет сделать вывод, что структура типа полоса/промежуток не представлена однородными участками с различным содержанием ГЦ-пар, хотя полосы действительно содержат больше фрагментов с низким их содержанием. Гены преимущественно локализованы в областях с высоким содержанием ГЦ-пар. Пока остается неизвестным, какое отношение этот показатель имеет к структуре хромосом.

6.4 В молекуле ДНК эукариот существуют петли и домены, посредством которых она прикрепляется к опорным структурам

Основные положения

- В интерфазном хроматине ДНК отрицательно суперспирализована и образует независимые домены размерами около 85 тпн
- Метафазные хромосомы обладают опорной белковой структурой, к которой присоединены петли суперспирализованной ДНК

Характерная полосатость структуры каждой хромосомы вызвана скручиванием дезоксирибонуклеопротеидной фибриллы. При участии белкового матрикса фибрилла образует петлеобразные структуры. Нуклеоид бактерий также организован в форме петель, однако молекулярные основы этой организации носят иной характер. Это обнаруживается при исследовании свойств хромосомного материала, который высвобождается при мягком лизисе клеток бактерий и эукариот.

При лизисе клеток *E. coli* происходит высвобождение фибрилл, имеющих форму петель, связанных с

фрагментами клеточной оболочки. Как можно видеть из РИС. 6.7, ДНК в этих петлях находится не в виде протяженных двунитевых структур, а связана с белками в компактные образования. Нуклеоид может быть выделен в виде быстроседиментирующего комплекса, по весу содержащего около 80% ДНК.

Характерная особенность ДНК изолированного нуклеоида бактерий состоит в том, что она проявляет свойства замкнутого дуплекса. Об этом свидетельствует ее отношение к бромистому этидию. Небольшие молекулы этого красителя интеркалируют между парами оснований и генерируют положительные супервитки в «замкнутых» циркулярных (кольцевых. — Прим. ред. пер.) молекулах ДНК. В такой молекуле не нарушена целостность обеих цепочек ДНК. (В «открытой» циркулярной (кольцевой) молекуле, содержащей разрыв в одной из цепочек, или в случае линейных молекул ДНК при интеркаляции вращается свободно, тем самым снимая напряжение.)

В процессе выделения в компактной структуре нуклеоида могут возникать разрывы; также они образуются при его ограниченной обработке ДНКазой. Однако это не влияет на способность бромистого этидия генерировать в ДНК положительные супервитки. Способность генома реагировать с бромистым этидием при наличии разры-



РИС. 6.7. При лизисе клеток *E. coli* нуклеоид выделяется в виде собранных в петли фибрилл. Фотография любезно предоставлена Джеком Гриффитом, Университет Северной Каролины, Чэпел Хилл

вов в ДНК, свидетельствует о существовании множества независимых хромосомных доменов; *степень суперспирализации в каждом домене не зависит от состояния суперспиралей в соседних доменах*. Каждый домен состоит из цепи ДНК, концы которой каким-то (неизвестным) образом фиксированы, что не позволяет вращательному усилию распространяться на другие домены.

В клетке, где ковалентно-замкнутая ДНК суперспирализована отрицательно, при интеркаляции бромистого этидия вначале удаляются отрицательные супервитки, а затем образуются положительные. Количество интеркалятора, необходимое для полной релаксации супервитков, зависит от исходной плотности отрицательных супервитков. Раньше считалось, что каждый домен содержит примерно 40 тпн ДНК, однако, согласно последним данным, размер каждого домена может быть меньше и составляет около 10 тпн. Это означает, что в геноме *E. coli* содержится порядка 400 доменов. По-видимому, концы доменов не фиксируются на определенных сайтах хромосомы, а расположены случайно.

Такие же отдельные домены характерны для хромосом эукариот. При лизисе ядер на поверхности градиента сахарозы геном может быть получен в виде компактной структуры. Так, из ядер клеток *D. melanogaster*,

могут быть выделены структуры, состоящие из плотно упакованных фибрилл (диаметром около 10 нм), содержащих ДНК, которая находится в комплексе с белками.

Плотность суперспирализации, измеренная при титровании бромидом этидия, примерно соответствует одному отрицательному супервитку на 200 пн. При обработке ДНКазой эти супервитки удаляются, однако структура 10-нм фибриллы остается. Это позволяет предполагать, что суперспираль представляет собой форму пространственной организации фибриллы, и образование ее обусловлено возникновением скручивающего усилия.

Для полной релаксации суперспирали требуется один разрыв на 85 тпн, что соответствует средней длине «замкнутой» ДНК. Эта область может представлять собой петлю или домен, аналогичный обнаруженным в геноме бактериям. После экстракции из митотических хромосом большей части белков эти петли становятся видимыми. Они состоят из ДНК, содержащей примерно 8% исходного количества белка. Как следует из рис. 6.8, частично лишенные белка хромосомы выглядят как структуры, содержащие внутри **каркас** и окруженные гало ДНК.

Каркас метафазной хромосомы представляет собой плотную сеть фибрилл. От него, в виде петель средней длины, 10–30 мкм (30–90 тпн), распространяются нити ДНК. Эта ДНК может быть удалена при ферментативной обработке без нарушения целостности каркаса, который содержит набор определенных белков. Таким образом, можно предполагать, что ДНК организована в виде петель размером порядка 60 тпн, которые прикреплены к центральному белковому каркасу.

Внешне каркас напоминает митотическую пару сестринских хроматид. Обычно сестринские каркасы тесно примыкают друг к другу, но иногда располагаются раздельно, соединяясь между собой посредством лишь нескольких фибрилл. Могут ли они представлять собой структуры, ответственные за поддержание формы митотических хромосом? Образуется ли каркас при объединении тех белков, которые обычно фиксируют основания петель в интерфазном хроматине?



РИС. 6.8 Хромосома, лишенная гистонов, состоит из белкового каркаса, к которому присоединены петли ДНК. Фотография любезно предоставлена Ульрихом К. Леммли, Женевский университет, Швейцария

6.5 ДНК присоединяется к интерфазному матриксу посредством специфических последовательностей

Основные положения

- ДНК присоединена к ядерному матриксу посредством специфических последовательностей, которые называются MAR- или SAR-последовательности
- MAR-последовательности обогащены АТ-блоками, но у них отсутствуют специфические консенсусные последовательности

Присоединяется ли ДНК к белковому каркасу посредством специфических последовательностей? Сайты ДНК, присоединенные к белковым структурам в ин-

терфазном ядре, называются **MAR** (matrix attachment regions); иногда их также называют SAR (scaffold attachment regions). К какой структуре интерфазного ядра они присоединяются, неизвестно. Часто хроматин оказывается связанным с ядерным матриксом, и высказывалось много предположений о необходимости такого связывания для протекания транскрипции или репликации. Когда из ядер удаляют большую часть белков, ДНК остается в виде петель, выходящих из оставшейся структуры, содержащей белки. Однако попытки отождествить белки, обнаруженные в этих препаратах, со структурными элементами в интактных клетках оказались безуспешными.

Соединяются ли с этим матриксом определенные области ДНК? На рис. 6.9 представлены схемы экспериментов *in vivo* и *in vitro*, позволяющих ответить на этот вопрос. В обоих случаях вначале выделяют ядерный матрикс в виде препаратов неочищенных ядер, содержащих хроматин и ядерные белки. Затем, используя различные методические подходы характеризуют ДНК матрикса или идентифицируют ДНК, способную к нему присоединяться.

Для анализа MAR-последовательностей путем экстракции белков деконденсируют петельные домены хромосом. Предполагается, что после обработки петель ДНК рестриктазами остаются только MAR-последовательности, присоединенные к матриксу *in vivo*.

В качестве дополнительного подхода, из матрикса при обработке ДНКазой удаляют всю ДНК и выделенные

ее фрагменты используют для исследования их способности связываться с матриксом *in vitro*.

In vivo и *in vitro* с матриксом должны связываться одни и те же последовательности. Когда идентифицирован потенциальный MAR, методом делеций устанавливается минимальный размер последовательности необходимый для связывания *in vitro*. После этого можно идентифицировать белки, которые связываются с MAR.

Интересной особенностью MAR является отсутствие участков консервативных последовательностей. Обычно они содержат около 70% АТ-блоков, но не содержат консенсусных последовательностей. Однако часто в областях MAR присутствуют, например, такие функционально важные последовательности, как *цис*-регуляторы транскрипции и сайт узнавания для топоизомеразы II. Не исключено поэтому, что MAR выполняют более чем одну функцию, обеспечивая не только присоединение ДНК к матриксу, но и ее топологические изменения.

Какая взаимосвязь существует между каркасом хромосомы в делящейся клетке и матриксом интерфазной клетки? Идентичные ли последовательности ДНК участвуют в присоединении к этим структурам? В некоторых случаях из метафазных опорных структур можно выделить те же фрагменты ДНК, которые обнаруживаются в ядерном матриксе *in vivo*. В свою очередь фрагменты, содержащие MAR, способны связываться с метафазными белковыми структурами. По-видимому, ДНК содержит общие сайты связывания, которые в интерфазных клетках связываются с ядерным матриксом, а в митотических — с хромосомным скелетом.

Ядерный матрикс и скелет хромосомы состоят из различных белков, хотя и содержат ряд общих компонентов. Топоизомераза II представляет собой типичный компонент скелета хромосом и присутствует также в ядерном матриксе. Это позволяет предполагать, что топологические характеристики ДНК играют существенную роль для обеих структур.

6.6 Существенную роль в сегрегации хромосом играет центромера

Основные положения

- Эукариотическая хромосома удерживается на митотическом веретене за счет присоединения микротрубочек к кинетохору, который образуется в центромерной области
- Обычно центромеры содержат хроматин, обогащенный сателлитными последовательностями ДНК

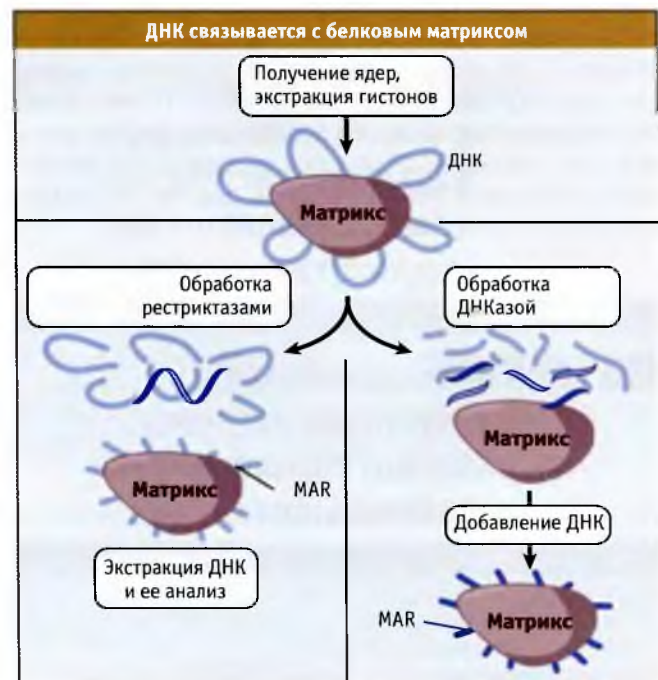


РИС. 6.9. Регионы ДНК, связанные с матриксом, можно идентифицировать, исследуя ДНК, связанную с матриксом *in vivo*, или идентифицируя фрагменты, которые способны связываться с матриксом после удаления из него всей ДНК



Хромосомы мигрируют к полюсам посредством микротрубочек, присоединенных к центромерам. Пособством скрепляющих белков (когезинов) сестринские хроматиды соединяются вместе до наступления анафазы. На рисунке показаны центромеры, находящиеся в центре хромосом (метацентрические), однако они могут быть локализованы в любом месте хромосомы: поблизости от конца (ахроцентрические) или на самом конце (телоцентрические)

хромосомы с полюсами клетки.) Сайты в двух регионах, где организуются концы микротрубочек — поблизости от центриоли на полюсах и на хромосомах, — называются **ЦОМТ** (центры организации микротрубочек).

Рис. 6.10 схематически иллюстрирует процесс разделения сестринских хроматид, происходящий между метафазой и телофазой митоза. Область хромосомы, ответственная за ее сегрегацию в митозе и мейозе, называется центромера. Пособством микротрубочек центромера каждой сестринской хроматиды оттягивается к противоположным полюсам и тянет за собой связанную с ней хромосому. Хромосома обеспечивает механизм присоединения большого количества генов к аппарату деления. Она содержит сайт, который удерживает сестринские хроматиды вместе, до момента сегрегации ин-

дивидуальных хромосом. Он выглядит как перетяжка, к которой присоединены все четыре плеча хромосомы, как это изображено на рис. 6.2, где показаны сестринские хроматиды в стадии метафазы.

Центромера необходима для сегрегации хромосом. Это подтверждается свойствами хромосом, целостность которых была нарушена. В результате разрыва один фрагмент хромосомы сохраняет центромеру, а другой, называемый **ацентрическим**, ее не содержит. Ацентрический фрагмент не способен присоединяться к митотическому веретену, в результате чего он не попадает в ядро дочерней клетки.

Области хромосомы, фланкирующие центромеру, обычно содержат ДНК, богатую сателлитными последовательностями, и значительное количество гетерохроматина. Поскольку вся митотическая хромосома конденсирована, центромерный гетерохроматин в ней незаметен. Однако его можно визуализировать, используя технику прокрашивания, позволяющую выявить **С-полосы**. На рис. 6.11 в области всех центромер присутствует темноокрашенный регион. Такая картина видна наиболее часто, хотя гетерохроматин может и не обнаруживаться в области каждой центромеры. Это позволяет думать, что центромерный гетерохроматин, по-видимому, не является необходимым компонентом механизма деления.

Область образования центромеры в хромосоме определяется первичной структурой ДНК (хотя специфическая последовательность известна лишь для небольшого количества хромосом). ДНК центромеры связывает определенные белки, которые формируют структуру, обеспечивающую присоединение хромосомы к микротрубочкам. Эта структура называется кинетохор. Она представляет собой прокрашивающуюся фибриллярную структуру диаметром или длиной около 400 нм. Кинетохор обеспечивает создание ЦОМТ на хромосоме. На рис. 6.12 представлена иерархическая организация связывания ДНК центромеры с микротрубочками. Белки, связанные с ДНК центромеры, связаны с другими белками, которые, в свою очередь, связаны с микротрубочками (см. 6.8 *Центромера связывает белковый комплекс*).



Рис. 6.11. С-полосы образуются в результате интенсивного прокрашивания центромер всех хромосом. Фотография любезно предоставлена Лизой Шеффер, Университет штата Вашингтон, Спокэн



2. Центромера идентифицируется по определенной последовательности ДНК, связывающей специфические белки. Эти белки непосредственно не взаимодействуют с микротрубочками, однако обозначают сайт, к которому присоединяются белки, в свою очередь связывающиеся с микротрубочками

Когда центромеры сестринских хроматид начинают движение к полюсам, хроматиды остаются скрепленными посредством «склеивающих» белков, называемых когезины. Вначале хроматиды разделяются в области центромеры, а затем, в анафазе, когда когезины разрушаются, они полностью отделяются друг от друга.

6.7 Центромеры хромосом *S. cerevisiae* содержат короткие последовательности ДНК

Основные положения

- В *S. cerevisiae* идентифицированы *CEN*-элементы по способности плазмиды к сегрегации в митозе
- *CEN*-элементы состоят из коротких консервативных последовательностей *CDE-I* и *CDE-III*, которые фланкируют регион *CDE-II*, обогащенный АТ-элементами

Если в сегрегации ДНК участвует центромерная последовательность, то любая молекула ДНК, обладающая такой последовательностью, при митозе должна мигрировать в нужном направлении. Если последовательность

отсутствует, то ДНК не способна к сегрегации. Исходя из этого предположения, из дрожжей *S. cerevisiae* была выделена центромерная ДНК. В отличие от высших эукариот хромосомы дрожжей не содержат видимых кинетохоров, однако делятся при митозе и сегрегируют при мейозе по тому же механизму.

Можно получить плазмиды, которые содержат точку начала репликации и реплицируются подобно хромосомным последовательностям. Однако в митозе и мейозе они нестабильны, и из-за ошибочной сегрегации большинство клеток их выбрасывает. По способности обеспечивать таким плаздам устойчивость в митозе были выделены фрагменты хромосомной ДНК, содержащей центромеры.

CEN-фрагмент идентифицируется как последовательность минимального размера, которая при введении в плазмиду обеспечивает ее устойчивость. Еще один способ охарактеризовать функцию таких последовательностей состоит в их модификации *in vitro* и повторном введении в дрожжевые клетки, где они заменяют соответствующие центромеры хромосомы. Это позволяет ввести непосредственно в состав хромосомы последовательность, необходимую для функционирования *CEN*.

Фрагмент *CEN*, полученный из одной хромосомы, может заменить центромеру в другой хромосоме, причем это не сопровождается какими-либо последствиями. Это позволяет предполагать, что центромеры взаимозаменяемы. Они функционируют только в качестве инструментов присоединения хромосом к веретену и не играют никакой роли в обеспечении различий между хромосомами.

Последовательность, необходимая для функционирования центромеры, составляет около 120 пн. Область центромеры устойчива к действию нуклеаз и способна связываться с одной микротрубочкой. Поэтому в центромерной области *S. cerevisiae* мы можем обнаружить белки, которые связывают центромерную ДНК, и белки, присоединяющие хромосому к веретену.

В области фрагмента *CEN* различают три типа последовательностей (рис. 6.7):

- *CDE-I* — последовательность длиной 9 пн. Эта последовательность, незначительно варьируя по составу, присутствует на левой границе всех центромер.
- *CDE-II* — последовательность длиной 80–90 пн, более чем на 90% состоящая из АТ-блоков и обнаруженная во всех центромерах. Функции этой последовательности определяются длиной, а не нуклеотидным составом. По структуре она приближается к коротким тандемным повторам (сателлитным) ДНК.

ДНК центромер *S. cerevisiae* обладает короткими консервативными и длинной А-Т-последовательностью

TCACATGATGATATTTGATTTTATTATATTTTTAAAAAAGTAAAAATAAAAGTAGTTTATTTTAAAAATAAAATTTAAAAATTTTACAAAAATGATTTCGAA
AGTGTACTACTATAAACTAAAAATAATAAAAAATTTTTCATTTTATTTTTCATCAATAAAAAATTTTATTTTAAATTTTATAAAGTGTTTTACTAAAGGCTT

CDE-I

CDE-II 80–90 bp, >90% A+T

CDE-III

*. 1 Поиск гомологии между элементами *CEN* дрожжей позволил идентифицировать три консервативных последовательности


• CDE-III последовательность длиной 11 пн, которая высококонсервативна и обнаруживается на правой границе всех центромер. Последовательности, расположенные по сторонам этого фрагмента, менее консервативны и, возможно, также необходимы для функционирования центромеры.

Мутации в CDE-I и в CDE-II приводят к частичной утрате функции центромеры, однако точечные мутации в центральной CCG области последовательности CDE-III полностью лишают центромеру ее функции.

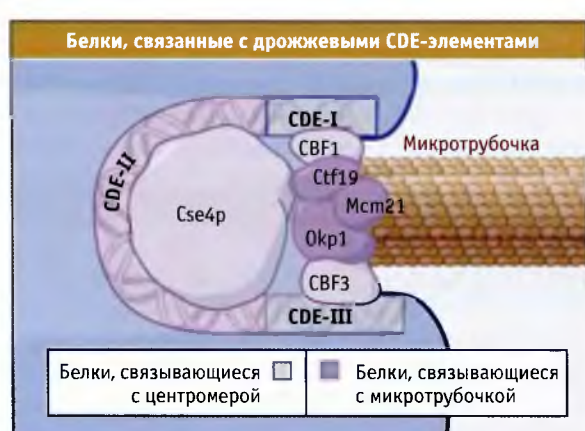
6.8 Центромера связывает белковый комплекс


Основные положения

- Вместо обычного хроматина с последовательностью CDE-II связан специальный белковый комплекс
- Для функционирования центромеры необходим комплекс белков под названием CBF3, который связывается с CDE-III
- Белки, связывающие два этих комплекса, могут обеспечивать присоединение центромеры к микротрубочкам

Возможно ли идентифицировать белки, необходимые для функционирования *CEN*-последовательностей? Известны несколько генов, мутации в которых влияют на сегрегацию хромосом и продукты которых локализуются на центромерах. На  схематически представлено участие этих белков в формировании структуры центромер.

При связывании последовательности CDE-II с белком, который называется Cse4p, образуется специальная структура хроматина, которая напоминает один из гистонов, являющийся его основной структурной единицей (см. 6.31. *Образование гетерохроматина зависит от взаимодействия белков с гистонами*). В этот комплекс также может входить или присоединяться к нему белок



 ДНК, включающая последовательность CDE-II, обернута вокруг белкового комплекса, состоящего из Cse4p, CDE-III связан с CBF3, и CDE-I с CBF1. Эти белки соединены посредством группы, состоящей из Ctf19, Mcm21, и Okp1

Mif2p. В хромосомах клеток высших эукариот белкам Cse4p и Mif2p соответствуют аналоги, CENP-A и CENP-C. Это позволяет предполагать, что взаимодействие последовательности с белками может представлять собой общий принцип организации конструкции центромеры. При таком взаимодействии ДНК, локализованная в области CDE-II, закручивается вокруг белкового агрегата; по-видимому, этому способствует существование изгиба последовательности CDE-II.

Последовательность CDE-I связана с гомодимером CBF-1: вероятно, это взаимодействие не влияет на функции центромеры, но в его отсутствие точность сегрегации хромосом снижается примерно в 10 раз. Комплекс CBF3, состоящий из четырех белков и имеющий массу 240 кДа, связывается с последовательностью CDE-III. Это взаимодействие необходимо для функционирования центромеры.

Белки, связанные с CDE-I и CDE-III, также связываются между собой и с белками, присоединенными к последовательности CDE-II еще одной группой белков (Ctf19, Mcm21, Okp1). Возможно, связывание с микротрубочками происходит с участием этого комплекса.

Согласно универсальной модели, комплекс локализован на центромере с помощью белковой структуры, которая напоминает структурную единицу хроматина (нуклеосому). Из-за изгиба ДНК, входящей в эту структуру, белки, связанные с фланкирующими элементами, представляют собой часть единого комплекса. Некоторые компоненты комплекса (по-видимому, непосредственно не связанные с ДНК), участвуют в связывании центромеры с микротрубочками. Вероятно, у большинства организмов строение кинетохора одинаково, и он состоит из близких по составу компонентов.

6.9 В области центромеры могут содержаться повторяющиеся последовательности ДНК

Основные положения

- ДНК центромер хромосом высших эукариот содержит много повторов
- Функция повторов в ДНК неизвестна

Длина ДНК, обеспечивающая функционирование центромеры, часто достигает существенной величины. (Отдельные короткие элементы *S. cerevisiae* представляют исключение из общего правила.) В случаях, когда удается установить принадлежность последовательности ДНК к области центромеры, она обычно содержит повторы. Последние представляют собой относительно короткие последовательности, расположенные тандемно и повторяющиеся много раз. Эти последовательности не обладают функцией кодирования.

S. cerevisiae представляют собой пока единственный пример организма, позволяющего идентифицировать

ДНК центромеры по способности вызывать устойчивость плазмид. Близкий подход был использован для дрожжей *S. pombe*. Этот вид содержит только три хромосомы, и для идентификации области, содержащей центромеру, большая часть последовательности ДНК каждой хромосомы удалялась. При этом получалась устойчивая мини-хромосома. Использованный подход позволил локализовать центромеру в области, размером 40–100 тпн, состоящей исключительно, или в основном из повторяющихся участков ДНК. Пока неизвестно, какая часть этого довольно протяженного участка необходима для сегрегации хромосом в митозе и мейозе.

Попытки локализовать центромеры в хромосомах *Drosophila* показали, что они распределены по большой области размером 200–600 тпн. Такой размер центромерной области позволяет предполагать, что в данном случае центромеры выполняют несколько независимых специализированных функций и включают последовательности, необходимые для сборки кинетохора, спаривания сестринских хроматид и т. д.

В *Arabidopsis* центромерные участки характеризуются близкими размерами. В каждой из пяти хромосом находится центромерная область, возможность рекомбинаций в которой сильно ограничена. Эта область составляет более 500 тпн. Очевидно, она включает центромеру, однако мы не знаем, какую часть она занимает. В этой области также находятся экспрессируемые гены, что вызывает некоторые сомнения относительно принадлежности ее целиком к центромере. В центре этой области присутствует серия 180 пн повторов, что обычно служит признаком центромеры. Пока преждевременно говорить о связи этих структур с функцией центромеры.

Основным компонентом гетерохроматина центромеры является сателлитная ДНК, которая состоит из tandemно расположенных повторов размером 170 пн. Между отдельными повторами существуют значительные вариации, хотя по структуре центромерные повторы ближе друг к другу, чем расположенные в других участках ДНК. Очевидно, что последовательности, необходимые для функционирования центромеры, находятся в блоках α -сателлитной ДНК, однако не ясно, обеспечивают эти функции сами α -сателлитные последовательности или расположенные среди них другие последовательности.

Мы знаем, что теломера должна обладать особой структурой, поскольку концы хромосомы, образовавшиеся в результате разрыва, являются «липкими» и могут воссоединяться с другими хромосомами, в то время как естественные концы хромосом отличаются устойчивостью.

При идентификации теломерной последовательности необходимо принимать во внимание два критерия:

- Последовательность должна быть расположена на конце хромосомы.
- Она должна придавать линейной молекуле ДНК устойчивость.

Методический подход, который позволил отбирать последовательности ДНК по функциональному критерию, был разработан опять-таки с использованием дрожжей. Все плазмиды, которые способны существовать в клетках дрожжей (и обладающие *ARS*- и *CEN*-элементами), представляют молекулы циркулярной ДНК. Линейные плазмиды нестабильны и деградируют. Теломеры можно отбирать как последовательности, способные обеспечивать стабильность плазмид. Так можно идентифицировать фрагменты дрожжевой ДНК, локализованные на концах хромосом. Аналогичным образом, стабильность линейных форм дрожжевых плазмид обеспечивается концевыми участками природных линейных молекул ДНК — экстрахромосомной рДНК *Tetrahymena*.

Теломерные последовательности были обнаружены в хромосомах самых разных представителей высших и низших эукариот. Для хромосом клеток растений и человека обнаружен одинаковый тип последовательности. Это свидетельствует о том, что в основе структурной организации теломеры лежит общий принцип. Каждая теломера состоит из протяженного участка коротких последовательностей, расположенных tandemно. В зависимости от организма он может содержать 100–1000 повторов.

Все теломерные последовательности могут быть представлены в виде общей формулы $C_n(A/T)_m$, где $n > 1$ и $m = 1 - 4$. На рис. 6.11 представлен типичный пример. Необычным свойством теломерной последовательности является продолжение ГТ-цепи в виде одиночной, длиной 14–16 оснований. По-видимому, ГТ-конец образу-

6.10 Теломеры реплицируются по особому механизму

Основные положения

- Для стабилизации концов хромосомы необходимы теломеры
- Теломера состоит из простых повторов, Ц+А-обогащенная цепь которых характеризуется последовательностью $C_{n+1}(A/T)_{1-4}$

Еще одной характерной чертой строения всех хромосом является теломера, которая «закрывает» их концы.



Рис. 6.11. Типичная теломера характеризуется простой повторяющейся структурой, ГТ-богатая цепь которой выходит за пределы ЦА-богатой цепи. Г-богатый концевой участок образуется при ограниченной деградации ЦА-богатой цепи



Мутации в теломеразе вызывают укорочение теломер после каждого цикла деления.
Полная потеря теломеры вызывает разрывы и перегруппировки хромосом

ется за счет специфической ограниченной деградации ЦА-богатой цепи.

Теломерный участок реплицируется по специфическому механизму. Фермент теломераза представляет собой рибонуклеопротеид, который содержит матричную РНК, с той же последовательностью, что и в ЦА-богатой цепи. РНК присоединяется к теломере, образуя праймер, с которого начинается рост цепи с участием обратной транскриптазы, входящей в теломеразный комплекс. Процессивность фермента и число добавляемых повторов контролируются другими белками комплекса.

Поскольку репликация ДНК не может начаться с самого конца линейной молекулы, при репликации хромосомы количество повторов в теломере снижается. Это можно продемонстрировать, заблокировав активность теломеразы. Как следует из РИС. 6.16, мутация по гену теломеразы приводит к укорачиванию теломерных участков с каждым делением клетки. РИС. 6.17 показывает, что длина теломеры на протяжении 120 клеточных поколений снижается с 400 пн до нуля.

Способность теломеразы добавлять повторы к теломере при синтезе *de novo*, компенсирует их потерю за счет невозможности протекания репликации до конца хромосомы. Удлинение и укорачивание теломер находятся в динамическом равновесии. Если эти участки постоянно удлиняются (и укорачиваются), то их первичная последовательность не играет роли. Необходимо всего лишь, чтобы конец последовательности признавался подходящим субстратом для удлинения теломеры. Теломеразная активность присутствует во всех делящихся клетках, и фермент обычно не обнаруживается в терминально дифференцированных, т. е. неделящихся клетках.

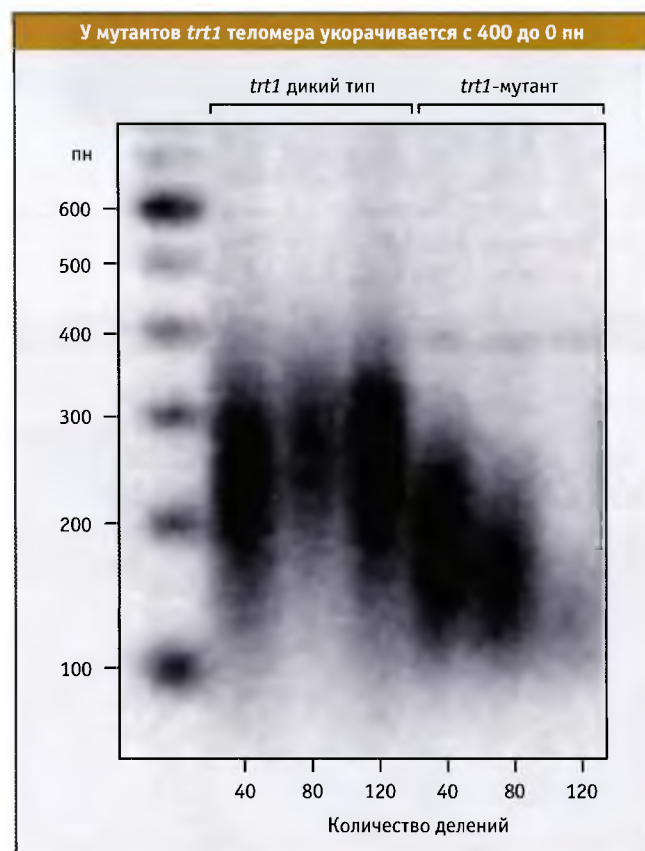


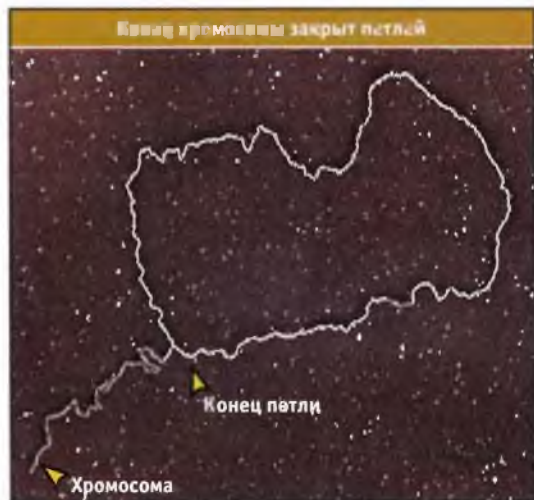
РИС. 6.17. В диком штамме дрожжей длина теломеры составляет около 350 пн, однако у мутанта по гену *trt1*, кодирующего компонент РНК теломеразы, длина ее быстро сокращается до нуля. Фотография воспроизводится с разрешения Т.Р. Чех из работы Nakamura, T.M., et al. 1997. *Science*. 277: 955. © 1997 AAAS

6.11 Теломеры замыкают концы хромосом

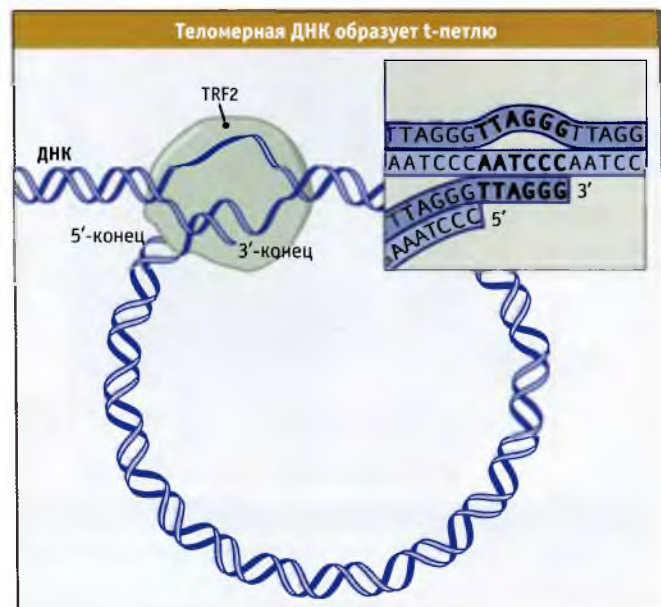
Основные положения

- Белок TRF2 катализирует реакцию, в которой 3'-конец Г+Т-цепи образует петлю, перемещая свой гомолог в вышерасположенный участок теломеры

Наряду с участием теломер в репликации концов линейной ДНК, они также стабилизируют концы хромосом. Выделенные теломеры ведут себя не как одноцепочечные ДНК. Они обладают aberrантной подвиж-



На конце ДНК хромосомы образуется петля. С любезного разрешения Джека Гриффита, Университет Северной Каролины, Чэпел Хилл



3'-одноцепочечный конец теломеры (TTAGGG) перемещает гомологичные повторы дуплексной ДНК, образуя t-петлю. Реакция катализируется TRF2

ностью при электрофорезе и другими характерными свойствами.

показывает, что на теломере образуется петля ДНК. Отсутствие свободных концов может являться критическим признаком, обеспечивающим стабилизацию конца хромосомы. В клетках животных средняя длина петли составляет 5–10 тпн.

Как следует из рисунка, образование петли происходит, когда 3'-конец одиночной цепи теломеры (TTAGGG)_n перемещает эту же последовательность в вышерасположенный участок. При этом дуплексная область превращается в структуру, в которой за счет смещения серии повторов TTAGGG образуется одноцепочечная область и хвост теломеры спаривается с гомологичной цепью.

Реакция катализируется белком TRF2, связывающимся с теломерой. Вместе с другими белками он образует комплекс, стабилизирующий концы хромосомы. Важная роль, которую этот белок играет в защите ее концов, подтверждается тем фактом, что инактивация фермента TRF2 приводит к перегруппировке хромосом.

6.12 Хромосомы типа ламповых щеток деспирализованы

Основные положения

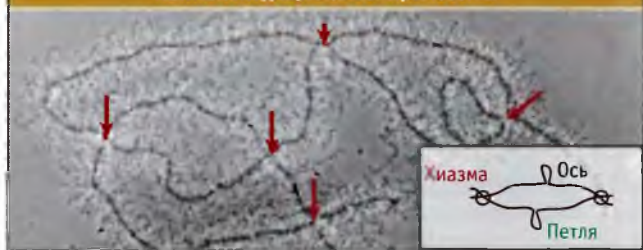
- Сайты экспрессии генов хромосом типа ламповых щеток обнаруживают петли, которые прикреплены к их осям

Возможность визуализации процесса генной экспрессии была бы чрезвычайно полезна для наблюдения за структурами, связанными с транскрипцией. Однако компактизация ДНК в хроматине, а также трудность идентификации специфических генов в ее составе не позволяют непосредственно видеть транскрипцию индивидуальных активных генов.

Лишь в некоторых необычных случаях можно наблюдать процесс генной экспрессии. К числу их относится деспирализованное состояние хромосом, позволяющее различить отдельные локусы (или группы локусов). У многих хромосом впервые перед мейозом наблюдается появление своеобразных структур, расположенных вдоль хромосомы. При этом хромосома напоминает цепь бусин на нитке. Эти бусины представляют собой интенсивно прокрашивающиеся гранулы, которые носят название **хромомеры**. Однако обычно в мейозе происходит экспрессия лишь ограниченного числа генов, и поэтому такие структуры нецелесообразно использовать для наблюдения за активностью отдельных генов. Наиболее подходящую модель представляют **хромосомы типа ламповых щеток**, которые лучше всего изучены у некоторых амфибий.

Хромосомы типа ламповых щеток образуются при необычно длительном мейозе, который может продолжаться до нескольких месяцев! В течение всего этого срока хромосомы существуют в деспирализованной форме, которую можно наблюдать в световом микроско-

Петли, отходящие от оси хромосомы



Хромосомы типа ламповых щеток представляют собой мейотический бивалент, у которого две пары сестринских хроматид удерживаются вместе в местах хиазм (показаны стрелками). Фотография любезно предоставлена Джозефом Г. Голлом, Институт Карнеги

пе. Позже, в мейозе, хромосомы возвращаются к обычному компактному состоянию. Таким образом, релаксированная структура представляет собой распакованную разновидность нормальной структуры хромосомы.

Хромосомы типа ламповых щеток являются мейотическими бивалентами, и каждая состоит из двух пар сестринских хроматид, **рис. 6.11** иллюстрирует пример почти полного расхождения пар сестринских хроматид, которые удерживаются только хиазмами. Каждая пара сестринских хроматид образует серию хромомеров эллипсоидной формы, достигающих 1–2 мкм в диаметре и соединенных друг с другом посредством очень тонкой нити. Эта непрерывная нить состоит из двух сестринских дуплексов ДНК и располагается вдоль хромосомы, проходя через хромомеры.

Длина индивидуальных хромосом типа ламповых щеток у тритона *Notophthalmus viridescens* составляет 400–800 мкм. Позже, в мейозе, они уменьшаются до 15–20 мкм. Таким образом, хромосомы типа ламповых щеток упакованы примерно в 30 раз менее компактно. Общая длина всего набора хромосом типа ламповых щеток составляет 5–6 мм, и он содержит примерно 5000 хромомеров.

Эти хромосомы получили свое название из-за множества петлеобразных структур, расположенных перпендикулярно хромомерам на определенном расстоянии друг от друга. (По виду они напоминают давно забытые щетки для чистки ламповых стекол.) Петли располагаются попарно, по одной петле от каждой сестринской хроматиды. Они составляют продолжение осевой нити. Это позволяет предполагать, что петли выступают из хромосомного материала, плотно упакованного в хромомере.

Петли окружены рибонуклеопротеиновым матриксом, который содержит новосинтезированные цепи РНК. Во многих случаях единицу транскрипции можно определить по увеличению длины РНП, продвигающегося вдоль петли. Пример этого показан на **рис. 6.12**.

Таким образом, петля — это активно транскрибируемый выступающий участок ДНК. В некоторых случаях петли соответствуют определенным генам, которые были идентифицированы. В этих случаях можно было изучить структуру транскрибированного гена и природу его продукта *in situ*.

6.13 Политенные хромосомы образуют полосы-диски

Основные положения

- Политенные хромосомы двукрылых характеризуются наличием серий полос-дисков, рисунок которых можно использовать в качестве цитологической карты

Интерфазные ядра в некоторых тканях личинок двукрылых мух содержат хромосомы во много раз большего размера, чем обычные хромосомы. У этих хромосом увеличены диаметр и длина. На **рис. 6.22** в качестве примера представлен хромосомный набор клеток слюнной железы *D. melanogaster*. Такие хромосомы называют **политенными**.

Транскрипция петли хромосомы типа ламповой щетки



рис. 6.12 Петля хромосомы типа ламповой щетки, окруженная матриксом из рибонуклеопротеина. Фотография любезно предоставлена Оскаром Миллером

В политенных хромосомах содержится множество дисков



рис. 6.22 Политенные хромосомы *D. melanogaster* образуют серии дисков и междисков. Фотография любезно предоставлена Джозе Боннером, Университет Индианы

Каждая хромосома состоит из видимой серии полос-дисков (которые более правильно, но редко называют хромомерами). Существует примерно десятикратное различие в размере дисков. Наибольшая ширина составляет около 0,5 мкм, а наименьшая — 0,05 мкм. (Наименьшие диски видны только в электронном микроскопе.) В дисках находится большая часть массы ДНК, и они интенсивно прокрашиваются соответствующими красителями. Участки между отдельными дисками окрашиваются светлее; их называют междисками. В хромосомном наборе *D. melanogaster* содержится около 5000 дисков.

Центромеры всех четырех хромосом *D. melanogaster* агрегируют с образованием хромоцентра, который в значительной степени состоит из гетерохроматина (а у самцов включает целиком Y-хромосому). С учетом этого можно считать, что около 75% гаплоидного набора ДНК организовано в диски и междиски. В растянутом состоянии эта ДНК представляет собой линейную структуру, длиной примерно 40 000 мкм. Длина всего хромосомного набора составляет примерно 2000 мкм, т. е. примерно в 100 раз превышает длину гаплоидного набора в митозе. Это ясно показывает, в каком растянутом состоянии находится генетический материал в политенной хромосоме по сравнению с его обычными состояниями в интерфазном хроматине или в митотических хромосомах.

Какова структура этих гигантских хромосом? Каждая хромосома образуется в результате последовательных актов репликации конъюгировавшей пары гомологов. Реплики не разделяются, а остаются прикрепленными друг к другу по всей длине. В начале процесса каждая конъюгировавшая пара содержит количество ДНК, равное $2C$ (где C — это содержание ДНК в одной индивидуальной хромосоме). Затем число удвоений происходит до 9 раз; в результате максимальное содержание ДНК может достигнуть $1024C$. Число удвоений варьирует в различных тканях личинки *D. melanogaster*.

Каждая политенная хромосома видна в виде большого числа параллельных нитей, сильно сконденсированных в дисках и слабее в междисках. Вероятно, каждая такая нить представлена единичной копией (C) гаплоидной хромосомы. Отсюда и происходит термин «политения». Степень политения определяется числом гаплоидных хромосом, содержащихся в гигантской хромосоме.

Для каждой линии *Drosophila* характерен свой набор дисков. Постоянство числа и линейного расположения дисков впервые было отмечено в 1930-х годах, когда стало понятно, что диски образуют *цитологическую карту* хромосом. В результате перестроек — таких как делеции, инверсии или дупликации, — происходит изменение линейного порядка дисков.

Линейный порядок дисков соответствует линейному расположению генов. Таким образом, генетические перестройки, как это видно по карте сцепления, можно привести в соответствие со структурными перестройками на цитологической карте. В конечном итоге, конкретную мутацию можно локализовать в определенном

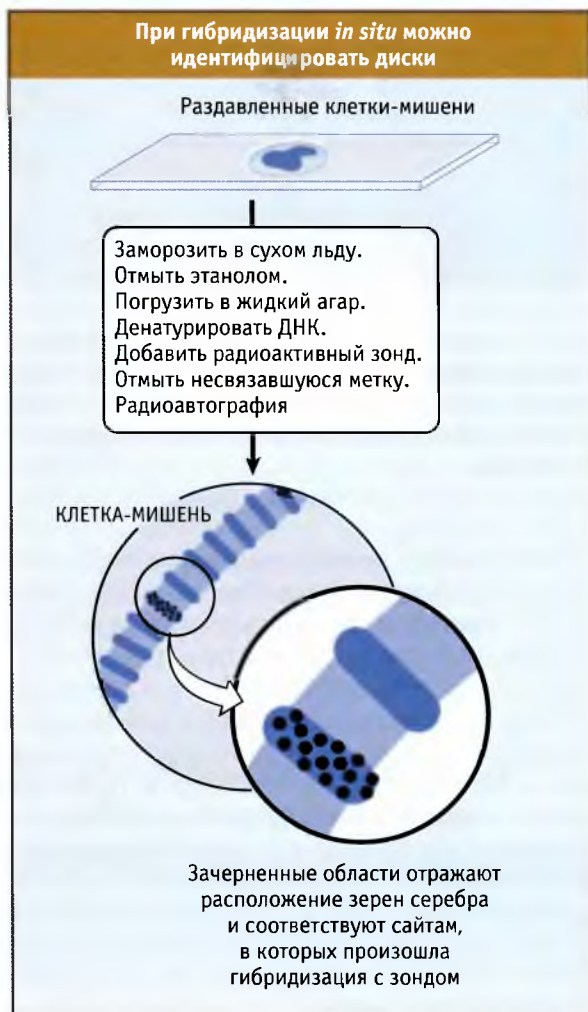


РИС. 6.23. Индивидуальные диски, содержащие определенные гены, можно идентифицировать методом гибридизации *in situ*



РИС. 6.24. При большом увеличении показана гибридизация *in situ* на дисках 87A и 87C с меченой ДНК, выделенной из клеток, подвергнутых действию теплового шока. Фотография любезно предоставлена Дж. Боннером, Университет Индианы

диске. Поскольку общее число генов у *D. melanogaster* превышает число дисков, в большинстве дисков, вероятно, локализуется множество генов.

Положение определенных генов на цитологической карте можно определить непосредственно с помощью метода **гибридизации *in situ***. Общая схема метода представлена на рис. 6.24. Радиоактивная проба, представляющая некий ген (чаще всего меченный клон кДНК, полученный с иРНК), гибридизуется с денатурированной ДНК политемных хромосом *in situ*. Методом радиоавтографии можно определить местоположение одного или нескольких исследуемых генов по скоплению зерен серебра в области одного или нескольких дисков (см., например, рис. 6.25). Недавно вместо радиоактивных зондов стали использовать флуоресцентные. Используя этот метод, оказывается возможным непосредственно выявить полосу, в которой локализована специфическая последовательность.

6.14 Политемные хромосомы образуют вздутия в местах экспрессии генов

Основные положения

- Полосы-диски политемных хромосом, являющиеся сайтами генной экспрессии, образуют вздутия или «пуфы»

Одна из наиболее удивительных особенностей политемных хромосом — это возможность непосредственно наблюдать их активные участки. Некоторые диски иногда разбухают, образуя на хромосоме вздутия или **пуфы**; при этом происходит выпячивание хромосомного материала из осевой структуры. Пример очень больших пуфов (названных кольцами Бальбиани) изображен на рис. 6.25.

Какова природа пуфа? Пуф представляет собой участок, в котором хромосомные нити находятся в более релаксированном виде, чем когда они упакованы в диск. Эти нити остаются непрерывно связанными с нитями, находящимися в осевой части хромосомы. Обычно пуфы образуются из материала отдельных дисков, хотя некоторые особенно крупные пуфы, такие как кольца Бальбиани, разбухают так сильно, что заслоняют соседние диски.

Порядок расположения пуфов соответствует транскрипции генов. В процессе развития личинки пуфы появляются и исчезают в определенном тканеспецифическом порядке. Каждая ткань в любой момент развития характеризуется определенной картиной расположения пуфов. Пуфы индуцируются гормоном экдизоном, который контролирует развитие *Drosophila*, некоторые пуфы индуцируются непосредственно гормонами, тогда как индукция других опосредована продуктами более ранних пуфов.

Пуфы — это **сайты, в которых в данный момент происходит синтез РНК**. Согласно общепринятой точке зрения, образование пуфов представляет собой увеличение размеров одного диска, связанное с необходимостью релаксации его структуры для синтеза РНК. Поэтому образование пуфов рассматривают как следствие транскрипции. Пуф может образоваться при экспрессии одного активного гена. Место, где образуется пуф, отличается от того места, на котором расположен обычный диск, присутствием в нем дополнительных белков, включая РНК-полимеразу II, а также других белков транскрипции.

Особенности хромосом типа ламповых щеток и политемных хромосом позволяют прийти к выводу: чтобы транскрипция могла осуществиться, генетический материал, обычно плотно упакованный, должен деконденсироваться. Однако еще остается вопрос, соответствует ли такое локальное расплетение на уровне целой хромосомы тем событиям, которые происходят на молекулярном уровне в общей массе обычного интерфазного хроматина.

Какую функциональную роль играют диски политемных хромосом, иными словами, соответствует ли каждый диск некой генетической единице? Можно было бы надеяться, что ответ на этот вопрос будет получен на основании результатов секвенирования генома дрозофилы, поскольку, сопоставляя области междисков с местонахождением определенных последовательностей ДНК, можно выяснить их локализацию. Однако пока не получено картины, позволяющей оценить функциональную роль дисков.



Рис. 6.25. На хромосоме IV из слюнной железы *C. tentans* видны три кольца Бальбиани. Фотография воспроизведена из Cell, vol. 4, Daneholt, B., et al., *Transcription in polytene chromosomes*, pp. 1–9. © 1975 с разрешения Elsevier. Фотография с любезного разрешения Б. Дейнхольта, Медицинский институт Нобеля

6.15 Основной структурной единицей хроматина является нуклеосома

Основные положения

- При действии микрококковой нуклеазы из хроматина высвобождаются индивидуальные нуклеосомы, представляющие собой частицы размером 115
- Нуклеосома содержит примерно 200 пн ДНК, по две копии каждой из молекул гистонов H2A, H2B, H3 и H4, а также одну копию молекулы гистона H1
- ДНК обернута по поверхности октамера белков

Хроматин и хромосомы состоят из дезоксирибонуклеопротеиновой фибриллы, которая имеет несколько уровней организации. Структура митотических хромосом с их характерной дифференциальной окраской соответствует наиболее сложному, полностью конденсированному состоянию этой фибриллы. У всех эукариот основная структурная единица хроматина одинакова — это нуклеосома, содержащая около 200 пн ДНК и гистоны. Негистоновые белки принимают участие в скручивании цепочки нуклеосом в структуру более высокого порядка.

Когда интерфазные ядра суспендируют в растворе низкой ионной силы, они набухают и разрушаются. При этом высвобождаются фибриллы хроматина. На рис. 6.26 представлен лизат ядер, содержащий вышедший из них хроматин. Отдельные участки состоят из плотно упакованных фибрилл, однако видно, что области, содержащие релаксированный хроматин, содержат дискретные частицы. Это нуклеосомы. В полностью деспирализованных участках отдельные нуклеосомы соединены между собой тонкой нитью двойной цепи ДНК. Эта непрерывная двойная цепь проходит через группу частиц.

Индивидуальные нуклеосомы можно получить, обрабатывая хроматин одной из эндонуклеаз — **микрококковой нуклеазой**. Она разрезает нити ДНК между нуклеосомами. Вначале высвобождаются группы нуклеосом, а затем отдельные нуклеосомы. Изолированные нуклеосомы выглядят как компактные частицы (рис. 6.27). Они обладают коэффициентом седиментации ~11S.

Нуклеосома содержит ~200 пн ДНК, связанной с октамером гистонов, который состоит из двух копий молекулы каждого гистона H2A, H2B, H3, и H4. Эти гистоны называются **коровыми** (англ. core — сердцевина). Расположение их в нуклеосоме схематически показано на рис. 6.28. Эта модель объясняет стехиометрию коровых гистонов в хроматине: H2A, H2B, H3, и H4 присутствуют в эквимолекулярных количествах, по 2 молекулы каждого белка на ~200 пн ДНК.

Гистоны H3 и H4 принадлежат к числу наиболее консервативных из известных белков. Это позволяет предполагать, что они обладают одинаковыми функциями в клетках всех эукариот. Гистоны H2A и H2B обнаружены во всех эукариотических клетках, однако отмечены существенные видоспецифические различия в их первичной структуре.

Гистон H1 включает группу близких по структуре белков, которые показывают выраженную тканевую и

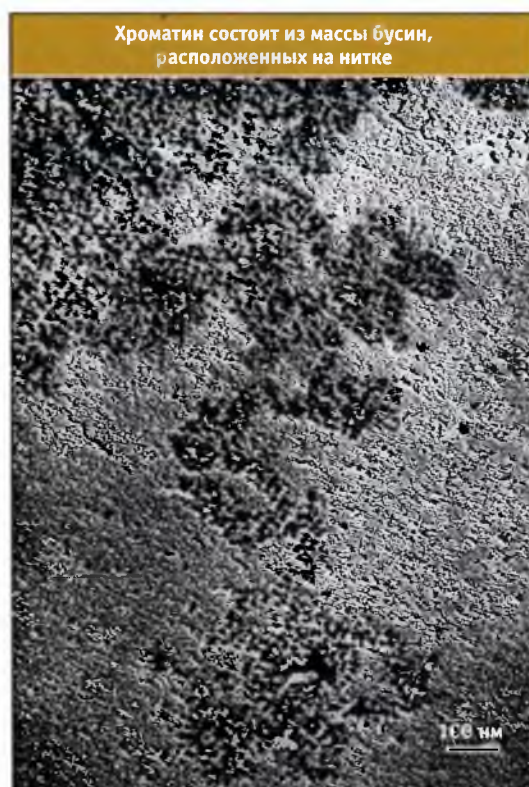


РИС. 6.26. Хроматин, который высвобождается при лизисе ядер, состоит из компактно организованных дискретных частиц. Фотография любезно предоставлена Пьером Шамбоном, Колледж де Франс. Воспроизведено из *Cell*, vol. 4, Oudet, P., et al., *Electron microscopic and biochemical evidence...*, pp. 281–300. © 1975 с разрешения Elsevier



При переваривании хроматина с помощью микрококковой нуклеазы высвобождаются индивидуальные нуклеосомы. Фотография любезно предоставлена Пьером Шамбоном, Колледж де Франс. Воспроизведено из *Cell*, vol. 4, Oudet, P., et al., *Electron microscopic and biochemical evidence...*, pp. 281–300. © 1975, с разрешения Elsevier

В составе нуклеосомы находится 200 пн ДНК и коровые гистоны

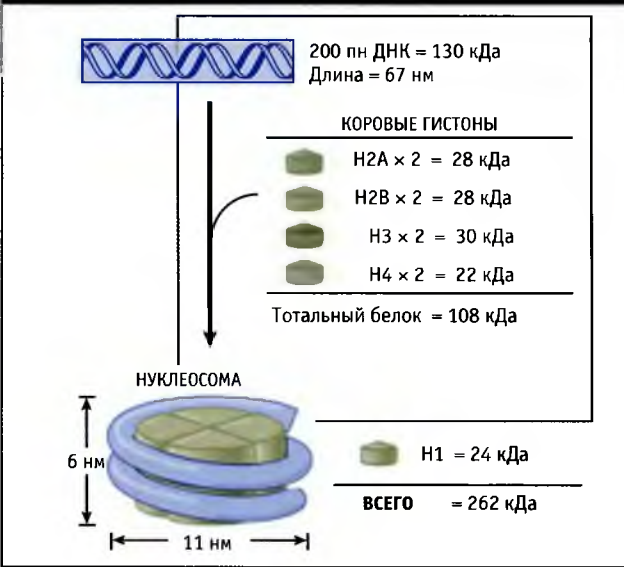


РИС. 6.28. Нуклеосомы состоят из примерно одинаковых количеств ДНК и гистонов (включая гистон H1). Рассчитанная масса нуклеосомы составляет 262 кДа

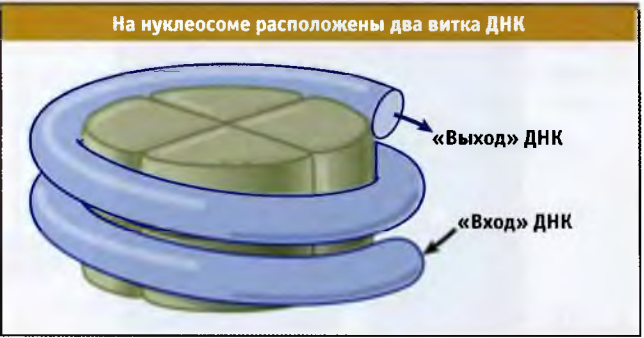


РИС. 6.29. Нуклеосома может представлять собой цилиндр, снаружи которого располагаются два витка ДНК

видовую вариабельность (и не обнаружены у дрожжей). Функция гистона H1 отличается от функции коровых гистонов. Этот гистон присутствует в хроматине в половинном от коровых гистонов количестве и может быть удален из него наиболее полно (обычно с помощью экстракции разбавленным (0,5 М) солевым раствором). *Удаление гистона H1 не нарушает структуру нуклеосомы. Это позволяет предполагать, что гистон располагается вне нуклеосомной частицы.*

По форме нуклеосома соответствует плоскому диску или цилиндру диаметром 11 нм и высотой 6 нм. Длина ДНК примерно в два раза превышает ~34 нм окружность нуклеосомы. ДНК проделывает симметричный путь вокруг октамера. На РИС. 6.29 схематически представлен путь ДНК в виде спирали, делающей два оборота вокруг цилиндрического октамера. Заметьте, что

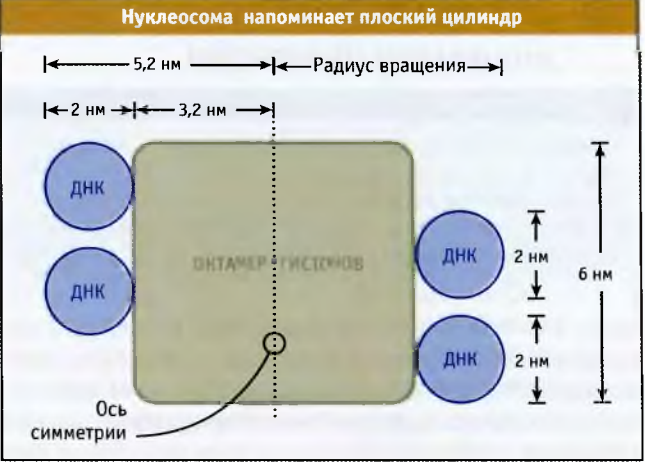


РИС. 6.30. Два витка ДНК на нуклеосоме расположены близко друг к другу

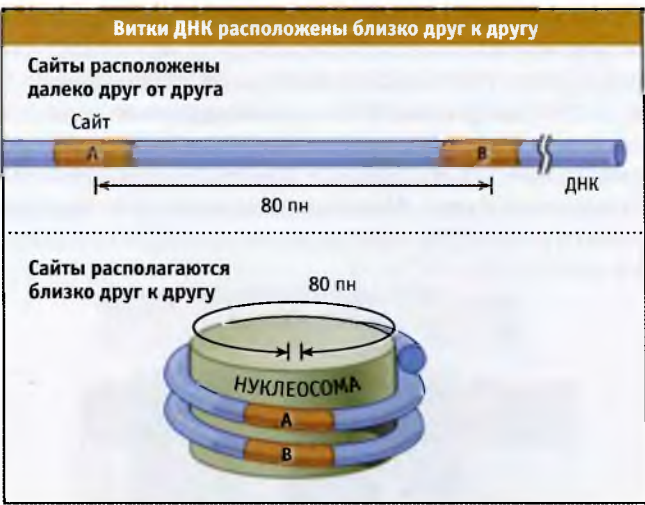


РИС. 6.31. Последовательности ДНК, локализованные на разных витках, на нуклеосоме могут располагаться близко друг к другу

ДНК «входит» на поверхность нуклеосомы и «покидает» ее в точках, расположенных близко друг к другу. В этой области может располагаться гистон H1 (см. 6.17 *Нуклеосомы обладают одинаковой структурой*).

На поперечном сечении предложенной модели мы видим, что витки двух оборотов нити ДНК лежат вплотную друг к другу (РИС. 6.30). Высота цилиндра 6 нм, из них 4 нм занято двумя витками ДНК (диаметр нити ДНК составляет 2 нм).

Наличие на нуклеосоме двух витков ДНК, возможно, имеет функциональное значение. Поскольку один виток вокруг нуклеосомы составляет ~80 пн ДНК, две точки, разделенные расстоянием 80 пн в свободной двойной спирали, в действительности, на поверхности нуклеосомы могут располагаться близко друг к другу, как это показано на РИС. 6.31.

6.16 ДНК обматывает множество нуклеосом

Основные положения

- При переваривании хроматина микрококковой нуклеазой более 95% ДНК оказывается ассоциированной с нуклеосомами или их мультимерами
- В клетках индивидуальных тканей длина участка ДНК, входящего в состав нуклеосомы, варьирует от 154 до 260 пн

При обработке хроматина ферментом микрококковой нуклеазой ДНК образует фрагменты, по величине кратные элементарной единице длины. При этом в результате фракционирования методом электрофореза в геле образуется «лестница», показанная на рис. 6.32. Такие лестницы состоят из 10 или более ступенек, и единица длины, измеренная по возрастанию последовательных ступенек, равна примерно 200 пн.

На рис. 6.33 показано, что ступеньки лестницы представляют собой группы, состоящие из разного количества нуклеосом. При фракционировании нуклеосом в сахарозном градиенте они образуют серию дискретных пиков, соответствующих мономерам, димерам, тримерам и т. д. При экстракции ДНК из индивидуальных фракций нуклеосом и последующем электрофорезе, каждая фракция образует полосу ДНК, по размеру соответствующую ступеньке лестницы. Мономерная нуклеосома содержит единицу длины ДНК, димер нуклеосом содержит удвоенное количество ДНК, и т. д.

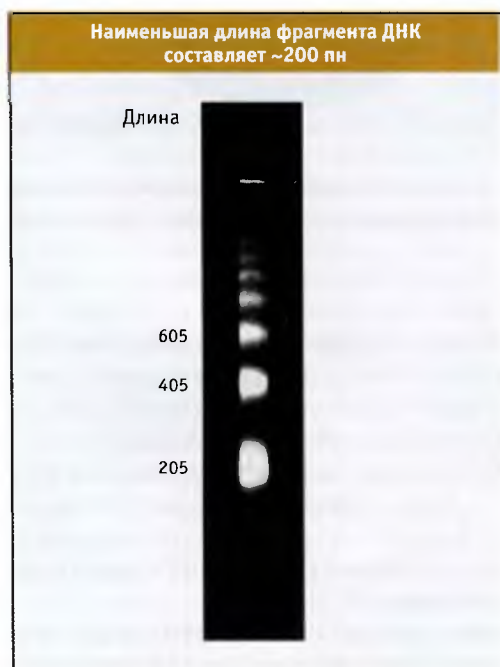


рис. 6.32 При действии микрококковой нуклеазы ядерный хроматин образует серию мультимерных фрагментов ДНК, которые можно разделить методом гель-электрофореза. Фотография любезно предоставлена Маркусом Нолем, Университет в Цюрихе

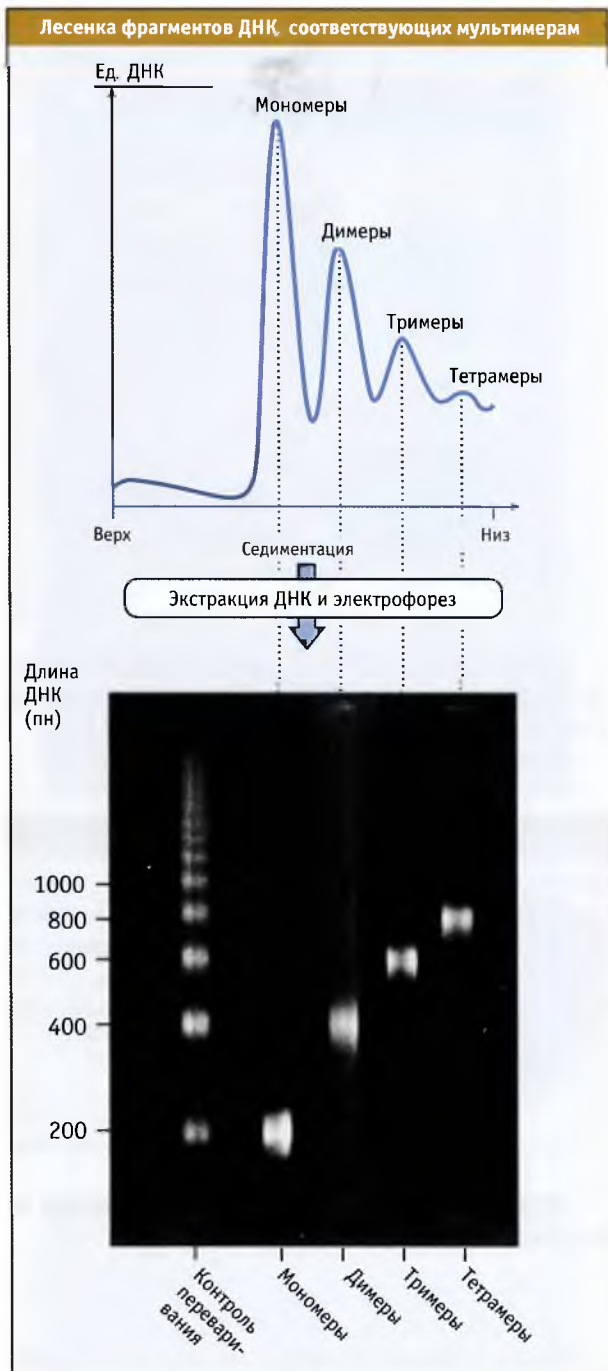


рис. 6.33 Каждый мультимер нуклеосом содержит соответствующее количество ДНК. Фотография любезно предоставлена Джоном Финчем, MRC, Лаборатория молекулярной биологии

Таким образом, каждая ступень лестницы соответствует ДНК, которая содержится в определенном количестве нуклеосом. Поэтому существование в любом хроматине лесенки, кратной 200 пн, служит показателем нуклеосомной организации ДНК. При обработке хроматина нуклеазой микрококка лесенка образуется в том случае, когда лишь 2% ядерной ДНК переходит в кислоторастворимую форму (т. е. переваривается до небольших фрагментов). Таким образом, небольшая часть

ДНК атакуется быстрее по сравнению с основной массой. Эта часть представляет собой участки с повышенной чувствительностью к действию фермента.

Когда при лизисе ядер из них выходит хроматин, часто можно видеть цепочку нуклеосом, соединенных нитью ДНК (подобно бусинам на нитке). Однако необходимость плотной упаковки ДНК *in vivo* позволяет считать, что, скорее всего, свободной ДНК в хроматине мало (если она там вообще существует).

Это представление подтверждается тем фактом, что >95% ДНК хроматина обнаруживается в форме 200 пн лестницы. Таким образом, почти вся ДНК организована в нуклеосомы. В ядре нуклеосомы организованы в очень компактной форме и связаны друг с другом посредством цепочки ДНК. По-видимому, свободная ДНК образуется за счет потери некоторого количества октамеров гистонов в ходе процедуры выделения.

Длина участка ДНК, приходящегося на нуклеосому, несколько отличается от «типичной», которая составляет 200 пн. Эта величина для каждого типа клеток характеризуется средним значением (± 5 пн). Обычно оно составляет 180–200, однако в крайних случаях может достигать 154 пн (у некоторых грибов) или 260 пн (у спермий морского ежа). В индивидуальных тканях взрослого организма средняя величина может различаться. Вместе с тем, для одной и той же клетки наблюдаются различия между участками генома. Они связаны с существованием тандемных повторов, таких как кластеры генов 5S РНК.

мер. Вначале фермент образует разрывы в ДНК, расположенной между нуклеосомами. Однако если продолжить реакцию после того, как образовались мономеры, то расщепление захватывает часть ДНК самой нуклеосомы. Эта реакция протекает путем «подрезания» ДНК с концов нуклеосомы.

Как показано на рис. 6.34, длина ДНК уменьшается ступенчато. Например, в ядрах печени крысы нуклеосомные мономеры сначала содержат отрезок ДНК длиной в 205 пн. Потом обнаруживаются мономеры, у которых длина ДНК снижена до ~165 пн. Наконец, длина этих мономеров сокращается до размера ДНК в коровой частице, 146 пн. (Эта частица достаточно устойчива, однако если продолжать обработку ферментом, то образуется «ограниченный перевар», содержащий фрагменты, самые длинные из которых соответствуют 146 пн коровой ДНК, а самые короткие достигают 20 пн.)

На основании такого анализа можно разделить нуклеосомную ДНК на две части:

- Коровая ДНК имеет постоянную длину 146 пн и относительно устойчива к расщеплению нуклеазами.
- Линкерная ДНК включает остаток повторяющейся единицы. Ее длина варьирует от такого малого размера, как 8 пн, до такого большого, как 114 пн на одну нуклеосому.

Четко ограниченный размер полосы ДНК, образующейся в результате начального этапа расщепления

6.17 Нуклеосомы обладают одинаковой структурой

Основные положения

- В зависимости от доступности для микрококковой нуклеазы ДНК нуклеосом делится на коровую и линкерную
- Длина коровой ДНК составляет 146 пн, и она расположена на коровых частицах, которые образуются при продолжительном переваривании хроматина микрококковой нуклеазой
- Линкерная ДНК в длину имеет 8–114 пн, и характеризуется повышенной чувствительностью к нуклеазе
- Изменения в общей длине нуклеосомной ДНК определяются изменениями длины линкерной ДНК
- Гистон H1 связан с линкерной ДНК и, вероятно, локализован в точке входа ДНК в нуклеосому и выхода из нее

В составе нуклеосом из разных источников находится ДНК различной длины. Однако для них характерна общая основная структура. При связывании ДНК с октамером гистонов образуется коровая частица, содержащая 146 пн ДНК, независимо от общей длины ДНК, входящей в нуклеосому. Вариативность общей длины нуклеосомной ДНК накладывается на эту основную структуру.

Коровая частица была идентифицирована по действию нуклеазы микрококков на нуклеосомный моно-

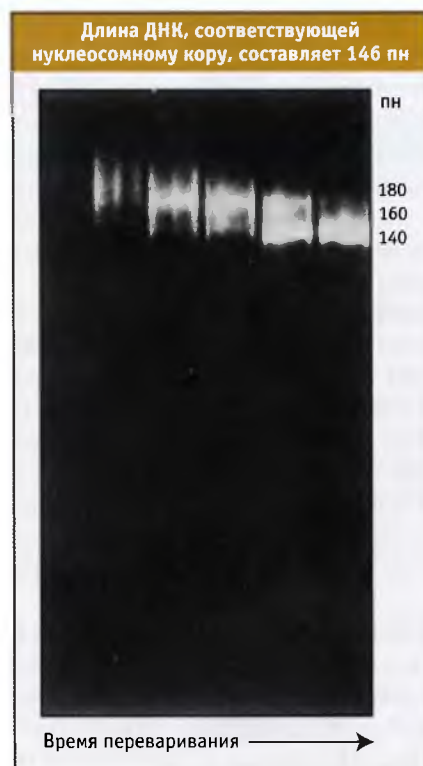


Рис. 6.34 Микрококковая нуклеаза дискретным образом снижает размеры ДНК в пределах мономеров нуклеосом. Фотография любезно предоставлена Роджером Корнбергом, Стенфордский университет

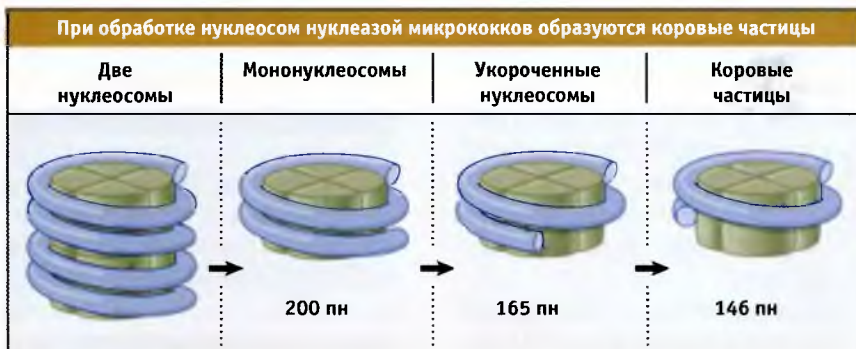


Рис. 6.35. Вначале микрококковая нуклеаза образует разрывы между нуклеосомами. Обычно мононуклеосомы содержат ~200 пн ДНК. После подрезания концов длина ДНК сокращается вначале до ~165 пн, а затем образуются коровые частицы, содержащие 146 пн

нуклеазой, говорит о том, что область, непосредственно доступная для действия фермента, ограничена. В нее входит только часть каждого линкера. (Если бы вся линкерная часть была чувствительна, то размер полосы находился бы в интервале от 146 пн до > 200 пн.) Однако после того, как в линкерной ДНК образовался разрыв, оставшаяся часть ДНК становится чувствительной и довольно быстро расщепляется ферментом. На рис. 6.35 представлены этапы расщепления ДНК нуклеосом микрококковой нуклеазой.

Коровые частицы обладают близкими к нуклеосомам свойствами, однако по размеру они меньше. Тем не менее по форме они напоминают нуклеосомы. Это позволяет считать, что основная структура нуклеосомы определяется взаимодействием между ДНК и белковым октамером коровой частицы. Поскольку коровые частицы легче получить в виде гомогенных препаратов, они чаще используются для структурных исследований, чем нуклеосомы. (Нуклеосомы варьируют по размеру, поскольку трудно получить препарат, в котором концы ДНК не были бы подрезаны.)

Какую физическую природу имеют коровая и линкерные области? Эти названия были предложены в качестве рабочих для описания областей нуклеосом, обладающих различной чувствительностью к обработке нуклеазой, и не имеют отношения к их действительной структуре. Тем не менее основная часть коровой ДНК плотно накручена на нуклеосому, а терминальные участки коровой и линкерной областей более релаксированы (см. 6.18 *Различная структура ДНК на поверхности нуклеосом*).

Существование линкерной ДНК зависит от факторов, не связанных с четырьмя коровыми гистонами. Эксперименты по реконструкции нуклеосом *in vitro* показывают, что гистоны обладают характерной способностью к организации ДНК в коровых частицах, но не образуют нуклеосомы с присущими им параметрами. Важную роль играет степень суперспирализации ДНК. Гистон H1 и/или негистоновые белки влияют на длину линкерной ДНК, связанной с октамерами гистонов в серии нуклеосом. В сборке нуклеосом из гистонов и ДНК *in vivo* уча-

ствуют «сборочные белки», которые не являются частью структуры нуклеосом (см. 6.21 *Репродукция хроматина требует сборки нуклеосом*).

Где локализуется гистон H1? Этот гистон теряется при деградации мономеров нуклеосом. Он еще сохраняется в мономерах, включающих 165 пн ДНК, но всегда отсутствует в 146 пн коровых частицах. Это позволяет предполагать, что H1 локализуется в области, где линкерная ДНК непосредственно примыкает к коровой.

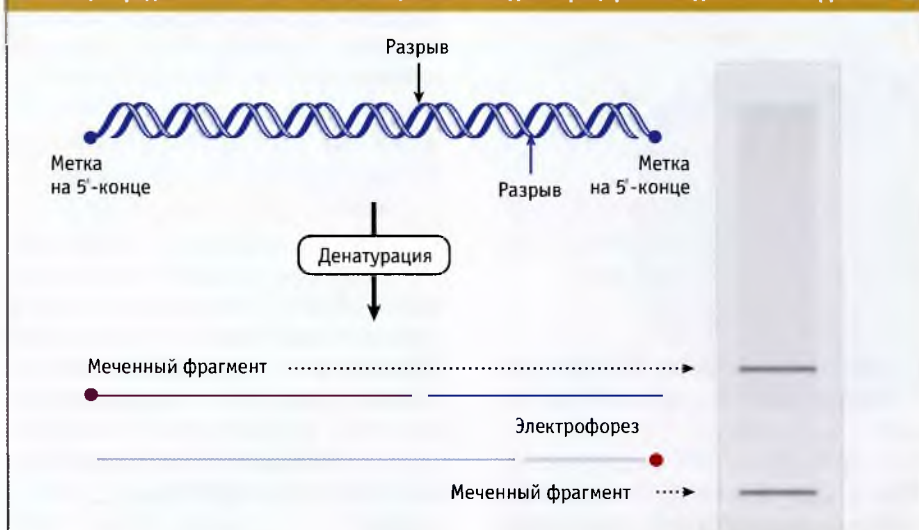
Если гистон H1 локализован в линкерной области, он может «запечатывать» ДНК в нуклеосоме, связываясь в точке, где ДНК входит в нуклеосому и выходит из нее (см. рис. 6.29). Представление о том, что гистон H1 находится в междуклеосомной области, согласуется с давно известными результатами о быстром удалении гистона H1 из хроматина и столь же быстрой после этого «солюбилизации» хроматина. Также после удаления гистона H1 легче получается фибрилла, содержащая бусинки на нитке.

6.18 Различная структура ДНК на поверхности нуклеосом

Основные положения

- Вокруг октамера гистонов обернуто 1,65 витка ДНК
- Структура ДНК изменяется таким образом, что на среднюю ее часть приходится максимальное количество оснований на виток, а на концах это значение оказывается ниже
- При изменении с 10,5 пн/виток в ДНК в растворе до 10,2 на поверхности нуклеосом, теряется около 0,6 отрицательных супервитка, что объясняет парадокс коэффициента зацепления

Расположение ДНК на поверхности нуклеосомы объясняет, почему она подвержена действию некоторых нуклеаз. Особенно информативна обработка нуклеазами, действующую на одну цепь ДНК. Эти нуклеазы (например, ДНКаза I) образуют разрывы в одной из цепей ДНК; при этом вторая цепь остается интакт-



Разрывы в цепях ДНК можно обнаружить по появлению фрагментов после денатурации ДНК, приводящей к образованию одноцепочечных форм. Если ДНК содержала метку, например, на 5'-конце, то при автордиографии будут видны только 5'-фрагменты. Размер фрагмента определяется расстоянием от разрыва до положения метки

ной, и поэтому в двухцепочечной структуре дефекты не проявляются. Однако при денатурации вместо протяженных высвобождаются короткие фрагменты ДНК. Если ДНК на концах была помечена, то концевые фрагменты можно идентифицировать методом радиоавтографии (рис. 6.36).

Когда ДНК присутствует в растворе в свободном виде, то она атакуется нуклеазами в случайных местах. ДНК, которая находится на нуклеосомах, также подвергается действию ферментов, но разрывы возникают на определенных расстояниях друг от друга. Если ДНК пометить, обработать нуклеазой, а затем денатурировать и подвергнуть электрофорезу, то получается лесенка подобно изображенной на рис. 6.37.

Расстояние между ступеньками этой лесенки составляет 10–11 оснований. Лесенка распространяется на все расстояние, которое занимает коровая ДНК. Разрывы нумеруются, начиная с S1 по S13 (где S1 отстоит примерно на 10 оснований от меченного 5'-конца, S2 на 20 оснований, и т. д.).

Не все сайты с одинаковой эффективностью атакуются ферментом: некоторые расщепляются довольно быстро, а в других разрывы образуются с трудом. ДНКаза I и ДНКаза II дают одинаковую лесенку, хотя интенсивность полос несколько различается. Это свидетельствует о том, что характер деградации ДНК определяется расположением соответствующих сайтов, которое зависит от организации ДНК и лишь в незначительной степени от сродства фермента к сайту. Такой же характер деградации ДНК обнаруживается при атаке гидроксил-радикалом. Это позволяет предполагать, что он определяется структурой самой ДНК, а не нуклеотидным составом. Отсутствие расщепления по некоторым сайтам являет-

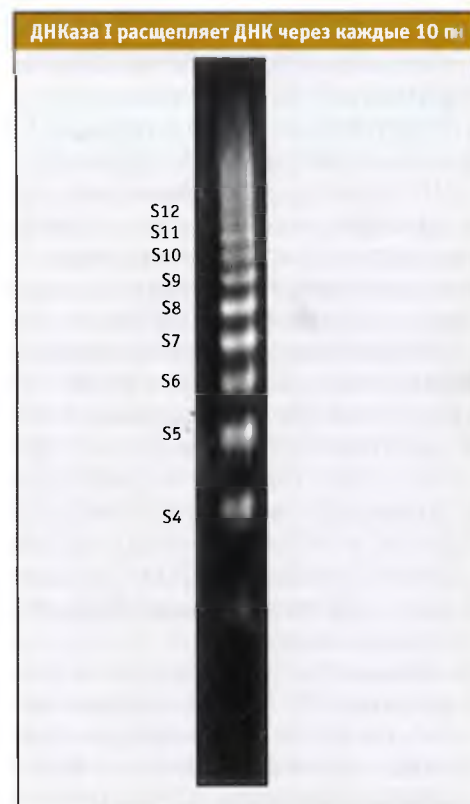


РИС. 6.37. Исследование фрагментов переваривания ядер с помощью ДНКазы I показывает, что разрывы коровой ДНК образуются через регулярные интервалы. Фотография любезно предоставлена Леонардом Люттером, Больница Генри Форда



Рис. 6.38. Наиболее чувствительные к нуклеазе сайты ДНК располагаются с периодичностью, отражающей структуру двойной спирали (для ясности показаны сайты только одной цепи)

ся следствием существования определенной структуры нуклеосомы, из-за которой некоторые участки ДНК оказываются недоступными для фермента.

Поскольку в состав коровой частицы входят две цепочки ДНК, метятся оба 5'- (или 3'-) конца, по одному в каждой цепи. Таким образом, при обработке нуклеазами образуются фрагменты обеих цепей. Это иллюстрируется рис. 6.36, где каждый меченный фрагмент происходит из различной цепи. В результате, в таком эксперименте каждая меченная полоса фактически представлена двумя фрагментами, отрезанными на *одном и том же* расстоянии от *любого* из меченных концов.

Каким же образом можно тогда объяснить дискретное предпочтение определенных сайтов? Считается, что путь ДНК вдоль частицы симметричен (по отношению к горизонтальной оси, проходящей через нуклеосому, схематически изображенную на рис. 6.29). Таким образом, если, например, после обработки ДНКазой I не образуется фрагмент в 80 пн, это должно означать, что положение, соответствующее 80-му основанию с 5'-конца *любой* из цепей, не чувствительно к ферменту.

Когда ДНК иммобилизована на плоской поверхности, сайты нарезаются в соответствии с определенным расстоянием между точками расщепления. Рис. 6.38 позволяет предполагать, что периодичность разрезания соответствует структурной периодичности, присущей В-форме ДНК (классической двуспиральной структуре В-типа, предложенной Уотсоном и Криком). Периодичность разрезания (расстояние между точками расщепления) действительно соответствует структурной периодичности (числу пар на виток двойной спирали). Таким образом, расстояние между точками расщепления соответствует числу нуклеотидных пар, приходящемуся на виток. Соответствующие измерения показывают, что среднее значение для двухспиральной В-формы ДНК составляет 10,5 пн на виток.

Какова природа участков-мишеней на нуклеосоме? Рис. 6.39 иллюстрирует данные, согласно которым в каждом сайте разрезания существуют 3–4 положения, в которых может произойти разрез, т. е. сайт разрезания определяется с точностью ± 2 пн. Иными словами, сайт разрезания представляет собой короткий отрезок в обеих цепях, на 3–4 пары оснований открытый для действия нуклеазы. Относительная интенсивность разрезания указывает на то, что некоторые положения оказываются предпочтительнее других.

На основании полученной картины можно рассчитать «среднюю» точку разрезания. Пары сайтов S1–S4 и S10–S13, лежащие на концах ДНК, находятся на расстоянии 10,0 оснований друг от друга. Сайты от S4 до S10, расположенные в ДНК в центре частицы, разделены 10,7 оснований. (Поскольку мы анализируем среднее положение, сайты оказываются разделены не целым числом оснований.)

Вариабельность в периодичности разрезания коровой ДНК (10,0 на концах и 10,7 в середине молекулы) означает, что существует вариабельность в ее структурной периодичности. ДНК, находящаяся в середине частицы содержит больше, а находящаяся на концах меньше пн на виток, чем ДНК в растворе. Средняя периодичность на нуклеосому составляет только 10,17 пн на виток, что существенно меньше, чем 10,5 пн приходящихся на виток ДНК в растворе.

На основании кристаллической структуры коровой частицы можно предполагать, что ДНК организована в плоскую суперспираль, которая образует 1,65 витка вокруг октамера гистонов. Шаг суперспирали варьирует, и в середине имеется перерыв. Области перегибов расположены симметрично и находятся в положениях ± 1 и ± 4 . Это соответствует сайтам S6 и S8 и S3 и S11, которые наименее чувствительны к ДНКазе I.

Структура нуклеосомной коровой частицы показывает, каким образом искажается структура ДНК. Большая

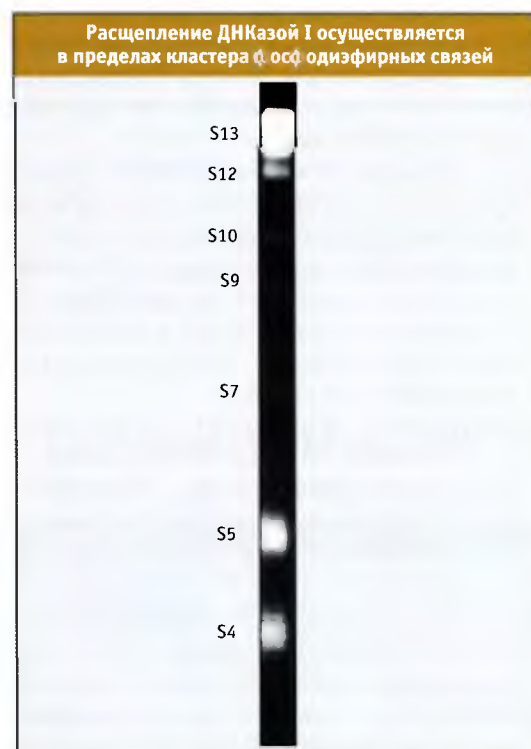


Рис. 6.39. Методом электрофореза с высоким разрешением показано, что каждый сайт атаки ДНКазы I состоит из нескольких чувствительных фосфодиэфирных связей. Это следует из рисунка, на котором представлены фрагменты ДНК после ДНКазной обработки коровых частиц с концевым мечением ДНК. Атака фермента происходила по сайтам S4 и S5. Фотография любезно предоставлена Леонардом Люттером, Больница Генри Форда

часть суперспиральной структуры приходится на центральный район в 129 пн, в котором находится 1,59 левых суперспиральных витка диаметром 80 Å (лишь в 4 раза превышающим диаметр самого дуплекса ДНК). Концевые терминальные последовательности вносят лишь небольшой вклад в общую кривизну.

Центральные 129 пн находятся в В-форме, но существенно деформированы, что необходимо для образования суперспирали. Большая канавка согнута плавно, однако маленькая изогнута с резкими изгибами. Эти конформационные изменения объясняют, почему центральная часть нуклеосомной ДНК не связывается с регуляторными белками. Последние обычно связываются с терминальными участками коровой ДНК или с линкерной последовательностью.

ДНК располагается на поверхности нуклеосомы таким образом, что при удалении белков, вызывающих конформационные ограничения, образуется ~1 отрицательный супервиток. Однако длина ДНК на нуклеосоме соответствует ~1,67 супервитку (см. рис. 6.29). Это расхождение иногда называют парадоксом коэффициента зацепления.

Расхождение объясняется существованием различия между, в среднем, 10,17 пн на виток в нуклеосомной ДНК и 10,5 пн на виток в свободной ДНК. В нуклеосоме на 200 пн приходится $200/10,17 = 19,67$ витков. Когда ДНК высвобождается из нуклеосомы, получается $200/10,5 = 19,0$ витков. Менее плотно скрученная ДНК на нуклеосоме занимает -0,67 витка, что объясняет разницу между фактическим (-1,67) и измеренным (-1,0) числом супервитков. Фактически, некоторая часть деформации кручения в нуклеосомной ДНК расходуется на увеличение количества пн/виток; лишь оставшаяся часть воспринимается как суперспираль.

6.19 Организация октамера гистонов

Основные положения

- Октамер гистонов состоит из ядра, включающего тетрамер $H3_2-H4_2$, связанного с двумя димерами $H2A-H2B$
- Каждый гистон плотно переплетается со своими партнерами
- Все коровые гистоны имеют структурный мотив гистоновой складки
- N-терминальный конец гистона выходит из нуклеосомы

До сих пор мы рассматривали строение нуклеосомы с точки зрения организации ДНК на ее поверхности. Для того чтобы понять организацию белковой части нуклеосомы, мы должны знать, каким образом гистоны взаимодействуют друг с другом и с ДНК. Способны ли они к взаимодействию только в присутствии ДНК или могут независимо образовывать октамеры? Большая часть данных о межгистоновых взаимодействиях получена на основании исследований способности этих белков к образованию стабильных комплексов и из экспериментов по образованию белковых сшивок.



РИС. 6.40. В симметричной модели нуклеосомы тетрамер гистонов $H3_2-H4_2$ обладает формой ядра. Один димер $H2A-H2B$ виден сверху, второй находится снизу

Коровые гистоны образуют два типа комплексов. $H3$ и $H4$ образуют тетрамер ($H3_2-H4_2$). Гистоны $H2A$ и $H2B$ образуют различные комплексы, наиболее часто димеры ($H2A-H2B$).

Интakтные октамеры гистонов можно получить или экстрагируя их из хроматина, или при ассоциации концентрированных растворов белков *in vitro*, содержащих много солей. Октамер может диссоциировать с образованием гексамера, и $H2A-H2B$ димера гистонов. Это говорит о существовании в нуклеосоме центрального «ядра», содержащего тетрамер $H3_2-H4_2$. *In vitro* тетрамер участвует в организации ДНК в частицы, обладающие некоторыми свойствами коровых.

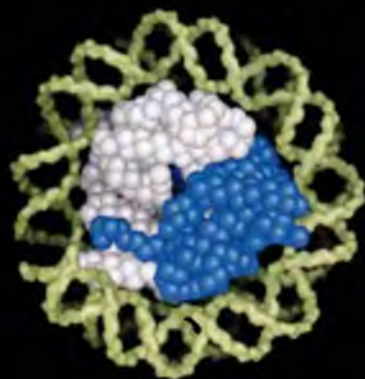
Эксперименты с применением сшивающих агентов показали, какие пары гистонов в нуклеосоме располагаются рядом. (Трудность интерпретации полученных данных состоит в том, что сшивается лишь небольшая часть белков, и поэтому следует с осторожностью экстраполировать эти данные на ядро нуклеосомы *in vivo*.) Полученные данные использовались для построения модели организации нуклеосомы. Схематически она представлена на РИС. 6.40.

Структурные исследования показывают, что изолированный октамер гистонов по форме напоминает коровую частицу. Это свидетельствует о том, что общая структура частицы задается в результате гистон-гистоновых взаимодействий. Расположение отдельных гистонов в октамере было установлено на основании их способности к взаимодействию друг с другом и экспериментов со сшивающими агентами.

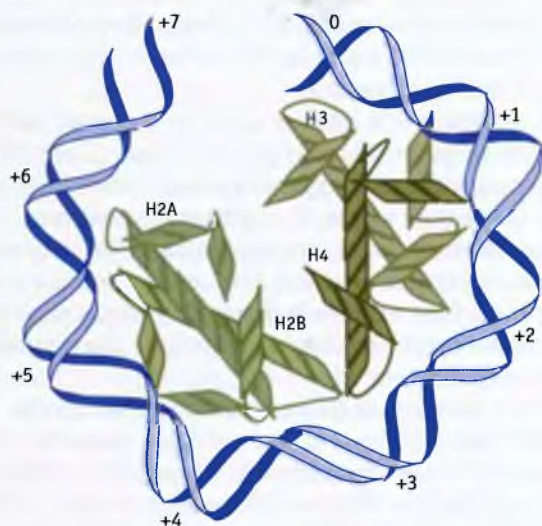
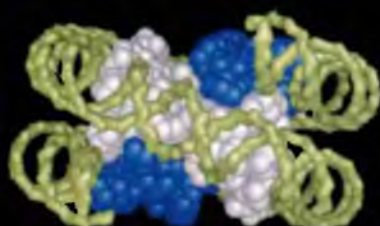
На основании анализа кристаллической структуры (с разрешением 3,1 Å) была предложена модель строения октамера гистонов (РИС. 6.41). Исследование направления отдельных полипептидных элементов кристаллической структуры предполагает, что гистоны не организованы в виде индивидуальных глобулярных белков, а взаимосвязаны со своими партнерами: $H3$ с $H4$, и $H2A$ с $H2B$. Таким об-

Гистоновые пары образуют «половину нуклеосомы»

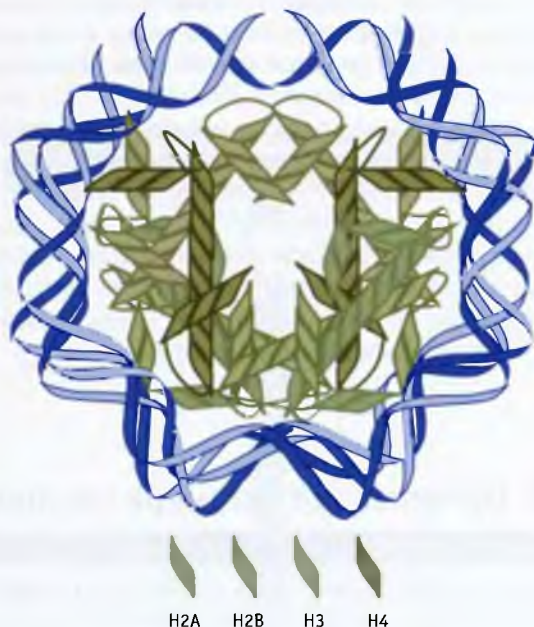
ДНК окружает
гистоновый октамер



ДНК дважды обертывается
вокруг октамера гистонов



При наложении второй гистоновой пары
выявляется симметричная организация нуклеосомы



Вид половины нуклеосомы сверху, показывающий расположение пар гистонов H3–H4 и H2A–H2B. При наложении второй половины можно видеть симметричную организацию нуклеосомы

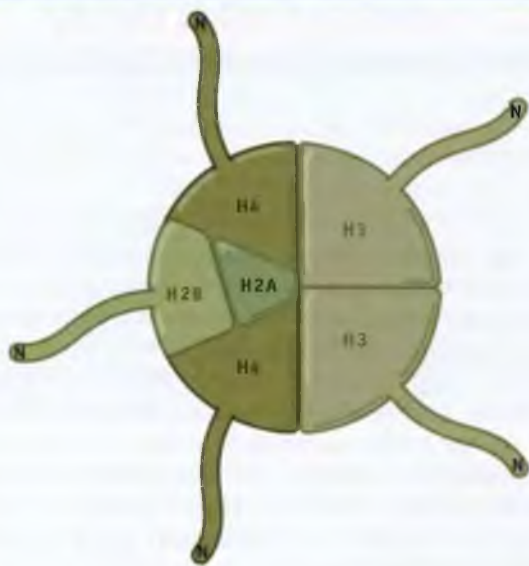
Рис. 6.41. Пространственная модель кристаллической структуры октамера коровых гистонов. Тетрамер $H3_2-H4_2$ выделен белым цветом, а $H2A-H2B$ димеры голубым. Вид сверху показывает только один из $H2A-H2B$ димеров, поскольку второй расположен снизу. ДНК выделена зеленым цветом. Фотография любезно предоставлена Е. Н. Мудрианакисом, Университет Дж. Гопкинса

разом, в модели отдельно выделены тетрамеры $H3_2-H4_2$ (белым цветом) и димеры $H2A-H2B$ (голубым цветом), и не показаны индивидуальные гистоны.

На верхнем рисунке в таком же ракурсе представлена модель, схематически изображенная на рис. 6.40. Тетрамер $H3_2-H4_2$ составляет диаметр октамера. Он обладает формой подковы. Пара $H2A-H2B$ представлена двумя димерами, но на рисунке показан один из них. Вид сбоку представлен в том же ракурсе, как и на рис. 6.29. На этом изображении можно четко видеть расположение тетрамера $H3_2-H4_2$ и двух димеров $H2A-H2B$. Белок образует некое подобие бобины, по поверхности которой проходит суперспиральная ДНК, делающая почти два полных витка вокруг нуклеосомы. Модель характеризуется осью симметрии второго порядка, расположенной перпендикулярно боковой плоскости.

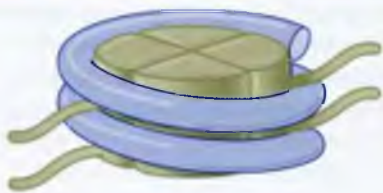
На Рис. 6.42 расположение гистонов представлено более подробно (кристаллическую структуру исследовали при разрешении 2,8 Å). На верхнем рисунке представ-

лено расположение молекулы гистона каждого типа по отношению к витку вокруг нуклеосомы (пронумерованы от 0 до +7). Все четыре коровых гистона имеют одинаковую структуру, в которой три α -спирали связаны двумя петлями. Такая структура называется **гистоновым фолд-доменом**. Эти регионы взаимодействуют между собой с образованием гетеродимеров серповидной формы; каждый гетеродимер связывается с 2,5 оборотами двойной спирали ДНК ($H2A-H2B$ связывается с $+3,5 \pm 6$;



Глобулярные участки молекул гистонов локализуются внутри гистонического октамера коровой частицы, однако расположение N-терминальных «хвостов», на которых располагаются сайты модификации, неизвестно и может быть не столь строго фиксировано

«Хвосты» гистонов выступают между витками ДНК



N-терминальные «хвосты» гистонов организованы беспорядочно и могут выходить между витками спирали ДНК, обвивающей коровые частицы

H3–H4 с $+0,5 \pm 3$, расположенными на периферии, как показано). В основном связывание происходит с фосфодиэфирным скелетом (что обусловлено необходимостью упаковки любой ДНК, независимо от нуклеотидного состава). Как можно видеть в нижней части рисунка, тетрамер H3₂–H4₂ образуется за счет взаимодействия между двумя субъединицами H3.

Каждый из коровых гистонов рассматривают как глобулярный белок, определяющий массу центрального белка нуклеосомы. Каждый гистон также обладает гибким N-концевым хвостом, способным модифицироваться, что играет важную роль в функциональной активности хроматина. Расположение хвостов, составляющих примерно четверть от массы белка, твердо не установлено, и на рисунке показано произвольно. Однако хвосты

гистонов H3 и H2B проходят между витками суперспирали ДНК и выходят за пределы нуклеосомы, как показано на рисунке. Под действием УФ между хвостами и ДНК образуются сшивки. При этом нуклеосомы образуют большее количество продуктов, чем коровые частицы. Это означает, что хвосты контактируют с линкерной ДНК. По-видимому, хвост гистона H4 контактирует с димером H2A–H2B, находящимся в соседней нуклеосоме. Это взаимодействие может служить важным фактором, обеспечивающим общую структуру нуклеосомы.

6.20 Организация нуклеосом в фибрилле хроматина

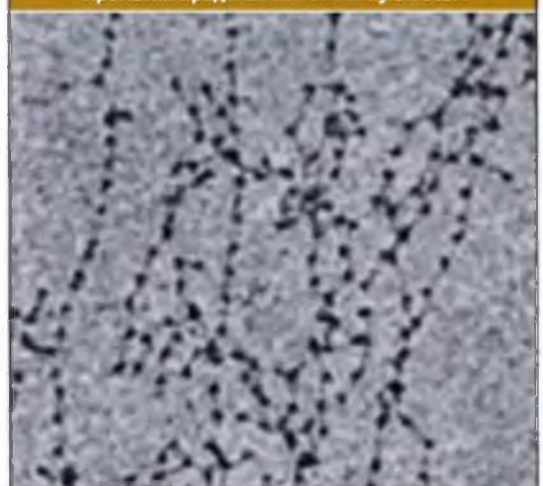
Основные положения

- 10-нм фибриллы хроматина образуются при раскручивании 30-нм фибрилл и состоят из цепочки нуклеосом
- 30-нм фибриллы содержат 6 нуклеосом на один виток и организованы в соленид
- Для образования 30-нм фибриллы требуется гистон H1

При исследовании хроматина в электронном микроскопе видны два типа фибрилл: размером 10 нм и 30 нм. Под размером подразумевается диаметр фибрилл (в действительности диаметр 30-нм фибриллы составляет ~25–30 нм).

10-нм фибрилла представляет собой непрерывную нить, содержащую нуклеосомы. В некоторых случаях, действительно, такие нити находятся в релаксированных областях хроматина, где нуклеосомы видны как цепочки бусин, нанизанных на нитку (рис. 6.45). Пре-

Хроматин представлен нитью нуклеосом



В частично релаксированной фибрилле хроматина 10-нм нить выглядит состоящей из цепочки нуклеосом. Фотография любезно предоставлена Барбарой А. Хемкало, Калифорнийский университет, Ирвайн

10-нм нить состоит из нуклеосом

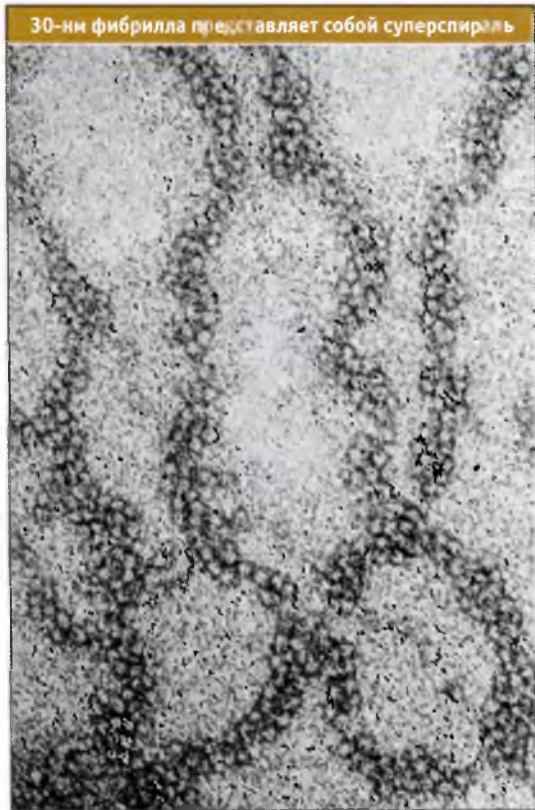


РИС. 6.46. 10-нм нить хроматина представлена непрерывной цепочкой нуклеосом

параты 10-нм фибрилл получают при низкой ионной силе, без участия гистона H1. Это означает, что образование фибриллы исключительно обусловлено функцией самих нуклеосом. Фибрилла выглядит как непрерывная нить, состоящая из нуклеосом (рис. 6.46). Остается неясным, существует такая структура *in vivo* или же она образуется вследствие раскручивания более крупной фибриллы при экстракции *in vitro*.

При исследовании хроматина в условиях более высокой ионной силы видны 30-нм фибриллы. Пример такой фибриллы представлен на рис. 6.47. Эта фибрилла служит основой структуры хроматина бо-

30-нм фибрилла представляет собой суперспираль



30-нм фибрилла обладает спиральной структурой. Фотография любезно предоставлена Барбарой А. Хемкало, Калифорнийский университет, Ирвайн

лее высокого порядка. На каждый виток фибриллы приходится ~6 нуклеосом, что соответствует коэффициенту упаковки порядка 40 (т. е. на каждый мкм фибриллы приходится 40 мкм ДНК). Для образования такой фибриллы необходимо присутствие гистона H1. 30-нм фибрилла является основным структурным компонентом как интерфазного хроматина, так и митотических хромосом.

Наиболее вероятным способом упаковки нуклеосом в фибрилле является соленоид, представляющий собой цилиндрическую структуру, состоящую из спирально закрученных нуклеосомных нитей. Соленоид может существовать в двух формах — одинарного соленоида, образованного одним рядом нуклеосом, и двойного, состоящего из двух рядов нуклеосом. На рис. 6.48 представлена модель двойного соленоида, предложенная на основании результатов, полученных с использованием сшивающих агентов. Модель характеризуется наличием двойного ряда нуклеосом в составе 30-нм фибриллы.

30-нм и 10-нм фибриллы способны к взаимным превращениям при изменении ионной силы. Это предполагает, что при повышении ионной силы и в присутствии гистона H1, 10-нм фибрилла способна закручиваться в 30-нм фибрилли.

Хотя для образования 30-нм фибриллы необходимо присутствие гистона H1, информация о его локализации противоречива. Легкость, с которой этот гистон экстрагируется из хроматина, по-видимому, свидетельствует о его локализации на поверхности суперспирализованной фибриллы. Однако данные, полученные при исследовании дифракции, и тот факт, что H1 гистон обнаруживается в составе 10-нм, а не 30-нм фибрилл, говорит скорее о его локализации внутри фибриллы.

30-нм фибрилла представляет собой двойной соленоид



РИС. 6.48. 30-нм фибрилла представляет собой спирализованную ленту, состоящую из двух параллельных рядов нуклеосом, закрученных в соленоид

6.21 Репродукция хроматина требует сборки нуклеосом

Основные положения

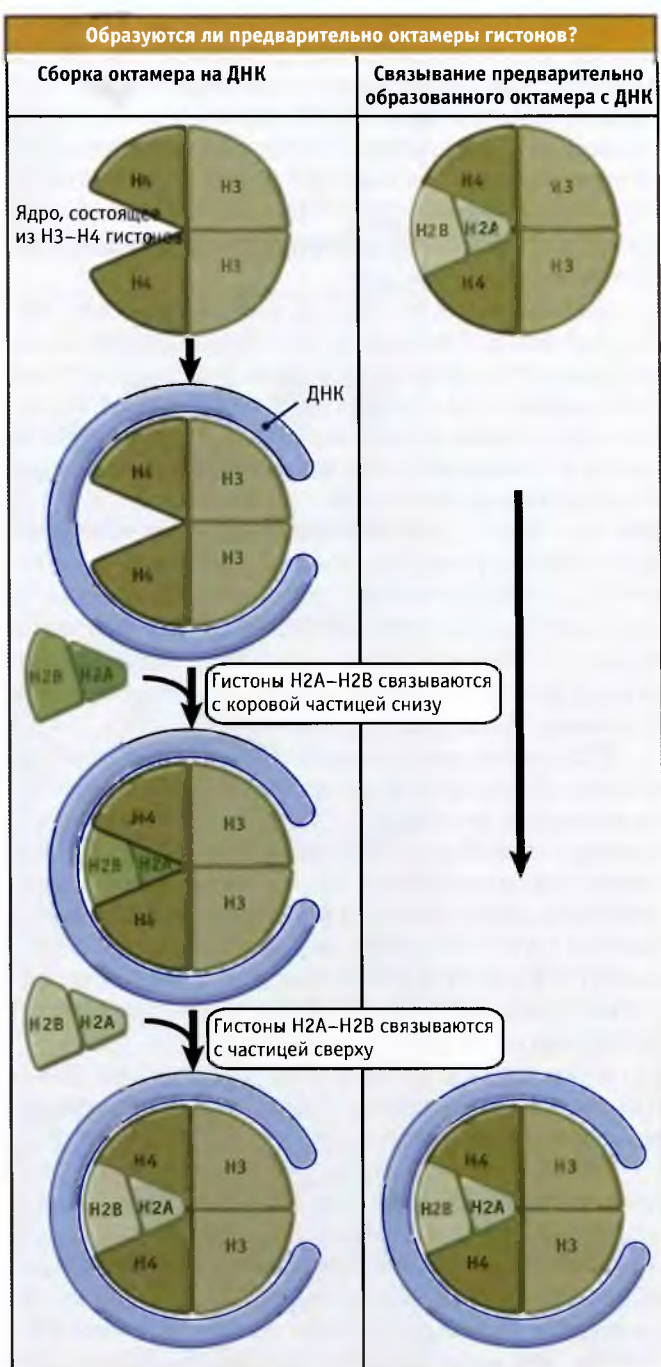
- При репликации не сохраняются октамеры гистонов, однако димеры H2A–H2B и тетрамеры H3₂–H4₂ сохраняются
- Существуют различные и независимые от репликации пути сборки нуклеосом при репликации
- Для облегчения процесса сборки нуклеосом требуются дополнительные белки
- CAF-1 представляет собой белок сборки, связанный с PCNA субъединицей реплицомы. Этот белок необходим для поддержания тетрамеров H3₂–H4₂ после репликации
- Для сборки, независимой от репликации, может использоваться другой белок сборки и вариантная форма гистона H3

При репликации происходит разделение цепей ДНК, и при этом структура нуклеосомы неизбежно должна нарушаться. Репликативная вилка обладает характерной структурой. Она более устойчива к микрококковой нуклеазе и при ферментативной обработке дает полосы, по размеру отличающиеся от ДНК нуклеосом. Область с такой измененной структурой находится в непосредственной близости от репликативной вилки. Это позволяет считать, что в репликации ДНК участвует крупный белковый комплекс, причем по мере его продвижения за ним довольно быстро реформируются нуклеосомы. Это иллюстрируется на микрофотографии (рис. 6.21), на которой показан участок недавно реплицированной ДНК, уже упакованный в нуклеосомы на обоих дочерних дуплексных сегментах.

Поэтому биохимический анализ и непосредственные наблюдения над репликативной вилкой позволяют считать, что нарушение структуры нуклеосом ограничено коротким участком, находящимся рядом с вилкой. При росте вилки нуклеосомы разрушаются, однако по мере продвижения вилки они очень быстро образуются на дочерних дуплексах. Фактически сборка нуклеосом прямо связана с реплицомой, где происходит репликация ДНК.



Реплицирующаяся ДНК сразу же включается в состав нуклеосом. Фотография любезно предоставлена Стивен Л. Мак-Найт, УТ Юго-западный Медицинский Центр



In vitro ДНК может или непосредственно взаимодействовать с интактным (сшитым) октамером гистонов, или связываться с H3₂–H4₂ тетрамером, после чего к комплексу добавляются H2A–H2B димеры гистонов

Каким образом гистоны связываются с ДНК, образуя нуклеосомы? Образуют ли гистоны вначале октамер белков, вокруг которого впоследствии оборачивается ДНК? Или же октамер собирается на ДНК из свободных гистонов? На рис. 6.21 показано, что, в зависимости от конкретных условий, *in vitro* могут использоваться две схемы сборки нуклеосом. Согласно первой схеме, с ДНК связывается уже сформированный октамер. Вто-

рая схема предполагает, что вначале образуются тетрамер $H3_2-H4_2$, к которому затем добавляются два димера $H2A-H2B$. Обе схемы имеют отношение к процессам, происходящим *in vivo*. Первая отражает способность хроматина к перестройке, которая обеспечивается движением октамера гистонов по ДНК (см. 6.28 *Ремоделирование хроматина представляет собой активный процесс*). Вторая схема соответствует событиям, происходящим при репликации.

Связыванию гистонов с ДНК способствуют дополнительные белки. Эти белки можно идентифицировать в экстрактах, участвующих в сборке гистонов и экзогенной ДНК в нуклеосомы. Дополнительные белки могут выполнять роль «молекулярных шаперонов», которые связываются с гистонами, чтобы контролировать связывание индивидуальных гистонов или их комплексов ($H3_2-H4_2$ или $H2A-H2B$) с ДНК. Это может оказаться необходимым, поскольку гистоны, являясь основными белками, вообще проявляют высокое сродство к ДНК. *При таком взаимодействии гистоны образуют нуклеосомы, минуя промежуточные продукты (т. е. не участвуя в образовании других компактных комплексов, которые могут возникать при их связывании с ДНК).*

Предложена система, позволяющая воспроизвести процесс сборки нуклеосом при репликации. Эта система использует экстракты клеток человека, которые реплицируют ДНК SV40 и осуществляют сборку хроматина. Сборка преимущественно происходит на реплицирующейся ДНК. Неообходимо присутствие дополнительного фактора, CAF-1, состоящего из > 5 субъединиц, с общей массой 238 кДа. Этот фактор попадает в область репликативной вилки под действием PCNA, который является процессивным фактором ДНК полимеразы. Таким образом обеспечивается связь между репликацией ДНК и сборкой нуклеосом, причем сборка происходит сразу же после завершения репликации.

CAF-1 стехиометрически связывается с вновь синтезированными $H3$ и $H4$. Это позволяет предполагать, что при сборке новых нуклеосом вначале образуется $H3_2-H4_2$ тетрамер, к которому затем добавляются $H2A-H2B$ димеры. Образующиеся *in vitro* нуклеосомы характеризуются длиной повтора 200 пн, хотя и не имеют $H1$ гистона. Это позволяет предполагать, что надлежащее расположение нуклеосом может обеспечиваться и без участия гистона $H1$.

При репродукции хроматина происходит репликация релаксированной ДНК, уже связанной с нуклеосомами. При этом образуются два дочерних дуплекса. Что происходит в этот момент с предсуществующими нуклеосомами? Диссоциирует ли октамер гистонов на свободные белки, которые потом утилизируются, или же гистоны остаются связанными? Ответить на этот вопрос можно, выращивая клетки в среде, содержащей тяжелые (меченные дейтерием) аминокислоты, и переводя их на среду с легкими аминокислотами непосредственно перед репликацией. При последующем использовании сшивающих агентов можно выяснить, входят ли в белки октамера только один или оба типа аминокислот. Полу-

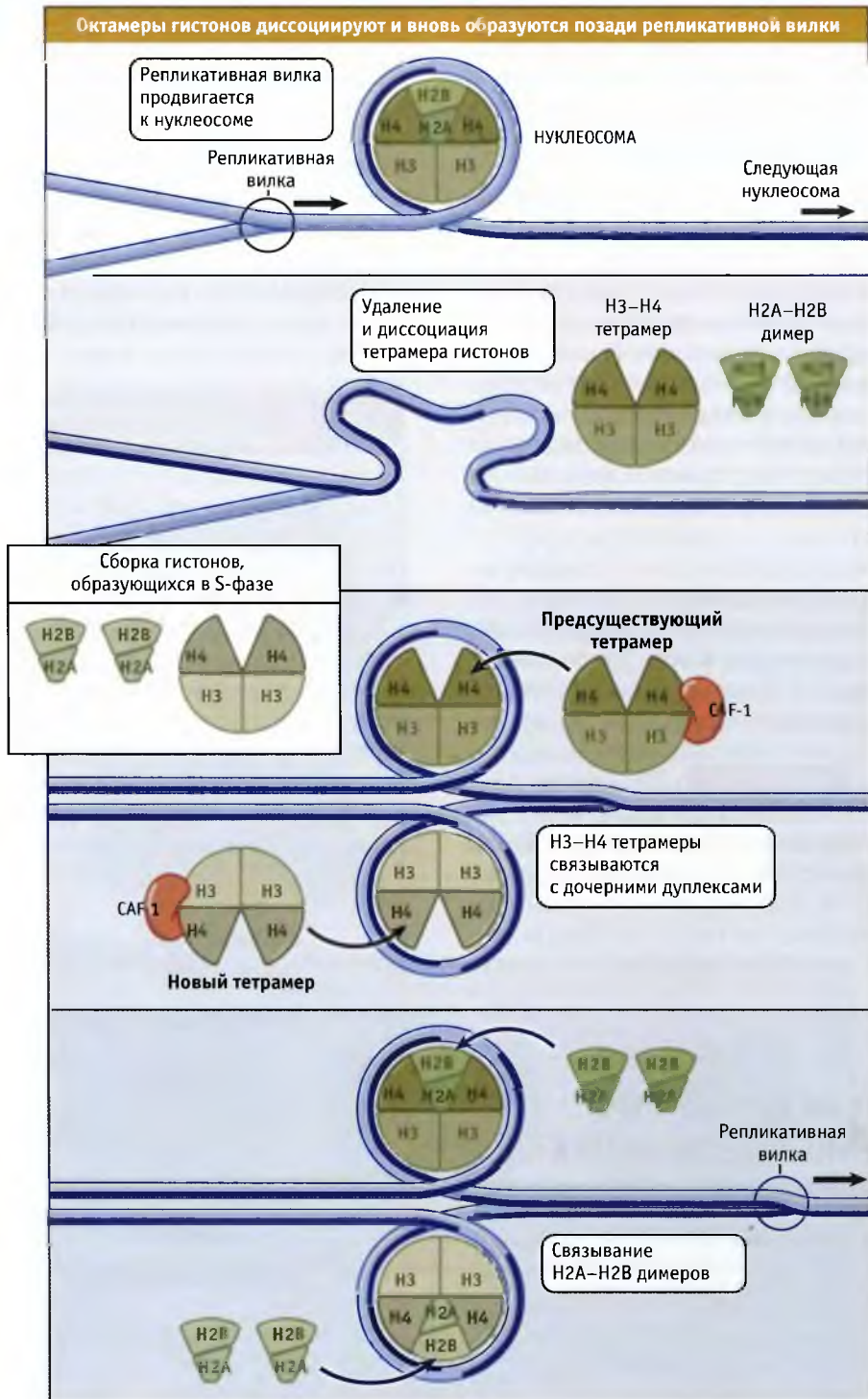
ченные результаты позволяют предполагать, что перед репликацией происходит смешивание гистонов, синтезированных до репликации, с синтезированными при репликации гистонами. Это говорит в пользу по крайней мере частичной диссоциации и реассоциации компонентов октамера.

Процесс сборки и разборки нуклеосом трудно охарактеризовать детально, однако на рис. 6.23 представлена наша рабочая модель. Репликативная вилка смещает октамер гистонов, который диссоциирует на $H3_2-H4_2$ тетрамер и $H2A-H2B$ димер. Эти «старые» тетрамеры и димеры поступают в общий пул, который также содержит «новые» тетрамеры и димеры, собранные из новосинтезированных гистонов. Нуклеосомы собираются на расстоянии примерно 600 пн за репликативной вилкой. Сборка начинается, когда $H3_2-H4_2$ тетрамеры связываются с каждым из дочерних дуплексов, при участии дополнительного белка CAF-1. Затем два димера $H2A-H2B$ связываются с каждым $H3_2-H4_2$ тетрамером и образуют полный октамер гистонов. Сборка тетрамеров и димеров носит случайный характер по отношению к утилизации «старых» и «новых» субъединиц. Это объясняет, почему в октамере смешаны «старые» и «новые» гистоны. Возможно, что нуклеосомы разрушаются и собираются аналогичным образом и при транскрипции (см. 6.24 *Организованы ли транскрибирующиеся гены в нуклеосомы?*).

В клетках эукариот, находящихся в S-фазе (т. е. в периоде репликации ДНК), дупликация хроматина требует синтеза большого количества гистонов для упаковки всего генома — фактически должно быть синтезировано такое же количество гистонов, которое уже содержится в нуклеосомах. Синтез гистоновой иРНК находится под контролем клеточного цикла и сильно увеличивается в S-фазе. Схема сборки хроматина в S-фазе из равной смеси старых и новых гистонов носит название пути, связанного с репликацией (RC).

Другой путь называется независимым от репликации (RI) и используется при сборке нуклеосом в остальные фазы клеточного цикла, вне синтеза ДНК. Использование этого пути становится необходимым при возникновении повреждений в ДНК или при смещении нуклеосом в результате транскрипции. Очевидно, в этом случае процесс сборки должен отличаться от пути RC, поскольку он не связан с репликативным аппаратом. Одна из наиболее интересных особенностей пути, независимого от репликации, заключается в том, что в нем участвуют различные варианты некоторых гистонов из числа тех, которые используются при репликации.

$H3.3$ вариант отличается от консервативного гистона $H3$ положением четырех аминокислот. В дифференцирующихся клетках, в которых не происходит репликации ДНК, этот вариант гистона постепенно замещает гистон $H3$. Это происходит в результате сборки новых октамеров гистонов взамен тех, которые в силу разных причин были удалены из структуры хроматина. Механизм использования $H3.3$ в независимом от репликации пути в двух исследованных случаях оказался различным.



При движении репликативной вилки октамеры гистонов удаляются с ДНК. Они диссоциируют на тетрамеры Н3–Н4 и димеры Н2А–Н2В. Вновь синтезированные гистоны собираются в Н3–Н4 тетрамеры и Н2А–Н2В димеры. Предсуществующие и вновь образованные тетрамеры и димеры собираются с помощью белка CAF-1 случайным образом; при этом новые нуклеосомы образуются непосредственно за репликативной вилкой

Использование гистонов организмом простейшего *Tetrahymena* определяется исключительно их доступностью. Гистон Н3 синтезируется только в клеточном цикле, вариант этого гистона — только в неделящихся

клетках. Однако у *Drosophila* существует механизм, обеспечивающий использование Н3.3 по схеме RI. Новые нуклеосомы, содержащие Н3.3, собираются на месте транскрипции, предположительно замещая нуклеосомы,

смененные РНК полимеразой. В процессе сборки гистоны H3 и H3.3 распознаются по структуре, и H3 в сборке не участвует. Наоборот, при сборке по пути RC используются оба варианта гистона H3 (хотя H3.3 доступен в гораздо меньших количествах, чем H3, и поэтому входит только в небольшое количество нуклеосом).

По-видимому, белок CAF-1 не участвует в сборке по схеме RI. (Также в таких организмах, как дрожжи и *Arabidopsis*, ген, кодирующий этот белок, не играет существенной роли, что позволяет предполагать существование альтернативных процессов сборки по схеме RC.) Белок, возможно участвующий в сборке по пути RI, называется HIRA. Исключение этого белка из бесклеточной системы сборки нуклеосом приводит к ингибированию их образования на нереплицирующейся, но не на реплицирующейся ДНК. Это является свидетельством того, что оба пути действительно используют различные механизмы сборки хроматина.

Сборка нуклеосом, содержащих альтернативный вариант гистона H3, происходит также на центромерах. (см. 6.31 *Образование гетерохроматина зависит от взаимодействия белков с гистонами*). В ходе репликативной фазы клеточного цикла ДНК центромеры реплицируются рано (в противоположность окружающим гетерохроматиновым последовательностям, которые реплицируются позже; см. MBIO:6-0001). Включение H3 в центромерную область подавляется, и вместо него у высших эукариот включается белок, называемый CENP-A (у *Drosophila* он называется Cid, а у дрожжей Cse4p). Это происходит с участием RI-пути сборки, что связано с блокировкой пути RC в течение короткого промежутка времени, пока реплицируется ДНК центромеры.

6.22 Занимают ли нуклеосомы определенные места на ДНК?

Основные положения

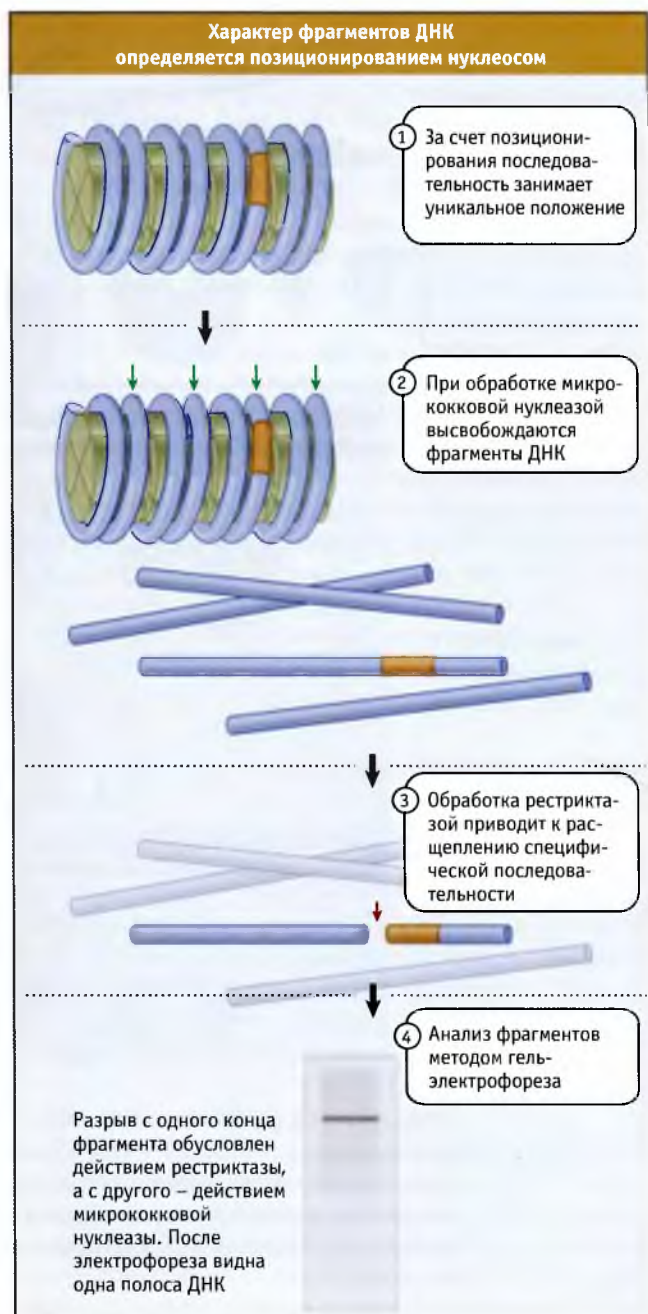
- Нуклеосомы могут располагаться в определенных местах. Это происходит вследствие особенностей локальной структуры ДНК либо белков, взаимодействующих с определенными последовательностями
- Наиболее частая причина позиционирования нуклеосом заключается в установлении границы с участием белков, связывающихся с ДНК
- Позиционирование определяет, какие регионы ДНК находятся в линкерной области, и какой стороной она располагается на поверхности нуклеосом

Известно, что *in vitro* нуклеосомы организуются независимо от первичной структуры ДНК, однако это не означает, что такая же ситуация имеет место *in vivo*. Всегда ли *in vivo* определенная последовательность в ДНК находится на определенном месте относительно расположения нуклеосомы? Или же нуклеосомы расположены на ДНК случайным образом, и определенная последовательность может находиться в любом ее участ-

ке, например в коровой части в одной копии генома и в линкерной, в другой его копии?

Для ответа на этот вопрос необходимо установить положение определенной последовательности в ДНК. точнее, необходимо установить положение определенного участка ДНК по отношению к нуклеосоме. иллюстрирует принцип используемого метода.

Предположим, что последовательность ДНК организована в нуклеосомы в только одной специфической конфигурации таким образом, что каждый сайт ДНК всегда локализован на нуклеосоме в специфическом по-



За счет позиционирования нуклеосом сайты рестрикции занимают уникальное положение по отношению к линкерным участкам, расщепляемым микрококковой нуклеазой

ложении. Такой тип организации называется **позиционированием** (или иногда фазированием) нуклеосомы. В серии позиционированных нуклеосом линкерные области ДНК включают уникальные сайты.

Рассмотрим последовательность, находящуюся в пределах одной нуклеосомы. При обработке микрококковой нуклеазой высвобождаются мономерные фрагменты, в том числе фрагмент, содержащий специфическую последовательность. Если этот фрагмент обработать рестриктазой, которая имеет только один сайт узнавания, то он должен разрезаться по специфическому месту. При этом образуются два фрагмента определенной длины.

Фрагменты ДНК, полученные после переваривания микрококковой нуклеазой и рестриктазой, фракционируют методом электрофореза в геле. Для идентификации соответствующего фрагмента в «двойном переваре» используется проба, представляющая собой последовательность на одном конце сайта рестрикции. Такая техника носит название метода **гибридизационной концевой метки**.

Таким образом, наличие одной полосы свидетельствует о том, что найдено положение сайта рестрикции по отношению к концу нуклеосомной ДНК (по месту ее атаки микрококковой нуклеазой), и нуклеосома позиционирована на определенной последовательности ДНК.

Что происходит, если нуклеосомы *не занимают* определенного положения? В этом случае в каждой копии генома линкеры содержат различные последовательности ДНК. Таким образом, каждый раз сайт рестрикции

находится на разном месте; фактически он может занимать любое местоположение относительно концов мономерной нуклеосомной ДНК. Как показывает, что в результате двойного разрыва в ДНК образуется набор фрагментов, варьирующих по длине от наименьшего детектируемого (~20 пн) до полного фрагмента мономерной ДНК.

Позиционирование нуклеосом может осуществляться одним из двух способов:

- Внутренний: *каждая нуклеосома специфически формируется в определенной позиции нуклеотидной последовательности*. Это меняет нашу точку зрения на нуклеосому, как на субъединицу, способную образовываться при взаимодействии октамера гистонов с любой последовательностью ДНК.
- Внешний: *первая нуклеосома предпочтительно собирается в определенной позиции региона*. Предпочтительная исходная точка для позиционирования нуклеосомы задается регионом, из которого исключаются нуклеосомы. Регион исключения обеспечивает *границу*, которая ограничивает позиции, доступные для соседних нуклеосом. Затем последовательно может собираться серия нуклеосом, которая характеризуется определенной длиной повтора.

В настоящее время стало очевидным, что расположение октамеров гистонов на ДНК не является случайным по отношению к ее первичной структуре. В одних случаях позиционирование носит внутреннюю природу и опре-

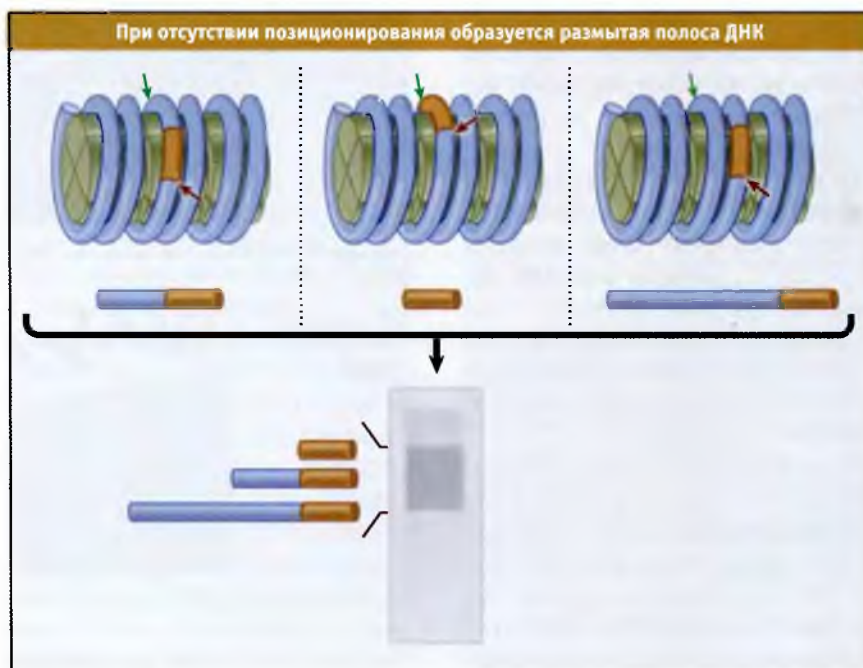


Рис. 6.22. При отсутствии позиционирования нуклеосом сайты рестрикции в различных копиях генома располагаются на разных местах. При обработке ДНК рестриктазой, атакующей специфические последовательности (выделены красным), и микрококковой нуклеазой, действующей на межнуклеосомные сайты (выделены зеленым), образуется смесь разных по размеру фрагментов



Рис. 6.54. Трансляционное позиционирование отражает линейное положение ДНК относительно октамера гистонов. Смещение ДНК на 10 пн приводит к смещению последовательностей, находящихся в линкерных областях. Однако это не влечет за собой изменений ориентации сторон ДНК, т. е. та сторона ДНК, которая примыкала к гистонам, сохраняет свое положение

деляется структурными характеристиками ДНК. В других случаях оно является внешним и зависит от взаимодействия других белков с ДНК и/или с гистонами.

На позиционирование октамеров гистонов влияют некоторые особенности структуры ДНК. Молекуле ДНК присуща тенденция сгибаться преимущественно в одном направлении. Так, АТ-богатые участки локализованы таким образом, что малая бороздка находится со стороны октамера гистонов, а ГЦ-богатые участки расположены так, что она оказывается снаружи. Длинные участки дА-дТ (> 8 пн) не позиционируются в центральном суперспиральном витке вокруг коровой частицы. Пока еще не представляется возможным учесть все структурные особенности ДНК и предсказать расположение определенной ее последовательности по отношению к нуклеосоме. Также могут играть роль последовательности, которые ответственны за экстремальные процессы, например такие, как исключение нуклеосом, в результате чего могут проявляться граничные эффекты.

Обычно нуклеосомы позиционируются поблизости от границы региона. Если в их строении наблюдается некоторая вариабельность, например длина линкера изменяется, скажем, на 10 пн, то, начиная с первой определенной нуклеосомы, находящейся на границе, специфичность их дальнейшего расположения снижается. В этом случае можно ожидать, что позиционирование будет поддерживаться только для нуклеосом, расположенных относительно близко к границе.

Расположение ДНК в нуклеосоме можно описать с помощью двух моделей. На рис. 6.54 показана модель **трансляционного позиционирования**, которое описывает положение ДНК относительно границы нуклеосомы. В особенности это относится к последовательностям, находящимся в линкерной области. Сдвиг ДНК на 10 пн вызывает образование следующего витка в линкерной области. Таким образом, трансляционное позиционирование определяет, какие регионы ДНК являются более доступными (по крайней мере по отношению к микрококковой нуклеазе).

Поскольку ДНК расположена на поверхности октамера гистонов, одна из сторон любой последова-

тельности закрыта белком, а другая остается открытой. В зависимости от расположения на нуклеосоме, сайт ДНК, который должен узнаваться регуляторным белком, может быть доступным или недоступным. Поэтому, важную роль играет точное расположение октамера гистонов по отношению к последовательности ДНК. На рис. 6.55 изображена схема **ротационного позиционирования** двойной спирали по от-

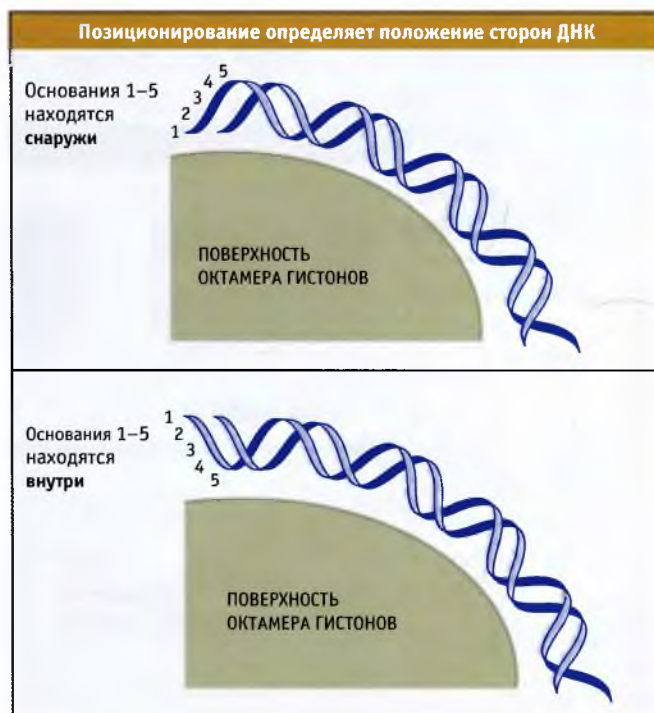


Рис. 6.55. Ротационное позиционирование отражает положение сторон ДНК относительно поверхности нуклеосомы. Любое перемещение, которое отличается от шага спирали (около 10,2 пн на виток), приводит к смещению ДНК относительно поверхности гистонного кора. Последовательности, расположенные внутри, в большей степени защищены от нуклеаз, чем расположенные снаружи

ношению к поверхности коровой частицы. Если ДНК сдвигается на неполный оборот (вообразите, что ДНК вращается по отношению к белковой поверхности), то изменяется степень выхода последовательности за пределы коровой частицы.

Трансляционное и ротационное позиционирование может играть важную роль в обеспечении доступности ДНК. К числу наиболее полно охарактеризованных случаев позиционирования относится специфическое размещение нуклеосом на промоторных участках. Трансляционное позиционирование и/или исключение нуклеосом из определенной последовательности может оказаться необходимым для образования транскрипционного комплекса. Некоторые регуляторные факторы могут связываться с ДНК лишь в участках, свободных от коровых частиц, поскольку доступность ДНК должна быть максимальной. Это создает границу для трансляционного позиционирования. В других случаях регуляторные факторы могут связываться с ДНК на поверхности нуклеосомы, однако ротационное позиционирование важно для открытия той стороны ДНК, на которой расположены соответствующие контактные точки. В **МВЮ:6-0002** обсуждается связь между нуклеосомной организацией и транскрипцией.

6.23 Домены определяют области, содержащие активные гены

Основные положения

- Домен ДНК, содержащий активные гены, характеризуется повышенной чувствительностью к деградации под действием ДНКазы I

Область генома, содержащая активно-транскрибируемые гены, может обладать измененной структурой. Изменения структуры предшествуют и отличаются от нарушений структуры нуклеосом, которые характерны для активного продвижения РНК-полимеразы.

Одним из показателей изменения структуры транскрибируемого хроматина служит его повышенная чувствительность к деградации ДНКазой I. Чувствительность к этому ферменту служит признаком существования хромосомного домена, области измененной структуры, которая включает по крайней мере одну активную единицу транскрипции и которая иногда распространяется дальше. (Заметим, что использование термина домен не предполагает наличия обязательной взаимосвязи со структурными доменами, которые представлены петлями хроматина или хромосом.)

Когда хроматин переваривается ДНКазой I, он деградирует с образованием кислоторастворимого материала (небольших по размеру фрагментов ДНК). Степень переваривания можно определить по количеству ДНК, переходящей в кислоторастворимое состояние. *Как только 10% тотальной ДНК переходит в кислотораствори-*

мую форму, теряется более 50% ДНК-активных генов. Это свидетельствует о преимущественной деградации ДНК-активных генов.

За поведением индивидуальных генов можно наблюдать, оценивая количество остающейся ДНК, способной гибридизоваться с соответствующим зондом. Схематически метод представлен на РИС. 6.5б. Основной принцип состоит в том, что утрата определенной полосы указывает на деградацию соответствующего участка ДНК под действием фермента.

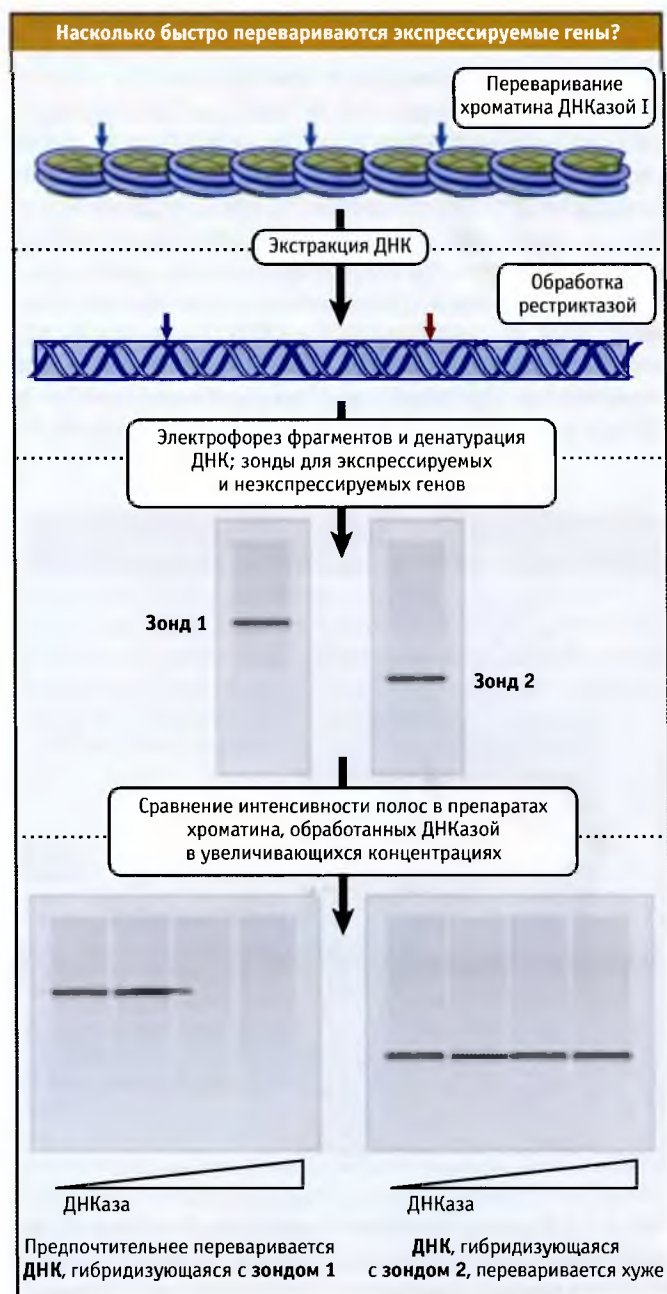


РИС. 6.5б. Чувствительность к ДНКазе I можно измерить, определяя скорость убыли материала, гибридизующегося с определенным зондом

На рис. 6.57 показано, что происходит с генами β -глобина и овальбумина в хроматине, экстрагированном из цыплячьих эритроцитов (в которых происходит экспрессия глобиновых генов, а овальбуминовый ген неактивен). Фрагменты, представляющие собой β -глобиновые гены, быстро разрушаются, в то время как соответствующие участки овальбуминового гена почти не деградируют. (Фактически овальбуминовый ген переваривается с такой же скоростью, как и основная масса ДНК.)

Таким образом, основная масса хроматина относительно устойчива к ДНКазе I и содержит неактивные гены (а также и другие последовательности). *Ген приобретает относительную чувствительность к нуклеазе в клетках тех тканей, в которых происходит его экспрессия.*

Является ли повышенная чувствительность к нуклеазе характерной только для активно-экспрессируемых, например глобиновых, или же для всех активных генов? Эксперименты с использованием тотальной иРНК клетки показывают, что все активные гены, независимо от их представленности в геноме, чувствительны к ДНКазе I. (Однако отмечаются различия в степени чувствительности.) Поскольку в транскрипции редко экспрессируемых генов в каждый момент времени, по-видимому, участвует немного молекул РНК-полимеразы, это дает возможность предполагать, что чувствительность к ДНКазе I не является следствием протекания процесса

транскрипции, а является особенностью *самых транскрибируемых генов.*

Каков размер чувствительной области? Его можно определить, используя набор зондов, соответствующих фланкирующим участкам, а также самой единице транскрипции. Чувствительная область всегда простирается на весь транскрибируемый участок; дополнительные сайты, достигающие нескольких тпн по сторонам чувствительного участка, могут проявлять промежуточную чувствительность (вероятно, вследствие эффекта расширения).

Критическая особенность, присущая домену, состоит в том, что область повышенной чувствительности к ДНКазе I распространяется на значительное расстояние. Часто считается, что регуляция генной активности определяется событиями, происходящими в отдельных сайтах ДНК, — например, инициацией транскрипции в промоторной зоне. Даже если это действительно имеет место, такая регуляция должна определяться или сопровождаться более обширными изменениями структуры хроматина. В этом состоит различие между про- и эукариотическими клетками.

6.24 Организованы ли транскрибирующиеся гены в нуклеосомы?

Основные положения

- При обработке микрококковой нуклеазой транскрибирующихся и неактивных генов обнаруживаются нуклеосомы
- Некоторые высокоактивные гены представляют собой исключение и не обладают нуклеосомной структурой

Попытки наблюдать процесс транскрипции генов привели к противоречивым результатам. Соответствующие примеры представлены на двух последующих рисунках.

Можно видеть, что интенсивно транскрибируемый хроматин слишком релаксирован для того, чтобы организоваться в нуклеосомы. В транскрибируемых генах, кодирующих синтез рРНК, РНК-полимераза упакована настолько плотно, что ДНК почти не видна (рис. 6.58). Мы не можем непосредственно измерить длину транскриптов рРНК из-за того, что они связаны с белками и имеют компактную структуру, однако мы знаем (на основании данных по первичной структуре рРНК), какой длины должны быть эти транскрипты. Величина транскрибируемого сегмента ДНК, измеренная как длина «ствола рождественской елки», составляет ~85% длины рРНК. Это означает, что ДНК почти полностью релаксирована.

В то же время из клеток, инфицированных вирусом SV40, можно выделить транскрипционные комплексы мини-хромосом вируса. Они содержат обычные гистоновые компоненты и обладают структурой, напомина-

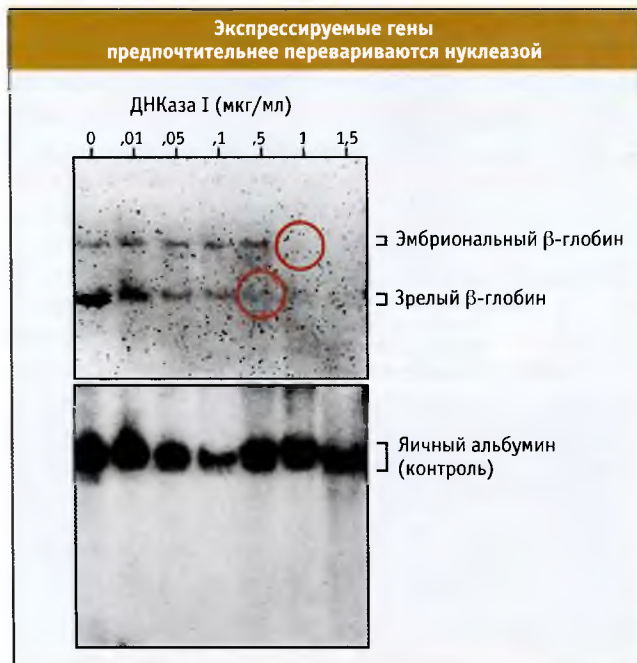


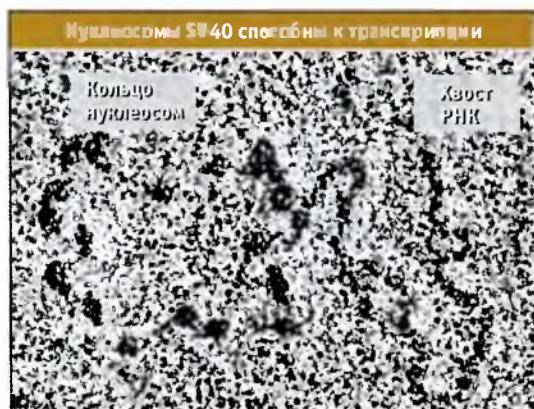
Рис. 6.57. В зрелых эритроидных клетках ген β -глобина проявляет высокую чувствительность к ДНКазе I. Ген эмбрионального β -глобина обладает ограниченной чувствительностью к ферменту (вероятно, из-за эффекта рассеяния). В то же время препараты яичного альбумина нечувствительны к ДНКазе. Фотография любезно предоставлена Гарольдом Вайнтраубом и Марком Грудным, Центр раковых исследований Фреда Хатчинсона

Участки транскрипции перемежаются со спейсерными участками



Протяженные участки транскрипционных единиц рДНК перемежаются с несколько менее растянутыми участками нетранскрибируемых спейсеров. Фотография любезно предоставлена Викторией Фоу, Ин Чу и Чарлзом Лэрдом

ющей бусины. Можно видеть, что от мини-хромосом отвечают цепи РНК (рис. 6.50). Это не противоречит точке зрения о том, что транскрипция происходит, когда ДНК SV40 организована в нуклеосомы. Конечно, минихромосомы SV40 транскрибируются менее интенсивно, чем гены рРНК.



Мини-хромосома SV40 может транскрибироваться. Фотография любезно предоставлена Пьером Шамбоном, Колледж де Франс. Воспроизведено из J. Mol. Bio. vol. 131, Gariglio, P., et al., The template of the Isolated..., p. 131. © 1979, с разрешения Elsevier

При транскрипции ДНК разворачивается, и в отдельных участках хроматина фибрилла может релаксировать. Прежде всего возникает предположение о том, что для этих процессов необходимо дополнительное пространство. Особенности строения полигенных хромосом и хромосом типа ламповых щеток, описанные ранее, свидетельствуют о том, что с экспрессией генов связана более сложная структурная организация хроматина.

Первый вопрос, который касается структуры активных генов, состоит в том, сохраняется ли нуклеосомная организация хроматина при транскрипции ДНК. Если происходит смещение октамеров гистонов, то остаются ли они каким-то образом связанными с транскрибируемой ДНК?

Для того чтобы ответить на этот вопрос, хроматин переваривают микрококковой нуклеазой и затем проводят гибридизацию с использованием зондов к какому-либо специфическому гену или группе генов для того, чтобы определить, присутствуют ли в ожидаемых количествах его фрагменты в обычной 200-пн лесенке. Заключение, к которому можно прийти на основании этих экспериментов, носит ограниченный характер, но является важным. *Транскрибируемые гены содержат нуклеосомы в тех же количествах, что и нетранскрибируемые гены.* Таким образом, для того, чтобы транскрибироваться, гены не обязательно должны принимать некую альтернативную форму организации.

Однако, поскольку транскрибируемый ген в каждый данный момент времени, вероятно, использует только одну РНК-полимеразу, остается неизвестным, что происходит на местах, занятых ферментом. По-видимому, они сохраняют нуклеосомную структуру; более вероятно, что по мере движения РНК-полимеразы по ДНК нуклеосомы перемещаются, однако после прохождения фермента сразу же возвращаются на место.

6.25 При транскрипции октамеры гистонов удаляются

Основные положения

- При транскрипции в модельных системах РНК-полимераза удаляет октамеры гистонов, однако после прохождения полимеразы они вновь связываются с ДНК
- При транскрипции гена происходит реорганизация нуклеосом

Эксперименты, предпринятые с целью выяснить, может ли РНК-полимераза осуществлять транскрипцию ДНК в составе нуклеосомы, показали, что в результате транскрипции происходит удаление октамера гистонов. На рис. 6.60 представлены события, происходящие, когда РНК-полимераза фага Т7 *in vitro* транскрибирует короткий участок ДНК, содержащий октамер гистонов. Коровая частица остается связанной с ДНК, но переме-

1 Нуклеосома собирается на определенном участке ДНК

ПРОМОТОР

ТЕРМИНАТОР

2 РНК-полимераза связывается с промоторным участком

РНК-полимераза

3 Транскрипция ДНК РНК-полимеразой до терминаторного участка

4 Нуклеосома находится на новом месте

10 пн наступает пауза, позволяющая предполагать, что структура петли накладывает определенные ограничения на вращение вокруг каждого витка ДНК. Когда полимераз достигнет середины нуклеосомы (следующие основания, которые должны добавиться, находятся на оси диадной симметрии), пауз не возникает, и фермент начинает продвигаться быстрее. Это говорит о том, что середина нуклеосомы является точкой, к которой смещается октамер (вероятно, потому, что положительная суперспирализация достигла некоторого критического уровня, при котором октамер вытесняется с ДНК). Это ослабляет напряжения в ДНК, существующие на пути полимеразы, и снимает препятствия к движению фермента. Октамер гистонов изменяет свое положение на ДНК, не теряя с ней контакта.

Высвобождается ли октамер гистонов в виде интактной частицы? В результате сшивок белков октамера не возникает препятствий для транскрипции. Транскрипция может происходить даже в том случае, когда между коровыми гистонами присутствуют сшивки. Это говорит

Вытесненный октамер никогда не покидает ДНК

РНК-полимераза

РНК-полимераза продвигается вперед и вытесняет октамер

Замкнутая петля ДНК

Октамер

Напряжение, возникающее впереди РНК-полимеразы, снова вытесняет октамер

Октамер занимает свое место за РНК-полимеразой

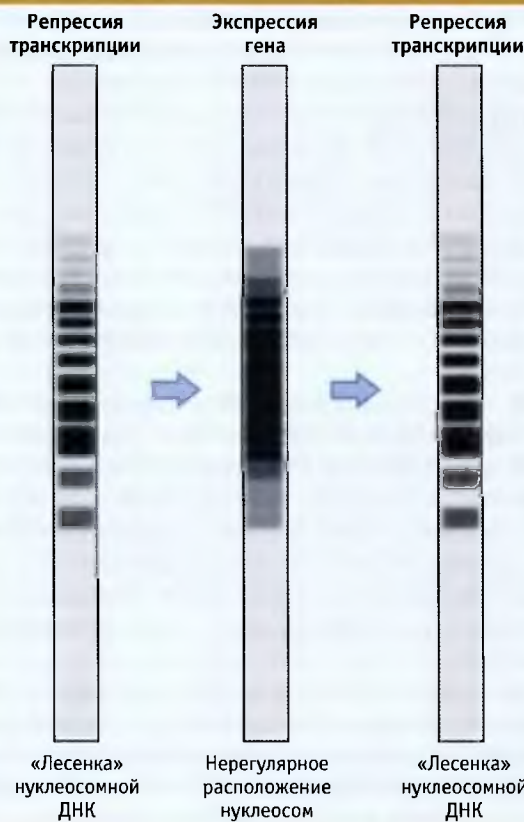
РИС. 6.60. Схема эксперимента по исследованию влияния транскрипции на нуклеосомы, показывающая, что октамер гистонов покидает ДНК и связывается с другим ее участком

щается на другой участок. Наиболее вероятно, что коровая частица повторно связывается с той же молекулой ДНК, с которой она была связана раньше.

На РИС. 6.61 представлена модель, описывающая движение полимеразы. По мере того как фермент входит в пределы нуклеосомы, ДНК отходит от коровой частицы, но полимераз достигнет точки, при которой нить ДНК направляется в обратную сторону и повторно присоединяется к ней, замыкая область. По мере дальнейшего продвижения полимеразы ДНК раскручивается, и в петле образуются положительные супервитки. Это может иметь серьезные последствия, поскольку замкнутая петля содержит только ~80 пн, так что каждая пара оснований, которую проходит полимераз, является существенным добавлением к суперспирализации. Фактически полимераз легко проходит первые 30 пн в составе нуклеосомы. Затем она начинает продвигаться медленнее и как будто испытывает возрастающие препятствия. Через каждые

РИС. 6.61. По мере своего продвижения РНК-полимераза вытесняет октамер гистонов. ДНК снова начинает сворачиваться и связывается (с полимеразой или с октамером), образуя замкнутую петлю. По мере продвижения полимеразы, она генерирует впереди положительные супервитки. Супервитки вытесняют октамер гистонов, который сохраняет контакт с ДНК и/или полимеразой, и занимает свое место за РНК-полимеразой

В результате экспрессии генов происходят изменения в организации нуклеосом



В гене URA3, до его транскрипции, нуклеосомы определенным образом позиционированы. При индукции транскрипции позиции нуклеосом становятся случайными. Когда происходит репрессия транскрипции, нуклеосомы снова позиционируются

о том, что транскрипция не требует диссоциации октамера на составляющие гистоны и вообще каких-либо существенных изменений его структуры. Однако при добавлении в систему гистона H1 скорость транскрипции быстро снижается. Это позволяет прийти к двум заключениям: октамер гистонов (оставаясь на своем месте или смещаясь) функционирует как интактная единица; и может оказаться необходимым удалить H1 из активного хроматина или каким-то образом изменить его взаимодействие с другими компонентами.

Таким образом, небольшая по размеру молекула РНК-полимеразы вызывает перемещение нуклеосомы, которая после прохождения фермента формируется снова. Конечно, в ядре эукариотической клетки ситуация более сложная. РНК-полимераза по размеру гораздо больше, и цепочка нуклеосом создает помехи на пути продвижения фермента. Для преодоления этих трудностей необходимо участие дополнительных факторов.

При транскрипции меняется организация нуклеосом. На [рис. 6.26](#) показано, что происходит при транскрипции дрожжевого гена URA3, находящегося под контролем индуцибельного промотора. Позициониро-

вание нуклеосом определяли, используя микрококковую нуклеазу, расщепляющую ДНК по сайтам рестрикции на 5'-конце гена. Исходно в гене, на значительном расстоянии от промотора, присутствует нуклеосомная структура; в 3'-области их позиционирование теряется. Когда ген экспрессируется, то при электрофорезе наблюдается мазок ДНК. Таким образом, хотя нуклеосомы присутствуют, они не организованы. Это позволяет предположить, что транскрипция нарушает их позиционирование. При репрессии гена, в пределах 10 мин начинает проявляться позиционирование нуклеосом (хотя и не полное). Этот результат позволяет сделать интересный вывод о том, что позиционирование нуклеосом не зависит от репликации.

Согласно общепринятой модели, РНК-полимераза по мере продвижения вдоль ДНК смещает октамеры гистонов. Если ДНК позади молекулы полимеразы оказывается доступной, то октамер с ней связывается. (Повидимому, октамер никогда не теряет контакт с ДНК. Остается только догадываться, каким образом он сохраняет его, не раскручиваясь и не теряя своих компонентов по мере продвижения по ДНК. Вероятно, создание контакта с РНК-полимеразой обеспечивает «двойной проход» октамера.) Если ДНК недоступна, например потому, что непосредственно за одной полимеразой следует другая, то октамер постоянно смещается, и ДНК постоянно находится в растянутой конфигурации.

6.26 Удаление нуклеосом и их последующая сборка требуют участия специфических факторов

Основные положения

- Для удаления октамеров при транскрипции с участием РНК-полимеразы и повторной сборки гистонов в нуклеосомы необходимо участие дополнительных факторов

Удаление нуклеосом с ДНК является ключевым моментом всех стадий транскрипции. Лучше всего этот процесс исследован на стадии инициации. Активные промоторы обладают сайтами с высокой чувствительностью к ДНКазе, поскольку октамеры гистонов были удалены с ДНК (см. [6.27 Сайты с повышенной чувствительностью к ДНКазе меняют структуру хроматина](#)). Удаление октамеров требует реконструкции комплексов, которые набираются, комплектуются с помощью транскрипционных факторов и которые используют энергию, поставляемую при гидролизе АТФ для того, чтобы изменить структуру хроматина (см. [МВ10:6-0003](#)). Это означает, что РНК-полимераза начинает синтез на коротком отрезке ДНК, свободном от нуклеосом. Для того чтобы синтез РНК продолжался дальше, октамеры гистонов должны быть удалены. За-

тем, чтобы не допустить появления не закрытой белком ДНК, октамеры должны собраться вновь в ходе транскрипции.

Транскрипция РНК-полимеразой II *in vitro* требует участия белка, который называется FACT и который по свойствам напоминает фактор элонгации транскрипции. (FACT представляет собой аббревиатуру от «facili-»

тates chromatin transcription») и не является частью РНК-полимеразы, хотя специфическим образом связывается с ней в фазе элонгации.) Этот фактор состоит из двух субъединиц, имеющих общую структуру у всех эукариот. Он связан с хроматином активных генов.

При добавлении FACT к изолированным нуклеосомам они теряют димеры H2A–H2B. При транскрипции *in vitro* фактор превращает нуклеосомы в «гексасомы», у которых отсутствуют димеры H2A–H2B. Это позволяет считать FACT частью механизма, ответственного за удаление октамеров при транскрипции. Белок также может участвовать в сборке нуклеосом после транскрипции, поскольку он способствует их образованию из коровых гистонов.

На рис. 6.27 представлена модель, описывающая удаление H2A–H2B из нуклеосомы под действием FACT, происходящее впереди РНК-полимеразы, и затем добавление их к нуклеосоме, формирующейся позади фермента. Для завершения процесса могут понадобиться и другие факторы. Также FACT необходим для осуществления других процессов, при которых происходит удаление нуклеосом, например таких, как репликация и репарация ДНК.

Для поддержания структуры хроматина в других транскрибируемых регионах требуются другие факторы. Вероятно, они также принимают участие в процессах разборки-сборки нуклеосом, но мы не располагаем более подробной информацией об их функциях.

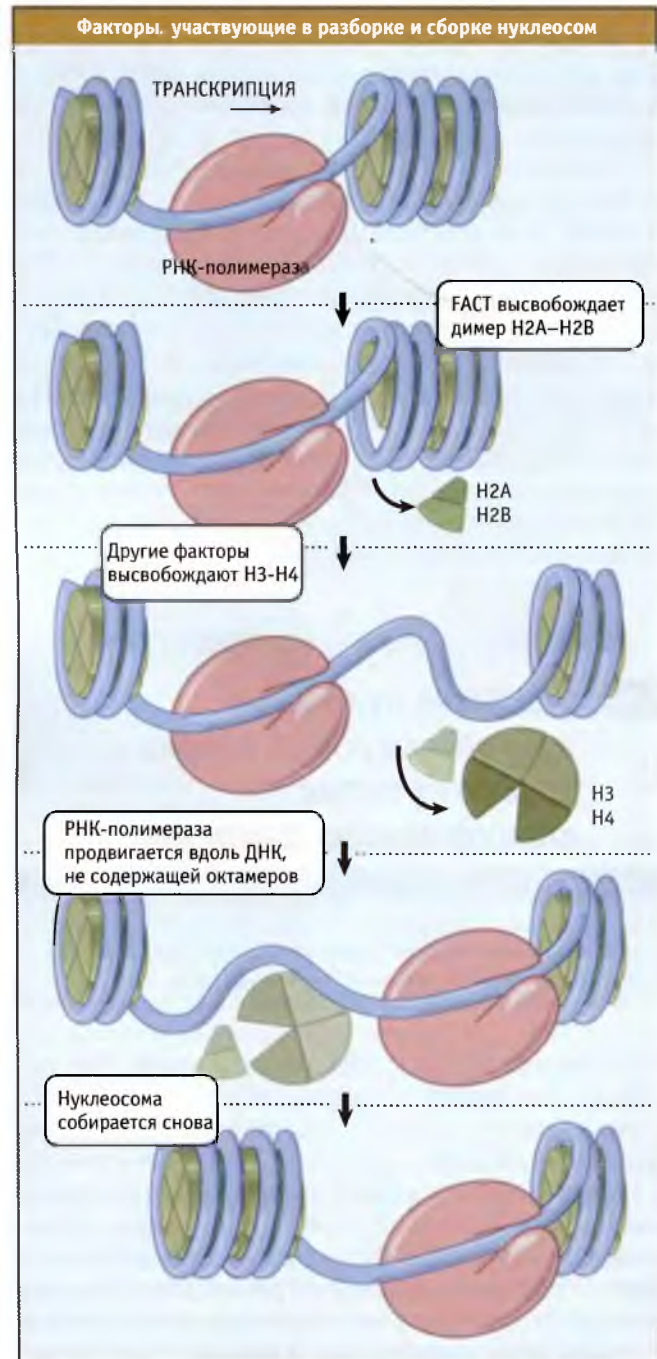
6.27 Сайты с повышенной чувствительностью к ДНКазе меняют структуру хроматина

Основные положения

- В промоторных областях экспрессируемых генов находятся сайты, обладающие повышенной чувствительностью к нуклеазе
- Они возникают при связывании с ДНК факторов транскрипции, которые удаляют октамеры гистонов

Наряду с изменениями общего характера, которые происходят в активных или потенциально активных областях хроматина, модификации структуры происходят на специфических сайтах, связанных с инициацией транскрипции или со специфическими структурными переходами в ДНК. Эти изменения были впервые обнаружены при переваривании ДНК ферментом ДНКазой I, взятым в очень низкой концентрации.

При обработке хроматина ДНКазой I вначале в специфических **гиперчувствительных сайтах** двойной спирали образуются разрывы. Поскольку чувствительность к ДНКазе I отражает доступность ДНК в хроматине, мы считаем, что эти сайты отражают области хроматина, в которых ДНК особенно подвержена атаке фермента, поскольку она не организована в обычную нуклео-



Разборка октамеров гистонов, необходимая для удаления нуклеосом, происходит до начала транскрипции. После окончания транскрипции октамеры собираются снова. Процесс разборки, по-видимому, начинается с высвобождения димера H2A–H2B гистонов

сонную структуру. Обычно гиперчувствительные сайты в 100 раз более чувствительны к ДНКазе I, чем основной хроматин. Эти сайты также чувствительны к действию других нуклеаз и химических агентов.

Гиперчувствительные сайты возникают за счет (тканеспецифических) изменений структуры хроматина. Их локализацию можно установить методом гибридизационной концевой метки, который мы обсуждали выше в связи с установлением позиционирования нуклеосом. Процедура схематически представлена на рис. 6.27. Под действием ДНКазы I происходит расщепление по гиперчувствительному сайту. После этого измеряется расстояние до другого конца фрагмента, который образуется под действием рестриктазы.

Большинство гиперчувствительных сайтов связаны с генной экспрессией. Каждый активный ген обладает одним или несколькими чувствительными сайтами, расположенными в области промотора. *Большинство гиперчувствительных сайтов находится в хроматине только тех клеток, в которых происходит экспрессия генов.* Если гены не проявляют активность, гиперчувствительные сайты не регистрируются. 5'-гиперчувствительные сайты образуются перед началом транскрипции, и первичная структура ДНК в этих областях связана с экспрессией генов. Это можно продемонстрировать, исследуя соответствующие мутанты.

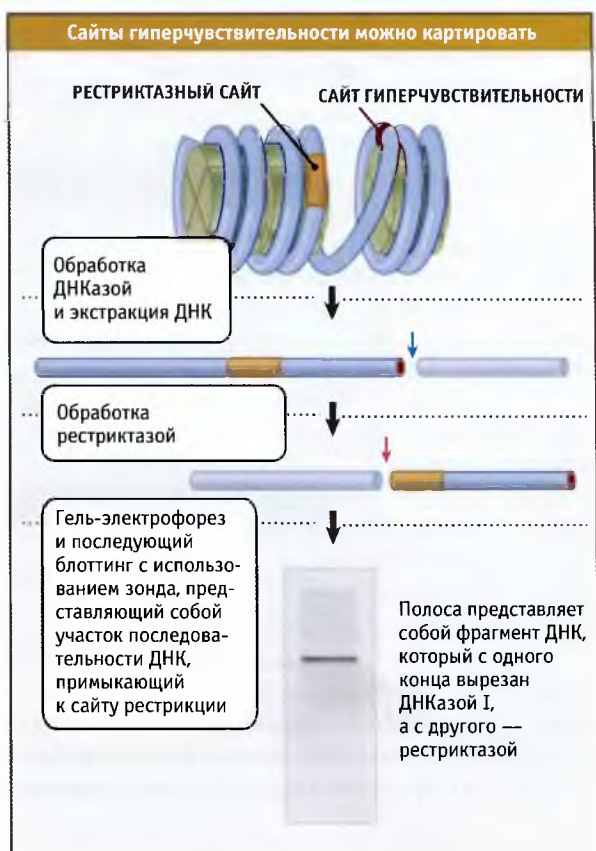
Наиболее полно исследован сайт чувствительности к нуклеазе, расположенный на мини-хромосоме SV40. Короткий фрагмент, расположенный у участка начала репликации, выше позднего промотора транскрипции, преимущественно расщепляется ДНКазой I, микрококковой нуклеазой и другими нуклеазами (включая рестриктазы).

Мини-хромосому SV40 можно исследовать в электронном микроскопе. Примерно у 20% исследованных препаратов отмечается «брешь» в нуклеосомной организации хроматина (см. рис. 6.28). По краям этого промежутка, составляющего в длину ~120 нм (около 350 пн), расположены нуклеосомы, и он представляет собой область, чувствительную к нуклеазной атаке. Это доказывает, что повышенная чувствительность области хроматина к нуклеазам связана с отсутствием в ней нуклеосом.

На протяжении сайта может наблюдаться различная чувствительность к нуклеазам. На рис. 6.29 представлена карта двух сайтов гиперчувствительности.

В пределах промежутка, порядка 300 пн, в SV40 находятся два гиперчувствительных сайта к ДНКазе I и «защищенная» область. По-видимому, в этой области с ДНК связаны (негистоновые) белки. Первичная структура ДНК, соответствующая этой области, связана с элементами, необходимыми для функционирования промотора.

Сайты β-глобинового промотора проявляют повышенную чувствительность к ряду ферментов: ДНКазе I, ДНКазе II и к микрококковой нуклеазе. Места атаки ферментов располагаются в пределах одной области на некоторых расстояниях друг от друга. Так, в транскрибиру-



Метод непрямого концевого мечения позволяет определять расстояние между сайтами гиперчувствительности к ДНКазе I и к рестриктазе. За счет существования специфического сайта чувствительности к ДНКазе I образуется фрагмент ДНК, длина которого соответствует расстоянию между сайтом гиперчувствительности к ДНКазе I и сайтом рестрикции



Нуклеосомная организация мини-хромосомы SV40 характеризуется существованием промежутка. Фотография любезно предоставлена Моше Янив, Институт Пастера

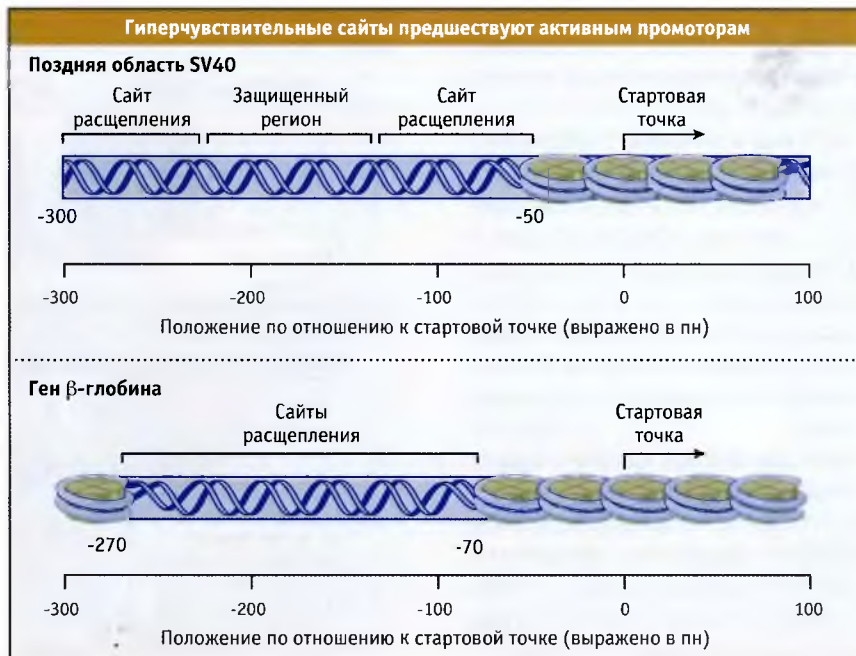


Рис. 6.55. В промежутке минихромосомы SV40 находятся гиперчувствительные сайты, чувствительные области, а также защищенный регион ДНК. Гиперчувствительный сайт в гене β-глобина цыпленка содержит сайты чувствительности к нескольким нуклеазам

емом гене нуклеазы преимущественно атакуют область протяженностью от -70 до -270 пн.

Какова структура гиперчувствительной области? Ее доступность к нуклеазам указывает, что она не защищена октамером гистонов, однако это не свидетельствует о том, что она вообще не содержит белков. Нуклеазы атакуют участок свободной ДНК. Каким образом ДНК может лишиться нуклеосом? Мы предполагаем, что гиперчувствительные сайты образуются при связывании специфических регуляторных белков с ДНК, которые исключают нуклеосомы. Действительно, связывание таких белков, вероятно, служит причиной существования защищенных областей в пределах гиперчувствительного сайта.

Белки, участвующие в образовании гиперчувствительных сайтов, вероятно, относятся к различным регуляторным факторам, поскольку эти сайты обнаруживаются в пределах промоторов, а также прочих регуляторных элементов: в участке начала репликации, в центромере и в прочих местах. В ряде случаев они локализованы в участках с более сложной организацией хроматина. Гиперчувствительный сайт может ограничивать область позиционированных нуклеосом. Гиперчувствительные сайты, связанные с транскрипцией, могут образовываться при связывании транскрипционных факторов с промоторами, чем достигается доступность последних для РНК-полимеразы (см. **МВ10:6-0004**).

6.28 Ремоделирование хроматина представляет собой активный процесс

Основные положения

- Структура хроматина меняется с участием комплексов ремоделирования, использующих энергию гидролиза АТФ
- SWI/SNF, RSC и NURF представляют собой большие комплексы, которые характеризуются наличием общих субъединиц
- Сам по себе комплекс ремоделирования не обладает специфичностью по отношению к определенному сайту, однако сборка его должна проходить с участием компонентов транскрипционного аппарата
- Комплексы ремоделирования собираются на промоторах под действием активаторов, специфичных по отношению к определенной нуклеотидной последовательности
- После связывания комплекса ремоделирования с хроматином, фактор может высвободиться

Геном клетки характеризуется нуклеосомной организацией, однако если промоторная область содержит нуклеосомы, то инициации транскрипции обычно не происходит. При этом гистоны функционируют как репрессоры транскрипции (такое представление известно довольно давно). Процесс активации гена требует изменений в структуре хроматина: существенный момент состоит в том, каким образом аппарат транскрипции получает доступ к ДНК промоторной области.

Способность гена к экспрессии зависит как от локальной структуры хроматина (в промоторном сайте),

так и от структуры окружающей области. Структура регулируется за счет местных процессов активации или же изменений, затрагивающих более обширную область хромосомы. К числу наиболее локальных относятся изменения в пределах индивидуального гена, когда изменения в структуре и организации нуклеосом происходят в непосредственной близости от промотора. Более обширные изменения могут затрагивать столь большие регионы, как целая хромосома.

Изменения, затрагивающие большие регионы, контролируют генную экспрессию. Для обозначения зарепрессированного гена в какой-либо области хромосомы используют термин **молчащий ген**. Под гетерохроматином понимают большие участки хромосом, под микроскопом характеризующиеся более компактной структурой. Молчащие гены и гетерохроматин характеризуются общей особенностью: в обоих случаях с хроматином связаны дополнительные белки, которые прямо или косвенно препятствуют факторам транскрипции и РНК-полимеразе активировать промоторы в определенной области.

Изменения того или иного промотора контролируют транскрипцию определенного гена. Эти изменения могут оказывать или активирующее, или репрессирующее действие.

Изменения локальной структуры хроматина представляют собой составную часть процесса контроля генной экспрессии. Гены могут существовать в одном из двух структурных состояний. Гены находятся в «активном» состоянии только в клетках, в которых они экспрессируются. Изменения их структуры предшествуют транскрипции и указывают на то, что ген является «транскрибируемым». Это позволяет предполагать, что приобретение геном «активной» структуры должно быть первым шагом на пути его экспрессии. Активные гены находятся в доменах эухроматина, обладающих повышенной чувствительностью к нуклеазам (см. 6.23 *Домены определяют области, содержащие активные гены*). Гиперчувствительные сайты создаются на промоторах до момента активации гена (см. 6.27 *Сайты с повышенной чувствительностью к ДНКазе меняют структуру хроматина*).

Между инициацией транскрипции и структурой хроматина существует тесная и постоянная связь. Некоторые активаторы процесса транскрипции непосредственно модифицируют гистоны; в особенности с активацией генов связан процесс их ацетилирования. Напротив, некоторые репрессоры транскрипции деацетилируют гистоны. Таким образом, экспрессия генов контролируется структурным состоянием гистонов поблизости от промотора. Это может представлять собой часть механизма, посредством которого ген поддерживается в активном или неактивном состоянии.

Механизм поддержания локальных участков хроматина в неактивном (молчащем) состоянии связан с механизмом репрессии индивидуального промотора. Белки, ответственные за образование гетерохроматина, действуют на хроматин через гистоны, и модификация гистонов может быть важным этапом его образования.

Суммарный процесс реализации изменений структуры хроматина называется **ремоделированием хроматина**. Он включает в себя механизмы удаления гистонов, которые зависят от поступления энергии. Для удаления гистонов из хроматина необходимо разрушение многих белок-белковых и ДНК-белковых связей. Это не так просто: для диссоциации этих связей требуется энергия. На рис. 6 представлен принцип динамического ремоделирования хроматина с участием фактора, гидролизующего АТФ. Когда из хроматина высвобождается октамер гистонов, с ДНК могут связываться другие белки (в данном случае факторы транскрипции и РНК-полимераза).

На рис. 6.68 суммированы типы изменений, происходящих при ремоделировании хроматина, которые могут быть охарактеризованы *in vitro*:

- Октамеры гистонов могут продвигаться по ДНК, изменяя соотношение между нуклеиновой кислотой и белком. Это приводит к изменению положения определенных последовательностей ДНК на поверхности нуклеосомы.
- Расстояние между октамерами гистонов может изменяться, что приводит к изменению положения определенных последовательностей по отношению к белку.

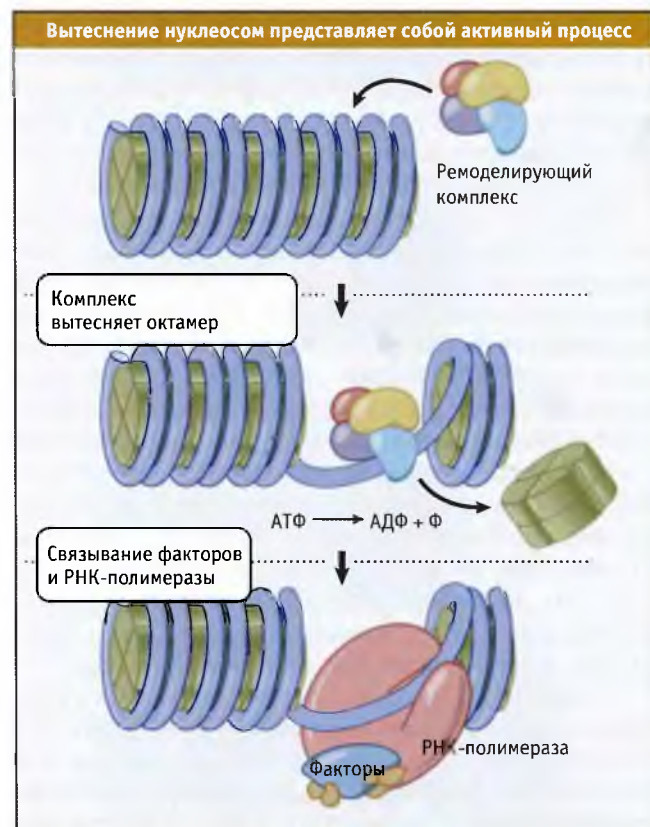


рис. 6.67. Динамическая модель транскрипции хроматина основывается на существовании факторов, способных использовать энергию гидролиза АТФ для вытеснения нуклеосом с участков специфических последовательностей ДНК



Рис. 6.68. Ремоделирующий комплекс может вызывать скольжение нуклеосом вдоль ДНК, вытеснять нуклеосомы или изменять расстояние между ними

- Наиболее радикальные изменения состоят в том, что октамеры гистонов могут полностью удаляться с ДНК, образуя участки, не содержащие нуклеосом.

Наиболее часто ремоделирование хроматина происходит при изменении организации нуклеосом в области промотора транскрибируемого гена. Это необходимо для обеспечения доступа аппарата транскрипции к промотору. Однако ремоделирование хроматина также необходимо для обеспечения протекания других процессов, таких как репарация повреждений в ДНК.

Наиболее часто при ремоделировании удаляется один или более октамеров гистонов. Это может быть обнаружено по изменениям характера деградации ДНК хроматина под действием микрококковой нуклеазы: наблюдается утрата сайтов, защищенных от расщепления. Часто при этом возникают сайты, характеризующиеся повышенной чувствительностью к действию ДНКазы I. (см. 6.27 *Сайты с повышенной чувствительностью к ДНКазе меняют структуру хроматина*). Иногда наблюдаются менее выраженные изменения, например касающиеся положения отдельной нуклеосомы; это можно определить по утрате лесенки через 10 пн, которая образуется после обработки ДНКазы I. Таким образом, изменения в структуре хроматина варьируют от изменения положения нуклеосом до полного их удаления.

Ремоделирование хроматина осуществляется с участием больших комплексов, которые используют АТФ в качестве источника энергии, необходимой для осуществления этого процесса. Центральным компонентом комплекса является субъединица АТФазы. Обычно комплексы классифицируют в соответствии с типом этой субъединицы — комплексы с близким типом обычно причисляют к одному типу (обычно они содержат также другие общие субъединицы). В таблице на Рис. 6.69 даны названия этих субъединиц. Два основных типа комплек-

сов представлены SWI/SNF и ISW (ISW заменяет SWI). Дрожжи содержат два комплекса каждого типа. Комплексы обоих типов также находятся у дрозофилы и человека. Каждый тип комплекса может проявлять различную активность при ремоделировании хроматина.

SWI/SNF представляет собой первый из идентифицированных комплексов, участвующих в ремоделировании хроматина. В его названии отражен факт, что многие субъединицы кодируются генами, идентифицированными в экспериментах на клетках *S. cerevisiae* с помощью мутаций SWI и SNF. Эти мутации генетически взаимодействуют с мутациями в генах, кодирующих компоненты хроматина. Это гены SIN1 и SIN2, кодирующие негистоновый белок и гистон H3 соответственно. Гены SWI и SNF требуются для экспрессии различных индивидуальных локусов (включая ~120 генов или 2% генома *S. cerevisiae*). Для экспрессии этих локусов может оказаться необходимым, чтобы комплекс SWI/SNF обеспечил ремоделирование хроматина в области соответствующих промоторов.

Существует несколько типов ремоделирующих хроматин комплексов			
Тип комплекса	SWI/SNF	ISW	Прочие
Дрожжи	SWI/SNF RSC	ISW1 ISW2	
Плодовая мушка	dSWI/SNF (Brahma)	NURF CHRAC ACF	
Человек	hSWI/SNF	RSF hACF/WCFR hCHRAC	NuRD
Лягушка			Mi-2

Рис. 6.69. Ремоделирующие комплексы подразделяются на типы в зависимости от природы АТФазных субъединиц

В экспериментах *in vitro* SWI/SNF проявляет каталитическое действие, и в дрожжевой клетке содержится только ~150 копий комплексов. Все гены, кодирующие субъединицы SWI/SNF, не являются абсолютно необходимыми, что позволяет предполагать, что у дрожжей должны существовать другие пути ремоделирования хроматина. Комплекс RSC представлен большим количеством копий и, вероятно, является более необходимым. Он действует на ~700 локусов-мишеней.

Комплексы SWI/SNF могут ремоделировать хроматин *in vitro* или без потери всех гистонов, или с удалением их октамеров. Для обоих процессов характерно общее промежуточное состояние, при котором структура нуклеосомы — мишени меняется, приводя или к повторному образованию (ремоделированию) нуклеосомы на той же ДНК, или к перемещению октамера гистонов на другую молекулу ДНК. Комплекс SWI/SNF меняет чувствительность нуклеосомной ДНК к ДНКазе I и изменяет ДНК-белковые контакты, которые сохраняются после ее высвобождения из нуклеосом. Субъединица SWI2 представляет собой АТФазу, которая обеспечивает энергией процесс ремоделирования, осуществляемый с помощью SWI/SNF.

Между ДНК и октамером гистонов существует много точек связывания — по результатам исследования кристаллической структуры их насчитывается 14. Для того чтобы октамер сместился на новую позицию или же полностью потерял связь с ДНК, должны разорваться связи во всех точках контакта ДНК с белком. Каким образом это происходит? Некоторые механизмы можно исключить, поскольку мы знаем, что при ремоделировании одонитевая ДНК не образуется (и комплексы не обладают хеликазной активностью). Согласно современному представлению, комплексы, относящиеся к классам SWI и ISW, используют энергию гидролиза АТФ для раскручивания ДНК на поверхности нуклеосомы. Некоторые косвенные данные свидетельствуют о том, что при этом создается механическое усилие, которое позволяет небольшому участку ДНК отсоединиться от поверхности и занять новую позицию.

Одним из важных процессов, катализируемых комплексами ремоделирования, является скольжение нуклеосом. Сначала оказалось, что комплекс группы ISW изменяет положение нуклеосомы, но не вызывает отрыва коровой частицы от ДНК. Это достигается за счет скольжения, при котором октамер перемещается вдоль ДНК. Удаление N-терминального участка гистона H4 предотвращает скольжение, однако мы достоверно не знаем, каким образом эта часть молекулы гистона участвует в перемещении. Комплексы SWI/SNF обладают такими же свойствами; процесс блокируется при создании барьера на ДНК. Это позволяет считать, что мы имеем дело с реакцией скольжения, при которой октамер гистонов более или менее непрерывно движется вдоль ДНК, не теряя с ней контакта.

Одна из загадок функционирования комплекса SWI/SNF заключается в его размере. Комплекс состоит из 11 субъединиц и обладает суммарной молекулярной массой ~2 × 10⁶. Он должен мешать функционированию РНК-полимеразы и нуклеосом. Кроме того, непонятно, каким

образом все компоненты комплекса взаимодействуют с ДНК, которая удерживается на поверхности нуклеосомы. Однако обнаружен транскрипционный комплекс, обладающий полной активностью, который называется РНК-полимераза II холофермент. Он содержит саму РНК-полимеразу, все TFII факторы, за исключением TBP и TFIIA, и комплекс SWI/SNF, который связан с CTD концевым участком молекулы полимеразы. Фактически препараты холофермента могут содержать весь комплекс SWI/SNF. Это позволяет предполагать, что ремоделирование хроматина и узнавание промоторов являются скоординированными процессами и осуществляются с участием одного комплекса.

Каким образом комплексы присоединяются к определенным сайтам хроматина при ремоделировании? Сами по себе они не содержат субъединиц, связывающихся со специфическими последовательностями в ДНК. Поэтому предложена модель, согласно которой функционирование комплексов зависит от активаторов или (иногда) от репрессоров (рис. 6.28). Модель функ-

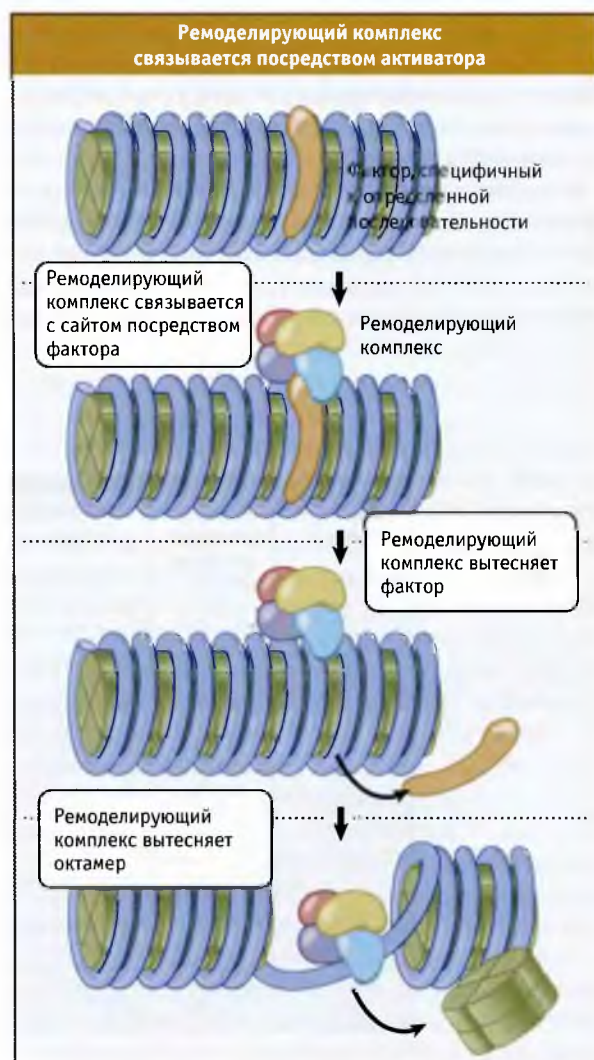


Рис. 6.28. Ремоделирующий комплекс связывается с хроматином посредством активатора (или репрессора)

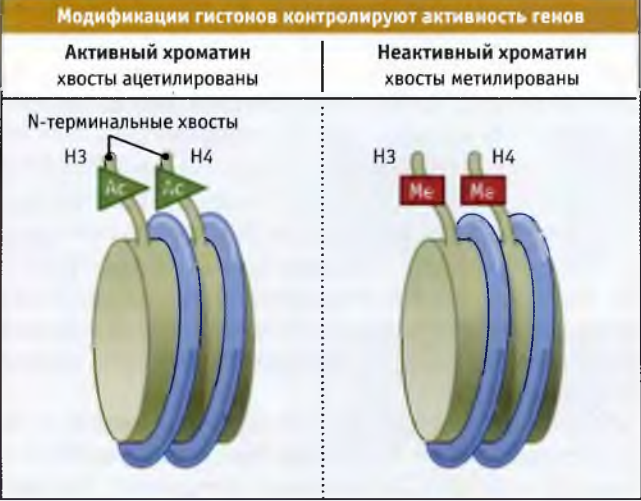


Рис. 6.71. Ацетилирование гистонов H3 и H4 характерно для активного хроматина, в то время как метилирование для неактивного

ционирует по механизму «hit and run», при котором после связывания комплекса ремоделирования активатор или репрессор удаляется.

Ремоделирование хроматина достигается за счет изменений в состоянии гистонов, в особенности модифицирования N-терминальных участков гистонов H3 и H4. Эти участки включают 20 N-терминальных аминокислот и отходят от нуклеосомы, располагаясь

между витками ДНК (см. рис. 6.44 в разд. 6.19 *Организация октамера гистонов*). Они могут быть модифицированы по нескольким сайтам за счет метилирования, ацетилирования или фосфорилирования. При модификации гистонов создаются сайты связывания для негистоновых белков, в результате чего изменяются свойства хроматина.

Количество нуклеосом, белки которых подвергаются модификации, различно. Модификация может быть локальной и, например, ограничиваться нуклеосомами, расположенными в области промотора. Она может представлять собой более общий процесс и затрагивать хромосому целиком. Рис. 6.71 иллюстрирует положение, согласно которому ацетилирование связано с активацией хроматина, а метилирование вызывает его инактивацию. Впрочем, это простое правило выполняется не всегда, и важную роль играет характер модифицируемого сайта, а также сочетание различных модификаций. Поэтому известны исключения, когда, например, в активном хроматине находятся гистоны, метилированные в определенных положениях.

О специфичности модификаций свидетельствуют данные о том, что для многих ферментов на отдельных гистонах существуют специфические сайты. В таблице на рис. 6.72 перечислены некоторые модификации. Большинство сайтов подвергается только одному типу модификации. В некоторых случаях модификация одного сайта может оказывать активирующее или ингибирующее действие на модификацию другого. Представление о том, что комбинация сигналов может быть использована для определения типа хроматина, иногда называется *гистоновый код*.

Модификации гистонов влияют на структуру и функции хроматина			
Гистон	Сайт модификации	Модификация	Функциональные изменения
H3	Lys-4	Метилирование	
	Lys-9	Метилирование	Конденсация хроматина; необходима для метилирования
		Ацетилирование	
	Ser-10	Фосфорилирование	
	Lys-14	Ацетилирование	Предотвращает метилирование по Lys-9
H4	Lys-79	Метилирование	Обеспечивает теломерное молчание
	Arg-3	Метилирование	
	Lys-5	Ацетилирование	
	Lys-12	Ацетилирование	
	Lys-16	Ацетилирование	Сборка нуклеосом; активация Fly X

Рис. 6.72. Большинство сайтов в гистонах подвержены одному, определенному типу модификации, однако некоторые из них могут модифицироваться разными ферментами. С некоторыми из этих модификаций могут быть связаны определенные функциональные изменения

6.29 Ацетилирование гистонов связано с генетической активностью

Основные положения

- Гистоны ацетируются в течение определенного времени при репликации
- Ацетилирование гистонов связано с активацией экспрессии генов
- Деацетилированный хроматин может обладать более конденсированной структурой
- Активаторы транскрипции связаны с ацетилазой гистонов в большие комплексы
- Комплекс ремоделирования хроматина может формировать комплекс ацетилирования
- Ацетилазы гистонов варьируют по специфичности к различным мишеням
- Ацетилирование может оказывать на транскрипцию качественное и количественное влияние
- Деацетилирование гистонов связано с репрессией активности генов
- Деацетилазы находятся в комплексе с репрессором генной активности
- Ацетилирование гистонов может являться событием, которое поддерживает комплекс в активированном состоянии

Все коровые гистоны могут подвергаться ацетилированию. Основные сайты ацетилирования представлены лизиновыми остатками, расположенными в N-терминальных участках гистонов H3 и H4. Ацетилирование происходит при протекании двух событий:

- репликации ДНК;
- активации генов.

При репликации хромосом в S-фазе клеточного цикла происходит ацетилирование гистонов. На рис. 6.73 показано, что это ацетилирование происходит до включения гистонов в нуклеосомы. Известно, что гистоны H3 и H4 ацетируются на стадии их объединения в тетрамер H3₂-H4₂. Затем тетрамер включается в нуклеосому. Вскоре после этого ацетильные группы удаляются.

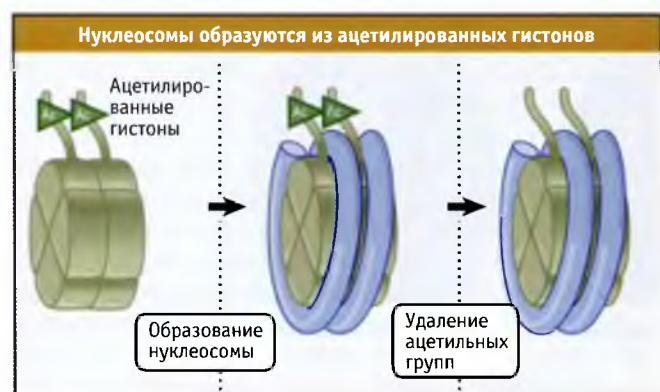
Значение ацетилирования подчеркивается тем фактом, что подавление этой модификации гистонов H3 и

H4 при репликации приводит к потере жизнеспособности клеток дрожжей. Два этих гистона представляют излишними в качестве субстратов, поскольку дрожжи в S-фазе узнают и могут ацетилировать любой из них. Ацетилирование гистонов может играть двоякую роль: оно может быть необходимо для узнавания гистонов факторами, включающими их в нуклеосомы, а также может потребоваться для реформирования существующих или сборки новых нуклеосом.

Ацетилированные и неацетилированные гистоны не различаются известными факторами, участвующими в сборке хроматина. Это позволяет предположить, что, скорее всего, модификации необходимы для последующих белковых взаимодействий. В течение долгого времени считали, что ацетилирование необходимо для осуществления контроля над белок-белковыми взаимодействиями, происходящими при объединении гистонов в нуклеосому. Доказательства в пользу такой роли ацетилирования были получены на дрожжах, у которых SAS гистон ацетилазный комплекс связывается с комплексами сборки хроматина на репликативной вилке, где он ацетирует ¹⁶Lys в гистоне H4. Это может являться частью системы, ответственной за определенный характер ацетилирования гистонов после репликации.

Вне S-фазы ацетилирование гистонов в хроматине обычно коррелирует с состоянием процесса генной экспрессии. Такая корреляция была установлена, поскольку ацетилирование гистонов увеличивается в доменах, содержащих активные гены, и ацетилированный хроматин более чувствителен к ДНКазе I и, возможно, к микрококковой нуклеазе. На рис. 6.74 показано, что при этом происходит ацетилирование хвостов гистонов в нуклеосомах. Сейчас известно, что это происходит при активации гена, главным образом, из-за ацетилирования нуклеосом вблизи промотора.

Наряду с событиями, происходящими на индивидуальных промоторах, широкомасштабные изменения ацетилирования происходят в половых хромосомах. Это является частью механизма, посредством которого изменяется активность генов на X-хромосоме с тем, чтобы скомпенсировать присутствие или двух X-хромосом у одних организмов, или наоборот, только одной хромосомы (наряду с Y-хромосомой) у других (см. 6.32 *X-хромосомы подвергаются глубоким изменениям*). Неактивная X-хромосома самок млекопитающих имеет недоацетилированный гистон H4. Высокоактивная X-хромосома у самцов *Drosophila* характеризуется повышенной степенью ацетилирования этого гистона. Это предполагает, что присутствие ацетильных групп может быть необходимо для создания более релаксированной активной структуры. У самца *Drosophila* происходит ацетилирование гистона H4 X-хромосомы по остатку ¹⁶Lys. Компонент, ответственный за этот процесс, представляет собой фермент, называемый MOF, который связывается с хромосомой и представляет собой часть большого белкового комплекса. Этот комплекс «компенсации дозы» отвечает за общие изменения в X-хромосоме, которые приводят к более высокому уровню экспрессии



При репликации ацетилирование гистонов происходит до их включения в состав нуклеосом

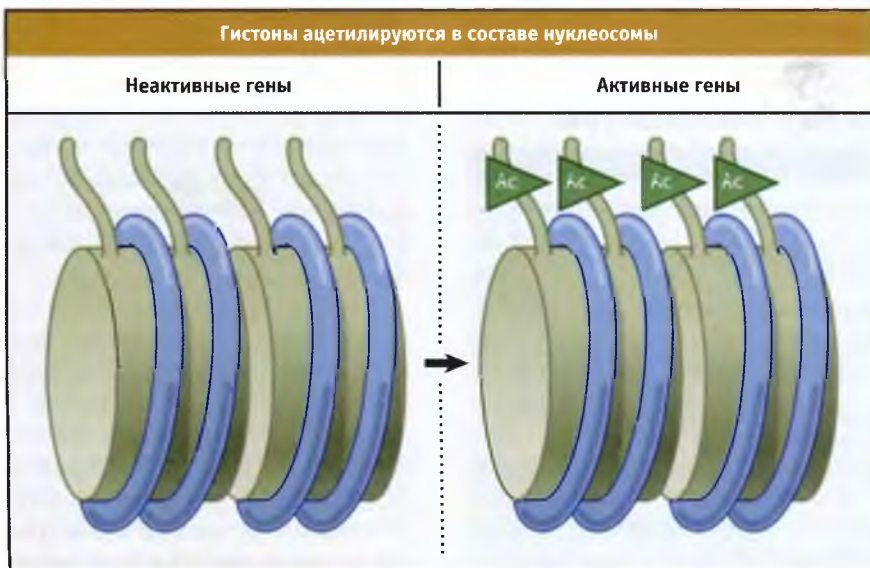


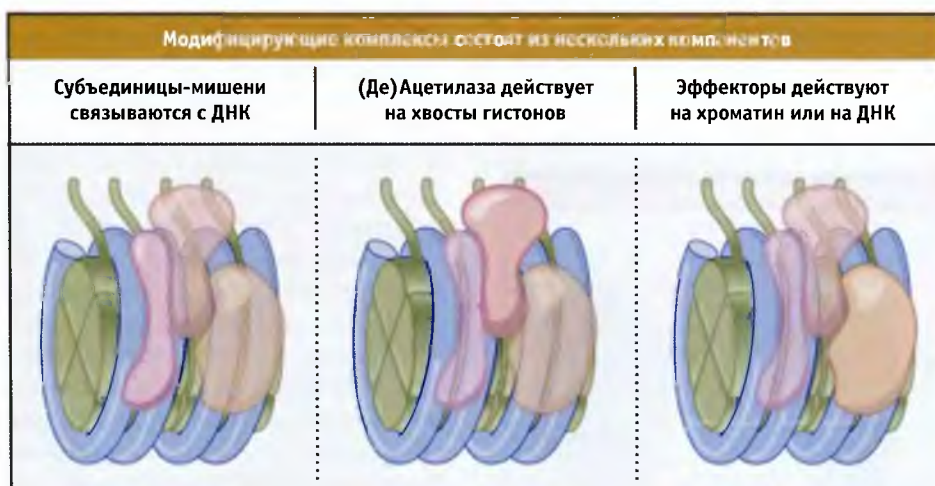
Рис. 5.74. Ацетилирование, связанное с активацией генов, происходит за счет прямой модификации гистонов в составе нуклеосомы

содержащихся в ней генов. Увеличение степени ацетилирования представляет собой проявление лишь одной из активностей, которыми обладает этот комплекс.

Ацетилирование гистонов представляет собой обратимый процесс. Каждое направление реакции катализируется специфическим ферментом. Ферменты, способные ацетилировать гистоны, называются **гистоновые ацетилтрансферазы**, или **НАТ**; удаление ацетильных групп катализируется **деацетилазами гистонов**, или **HDAC**. Известны две группы ферментов НАТ: ферменты группы А действуют на гистоны в хроматине и контролируют транскрипцию; ферменты группы В действуют

на вновь синтезированные гистоны в цитозоле и участвуют в сборке нуклеосом.

Общая черта ферментов ацетилирования состоит в том, что НАТ группы А являются частью большого белкового комплекса. На рис. 5.75 представлена упрощенная модель их функционирования. Обычно комплекс содержит субъединицы, которые связываются с определенными сайтами ДНК. Это определяет мишень для НАТ. В состав комплекса также входят эффекторный субъединицы, способные изменять структуру хроматина или непосредственно влиять на транскрипцию. Вероятно, для того чтобы проявить свое действие, по крайней



Комплексы, модифицирующие структуру или активность хроматина, характеризуются наличием субъединиц-мишеней, которые определяют точки связывания с ДНК, т. е. мишени для НАТ или HDAC ферментов, ацетилирующих или деацетилирующих гистоны, и эффекторных субъединиц, обладающих другим действием на хроматин или ДНК

мере некоторые эффекторы требуют ацетилирования. Аналогичным образом может влиять деацетилирование, катализируемое HDAC.

Носит ли эффект ацетилирования количественную или качественную природу? Одна возможность заключается в том, что для проявления эффекта необходимо определенное количество ацетильных групп, а точное их расположение большей частью не играет роли. Альтернатива состоит в том, что отдельные события ацетилирования характеризуются специфическими эффектами. Мы можем объяснить существование комплексов, содержащих множественные активности НАТ, следующим предположением — если индивидуальные ферменты проявляют различную специфичность, то множественная активность может понадобиться для ацетилирования множественных сайтов или для обеспечения различных посттранскрипционных эффектов. По-видимому, при репликации, по крайней мере в отношении гистона H4, кажется, что ацетилирование по любым двум из трех доступных позиций является в этом случае адекватным. Это свидетельствует в пользу количественной модели. В тех случаях, когда меняется структура хроматина, что влияет на транскрипцию, важным становится ацетилирование в специфических сайтах. (см. 6.31 *Образование гетерохроматина зависит от взаимодействия белков с гистонами*).

Так же как ацетилазы вызывают активацию транскрипции, ее инактивация связана с функционированием деацетилаз. Это положение справедливо как для индивидуальных генов, так и для гетерохроматина. Репрессия индивидуальных промоторов достигается при образовании комплексов, обладающих деацетилазной активностью по отношению к отдельным участкам, находящимся вблизи промотора. Отсутствие ацетилированных гистонов в гетерохроматине характерно как для конститутивного (обычно расположенного в центромерной и теломерной области), так и факультативного гетерохроматина. Последний тип гетерохроматина в одних клетках находится в неактивном состоянии, а в других может быть активен. Обычно в гетерохроматине N-терминальные участки гистонов H3 и H4 не подвергаются ацетилированию.

Каким образом происходит доставка ацетилаз (или деацетилаз) к специфическим мишеням? Так же как это имеет место для комплексов ремоделирования хроматина, процесс, вероятно, осуществляется непрямым путем. Активатор (или репрессор), специфически узнающий определенную последовательность, взаимодействует с компонентом ацетилазы (или деацетилазы) комплекса, обеспечивая его позиционирование на промоторе.

Комплексы, участвующие в ремоделировании хроматина и в модифицировании гистонов, могут непосредственно взаимодействовать. Связывание SWI/SNF комплекса ремоделирования может повлечь за собой связывание ацетилазного комплекса. Ацетилирование гистонов может стабилизировать связь с комплексом SWI/SNF, тем самым взаимно способствуя функциям этих компонентов.

Серия событий, происходящих в области промотора, представлена на рис. 6.76. Вначале происходит свя-

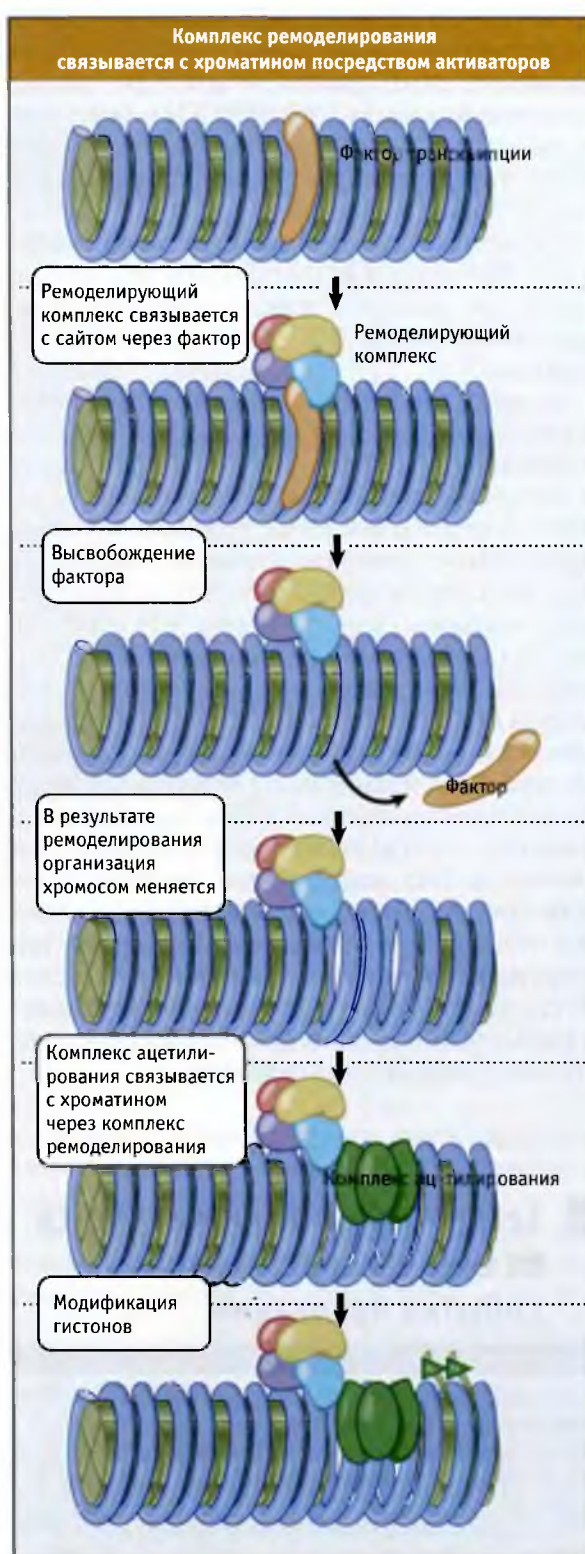


РИС. 6.76. Активация промотора включает этапы связывания активатора, специфичного по отношению к определенной последовательности, отбор и функционирование ремоделирующего комплекса, а также комплекса ацетилирования

зывание фактора транскрипции со специфической последовательностью ДНК. Этот фактор находит свое место на хроматине. Далее происходит присоединение комплекса ремоделирования хроматина и изменяется структура нуклеосом. Связывание комплекса ацетилирования и ковалентная модификация гистонов свидетельствуют о том, что произошла активация локуса.

В области промотора также происходит модификация ДНК. Метилирование цитозина, входящего в состав дуплетов CpG, связано с инактивацией гена. Пока не очень понятно, почему ДНК становится мишенью метилирования.

Очевидно, что для ремоделирования хроматина в области промотора необходимо прохождение различных событий, включающих ацетилирование, в результате которых нуклеосомы изменяются. Однако какие изменения необходимы в гене, чтобы обеспечить прохождение РНК-полимеразы? Известно, что РНК-полимераза может транскрибировать ДНК *in vitro* со скоростью, близкой к скорости *in vivo* (~25 нуклеотидов в сек), но только на матрице свободной ДНК. Охарактеризованы белки, способные увеличивать скорость, с которой РНК-полимераза транскрибирует хроматин *in vivo*. Все они действуют на хроматин. Современное представление о механизме их действия заключается в том, что они связываются с РНК-полимеразой и движутся вместе с ней вдоль матрицы, изменяя структуру нуклеосом за счет модификации гистонов. К числу этих белков относится ацетилаза гистонов. Возможно также, что первая молекула РНК-полимеразы, транскрибирующая ген, играет роль «пионера» и содержит факторы, изменяющие структуру единицы транскрипции таким образом, чтобы сделать ее более доступной для последующих молекул фермента.

ется в конденсированном состоянии, транскрипция в нем подавлена, репликация приходится на позднюю S-фазу, и чаще всего он локализован на периферии ядра. Гетерохроматин центромеры обычно содержит сателлитную ДНК. Однако образование гетерохроматина не зависит от первичной структуры ДНК. Когда ген перемещается за счет хромосомной транслокации или трансфекции и интегрируется в другое положение, ближе к гетерохроматину, в результате попадания на новое место он может инактивироваться. При этом предполагается, что он приобретает черты гетерохроматинного гена.

Такая инактивация является результатом **эпигенетического** эффекта (см. MB10:6-0005). Для отдельных клеток эукариот он может проявляться по-разному и приводить к **эффекту положения мозаичного типа (PEV)**, при котором генетически идентичные клетки обладают различным фенотипом. Этот эффект хорошо изучен у *Drosophila*.

иллюстрирует эффект положения на примере окраски глаза дрозофилы, некоторые фасетки которого не имеют окраски, в то время как другие окрашены в красный цвет. Это объясняется тем, что белая окраска вызвана геном, который в некоторых клетках инактивировался под действием примыкающего гетерохроматина, в то время как в других остался активным.



РИС. 6.11. Мозаичный эффект положения, проявляющийся в изменении цвета глаз, возникает, когда *белый* ген интегрируется рядом с гетерохроматиновым участком. Клетки, в которых *белый* ген неактивен, образуют бляшки белоглазости, а клетки с активным *белым* геном образуют красные бляшки. Выраженность эффекта определяется близостью интегрированного гена к гетерохроматиновой области. Фотография любезно предоставлена Стивеном Хеникофф, Центр раковых исследований Фреда Хатчинсона

6.30 Гетерохроматин формируется за счет распространения события нуклеации

Основные положения

- Гетерохроматин формируется на специфических последовательностях, и неактивная структура распространяется по фибрилле хроматина
- Гены в области гетерохроматина находятся в неактивном состоянии
- Поскольку длина неактивного региона варьирует от клетки к клетке, инактивация генов в этой области обуславливает эффект положения мозаичного типа
- Аналогичные эффекты распространения проявляются на теломерах и на молчащих кассетах, контролирующих тип спаривания у дрожжей

Интерфазное ядро содержит как эу-, так и гетерохроматин. Степень конденсации гетерохроматина почти такая же, как в митотических хромосомах. Гетерохроматин не проявляет активности. В интерфазе он оста-

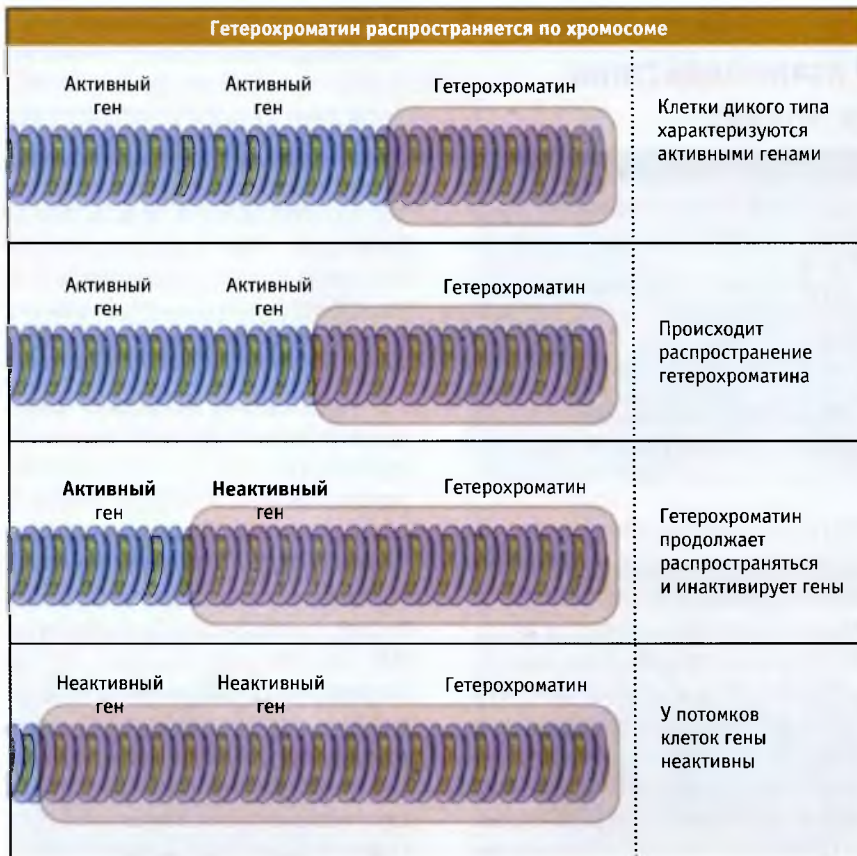


РИС. 6.78. Распространение участка гетерохроматина приводит к инактивации генов. Вероятность инактивации гена определяется его расстоянием от гетерохроматиновой области

На РИС. 6.78 представлено схематическое объяснение этого эффекта. Инактивация распространяется на разное расстояние от гетерохроматина в примыкающие области. В одних клетках она заходит достаточно далеко для того, чтобы инактивировать соседний ген, в других клетках этого не наблюдается. Это происходит в определенный момент эмбрионального развития, после чего состояние гена передается всем клеткам-потомкам. Потомки, произошедшие от клеток с инактивированным геном, образуют фасетки с фенотипом, отражающим выпадение признака (в данном случае неокрашенные, т. е. *белого* цвета).

Чем ближе располагается ген к гетерохроматиновой области, тем выше вероятность того, что он будет инактивирован. Это позволяет предполагать, что образование гетерохроматина представляет собой двухэтапный процесс: вначале на специфической последовательности происходит *нуклеация*, а затем неактивное состояние *распространяется* по фибрилле хроматина. Расстояние, на которое оно распространяется, точно не известно; скорее всего, процесс имеет стохастическую природу, и на него влияют такие параметры, как количество белковых компонентов, играющих ограничительную роль. К числу факторов, влияющих на процесс распростране-

ния, относится активация промоторов в определенной области; активный промотор может ингибировать распространение гетерохроматина.

Гены, расположенные поблизости от гетерохроматиновых областей, находятся в неактивном состоянии и поэтому в большинстве клеток неактивны. Эта модель предполагает, что границы гетерохроматиновой области могут меняться в зависимости от присутствия необходимых белков.

У дрожжей известен т. н. эффект **теломерного молчания**, аналогичный эффекту положения мозаичного типа у *Drosophila*: гены, локализованные в области теломеры, в различной степени инактивированы. Это объясняется эффектом распространения гетерохроматина от теломеры.

Для дрожжей характерна еще одна форма эффекта молчания. Тип спаривания у них определяется активностью одного локуса (*MAT*), однако в геноме содержатся две копии таких последовательностей (*HML* и *HMR*), которые находятся в неактивной конфигурации. Молчащие локусы *HML* и *HMR* имеют много общего с гетерохроматином, и их можно рассматривать как его небольшие области.

6.31 Образование гетерохроматина зависит от взаимодействия белков с гистонами

Основные положения

- HP1 представляет собой ключевой белок, образующий гетерохроматин. Он действует, связываясь с метилированным гистон H3
- Белок RAP1 инициирует образование гетерохроматина у дрожжей, связываясь со специфическими последовательностями ДНК
- Мишенями для RAP1 служат теломерные повторы и молчащие последовательности, расположенные в *HML* и *HMR*
- RAP1 участвует в отборе белков SIR3/SIR4, которые взаимодействуют с N-терминальными участками H3 и H4

Инактивация хроматина происходит вследствие добавления белков к фибрилле нуклеосом. Она может быть вызвана многими причинами, например конденсацией хроматина, в результате которой он становится недоступным для аппарата генной экспрессии, присоединением белков, непосредственно блокирующих доступ к регуляторным сайтам, или же непосредственно ингибирующих транскрипцию.

Известны две системы инактивации хроматина: HP1 у млекопитающих и комплекс SIR у дрожжей. Хотя белки, входящие в их состав, различаются, процесс осуществляется по общему механизму: точками контакта в хроматине служат N-терминальные участки молекул гистонов.

Белок HP1 (гетерохроматиновый белок 1) был идентифицирован в составе гетерохроматина при окрашивании политенных хромосом соответствующими антителами. У дрожжей *S. pombe* гомолог этого белка кодируется геном *swi6*. Белок, первоначально идентифицированный как HP1, в настоящее время называется HP1 α , поскольку в дальнейшем были обнаружены еще два близких белка, HP1 β и HP1 γ .

Белок HP1 содержит область, которая называется хромодомен и располагается вблизи N-концевого участка

молекулы, а также связанный с ней другой домен, который называется хромотеневым и располагается на карбоксильном участке молекулы (см. рис. 6.80). О важности хромодомена свидетельствует тот факт, что в нем локализовано большинство мутаций, нарушающих функционирование белка HP1. Хромодомен состоит из 60 аминокислот. Он обнаружен в белках, принимающих участие как в активации, так и в репрессии хроматина, что позволяет предполагать его роль в белок-белковых взаимодействиях. Хромодомен(ы) обеспечивают взаимодействие белков с гетерохроматином за счет узнавания метилированных остатков лизина в гистоновых «хвостах».

Мутации по ацетилазе, затрагивающие H3Ac-¹⁴Lys, предотвращают метилирование ⁹Lys. Гистон H3, который метилируется по ⁹Lys, связывает белок HP1 через хромодомен. На рис. 6.81 представлена модель образования гетерохроматина. Вначале происходит удаление ацетильной группы с ¹⁴Lys с помощью деацетилазы. Затем при участии метилазы в «хвосте» гистона H3 создается метилированный сайт, к которому присоединяется белок HP1. На рис. 6.82 показано, что между хромодоменом и метилированным лизином происходит взаимодействие, которое служит событием, запускающим процесс формирования неактивного хроматина. Как показано на рис. 6.81, в дальнейшем неактивная область может распространяться по хроматину, за счет способности все новых молекул HP1 к взаимодействию между собой.

Существование общего механизма формирования молчащих последовательностей у дрожжей подтверждается зависимостью их активации от общего набора генетических локусов. Мутации по любому из этих генов вызывают активацию двух молчащих локусов (*HML* и *HMR*), а также ослабляют степень инактивации генов, расположенных поблизости от теломерного гетерохроматина. Поэтому продукты этих генов ответственны за поддержание неактивного состояния обоих типов гетерохроматина.

На рис. 6.82 представлена модель, описывающая механизм действия этих белков. Лишь один из них спо-

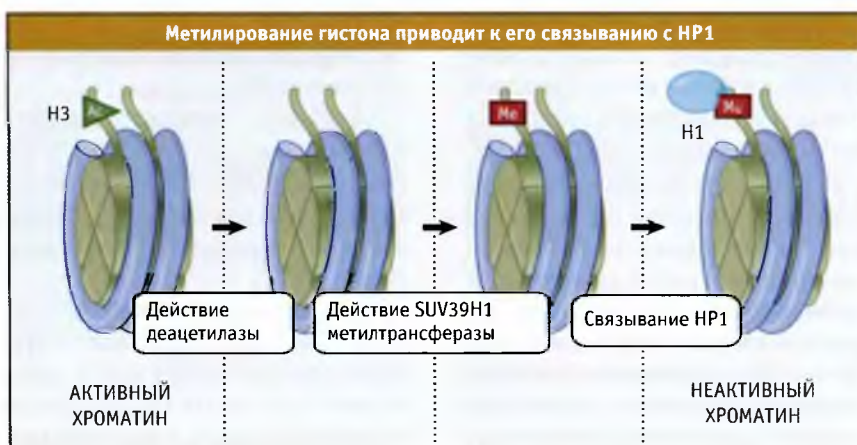
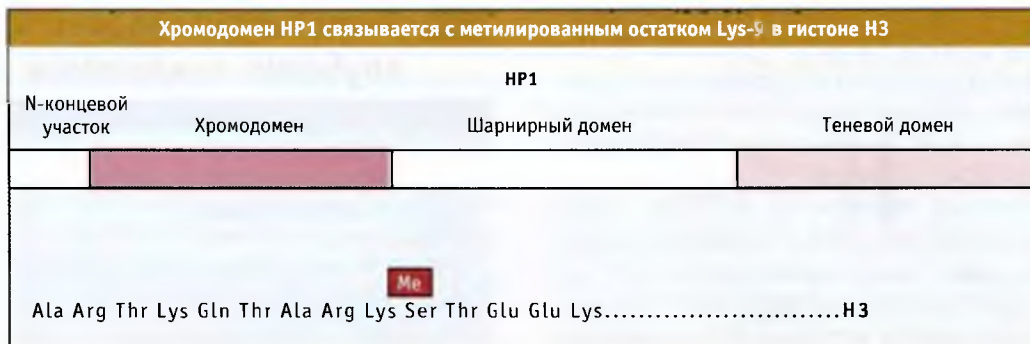
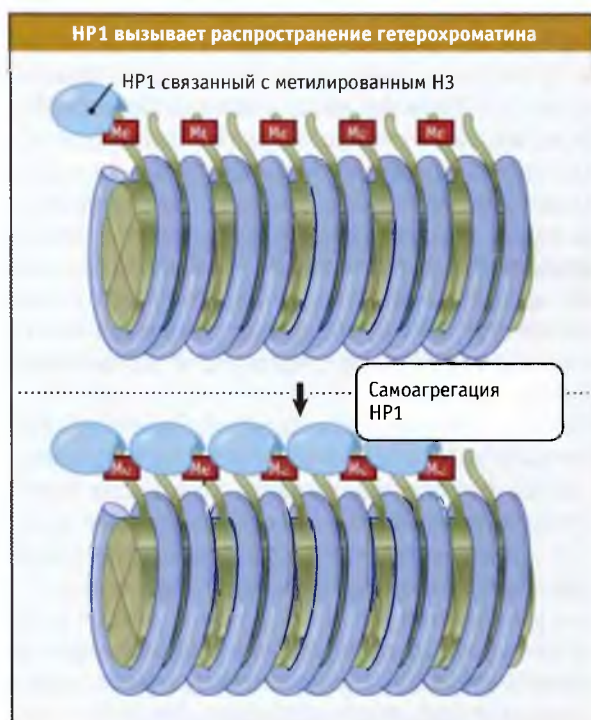


РИС. 6.82 Фермент SUV39H1 представляет собой гистон метилтрансферазу, которая метилирует Lys-9 в гистоне H3. HP1 связывается с метилированным гистонем



В результате метилирования гистона H3 на нем создается сайт связывания для HP1



В результате связывания HP1 с метилированным H3 гистоном образуется триггер, способный запускать инактивацию генов, поскольку присоединение дополнительных молекул HP1 приводит к их агрегации на нуклеосомной цепи

могут связываться со специфической последовательностью ДНК. Это белок RAP1, который связывается с C₁₋₃A повторами в теломерной области и присоединяется к *цис*-элементу сайленсинга, необходимому для подавления активности *HML* и *HMR*. Белки SIR3 и SIR4 реагируют с RAP1 и друг с другом (они могут функционировать как гетеромультимер). SIR3/SIR4 взаимодействуют с N-терминальными «хвостами» гистонов H3 и H4. (Фактически первое свидетельство в пользу непосредственного участия гистонов в формировании гетерохроматина было получено при исследовании мутаций, активирующих

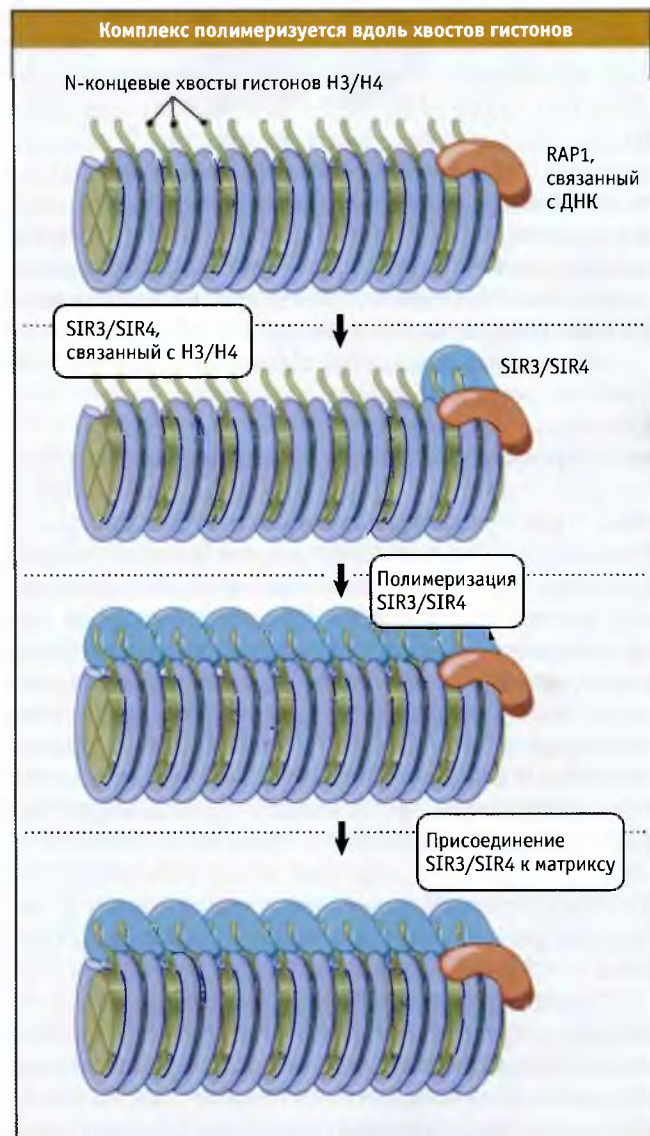


РИС. 6.32. Связывание RAP1 с ДНК приводит к образованию гетерохроматина. SIR3/SIR4 связывается с RAP1 и с гистонами H3/H4. Комплекс полимеризуется вдоль хроматина и может связывать теломеры с ядерным матриксом

локусы *HML* и *HMR*, которые расположены в области генов, кодирующих синтез H3 и H4.)

Критическую роль в узнавании последовательностей ДНК, участвующих в формировании участков гетерохроматина, играет белок RAP1. Он обеспечивает взаимодействие белков SIR3/SIR4 с гистонами H3 и H4. Когда они связались с гистонами, образование комплекса может продолжаться и распространяться по хроматину дальше. Это может приводить к инактивации участка хроматина либо из-за ингибирующего эффекта SIR3/SIR4, либо из-за того, что связывание с гистонами H3/H4 вызывает дальнейшие изменения в структуре хроматина. Мы не знаем, какие факторы ограничивают распространение комплекса. С-концевой участок молекулы SIR3 по составу близок к ядерным ламинам (компонентам ядерного матрикса) и может участвовать в фиксации гетерохроматина на периферии ядра.

Сказанное также справедливо для молчащих локусов HMR и HML. В образовании комплекса участвуют три фактора, проявляющих специфичность к определенным последовательностям ДНК: RAP1, ABF1 (фактор транскрипции) и ORC (комплекс начала репликации). В этом случае белок SIR1 взаимодействует с фактором, связанным с определенной последовательностью, и запускает процесс образования репрессорной структуры, состоящей из белков SIR2, SIR3 и SIR4. Белок SIR2 представляет собой деацетилазу гистонов. Реакция деацетилирования необходима для поддержания связывания белка SIR с хроматином.

Каким образом комплекс сайленсинга подавляет активность хроматина? Этот комплекс может вызвать такую конденсацию хроматина, что регуляторные белки окажутся не в состоянии найти свои мишени. Проще всего было бы предположить, что присутствие комплекса несовместимо с факторами транскрипции и РНК-полимеразой. Возможно, что комплексы блокируют ремоделирование хроматина (и таким образом предотвращают связывание этих факторов) или же непосредственно блокируют сайты связывания, тем самым предотвращая присоединение к ним факторов транскрипции. Впрочем, все может быть не так просто, поскольку факторы транскрипции и РНК-полимеразу можно обнаружить в промоторной области неактивного хроматина. Это позволяет считать, что комплекс сайленсинга предотвращает функционирование факторов, а не их связывание с хроматином. Фактически может наблюдаться конкуренция между активаторами генов и репрессорами хроматина, за счет которой при активации промотора распространение комплекса сайленсинга по хроматину ингибируется.

Образование особой структуры хроматина на центромерных участках (см. 6.8 *Центромера связывает белковый комплекс*) может быть связано с образованием гетерохроматина в определенной области. В клетках человека в области центромеры содержится специфический белок, CENP-B, необходимый для запуска модификации гистона H3 (деацетилирование ^9Lys и ^{14}Lys , с последующим метилированием ^9Lys), необходимой для связывания с белком Swi6, которое приводит к формированию гетерохроматина в данном участке.

6.32 X-хромосомы подвергаются глубоким изменениям

Основные положения

- В процессе эмбриогенеза одна из двух X-хромосом в каждой клетке организма плацентарных млекопитающих произвольно инактивируется
- В отдельных случаях, когда в клетке присутствует более двух X-хромосом, инактивируются все, кроме одной
- *Xic* (центр инактивации) представляет собой *цис*-активируемую область X-хромосомы, которая необходима и достаточна для того, чтобы убедиться в том, что активной осталась только одна X-хромосома
- *Xic* включает ген *Xist*, который кодирует РНК, обнаруживаемую только на неактивной X-хромосоме
- Механизм, ответственный за предотвращение накопления *Xist* РНК на активной хромосоме, неизвестен

Проблема пола приобретает особо важное значение для регуляции активности генов, поскольку среди живых организмов существуют различия в количестве X-хромосом. Если бы гены, локализованные в X-хромосоме, в равной степени экспрессировались у обоих полов, женские особи должны были бы иметь в два раза больше каждого генного продукта, чем мужские. Для того чтобы не допустить этого, существует механизм **компенсации дозы генов**, с помощью которого у обоих полов уравнивается экспрессия генов X-хромосомы. На рис. 6.83 представлены различные механизмы, позволяющие осуществлять такую компенсацию у различных особей:

- У млекопитающих одна из двух женских X-хромосом полностью инактивирована. В результате, в клетках женской особи присутствует только одна активная X-хромосома, что соответствует мужскому организму. Активная женская X-хромосома и единственная мужская хромосома характеризуются одним и тем же уровнем экспрессии.
- У *Drosophila* уровень экспрессии единственной мужской X-хромосомы удваивается по сравнению с экспрессией каждой женской хромосомы
- У *C.elegans* уровень экспрессии каждой женской X-хромосомы достигает лишь половины уровня

Компенсация дозы гена меняет экспрессию X-хромосомы			
Млекопитающие	Плодовая мушка	Черви	
Инактивация одной X ♀	Двойная экспрессия X ♂	Половинная экспрессия 2X ♀	
X			
X			
x			
Y			

Рис. 6.83. Для уравнивания экспрессии X-хромосомы у самок и самцов используются различные способы компенсации дозы гена

по сравнению с экспрессией единственной X-хромосомы у мужской особи

Общая особенность всех механизмов компенсации дозы генов заключается в том, что *мишенью регуляции служит вся хромосома*. При этом происходят глубокие изменения, затрагивающие все промоторы хромосомы. Больше всего нам известно об инактивации X-хромосомы у женских особей, когда хромосома целиком приобретает гетерохроматиновую организацию.

Характерным свойством гетерохроматина является его конденсированное состояние, сопряженное с отсутствием генетической активности. Гетерохроматин можно подразделить на две категории:

- **Конститутивный гетерохроматин**, который содержит специфические последовательности, не обладающие кодирующей функцией. Обычно к их числу относятся сателлитные ДНК, часто локализованные в центромерных участках хромосом. Для этих областей характерна гетерохроматиновая организация
- **Факультативный гетерохроматин**, который принимает форму целой хромосомы; в одних клетках она может быть неактивна, а в других может экспрессироваться. *Классический пример* представляет X-хромосома млекопитающих. Неактивная X-хромосома состоит из гетерохроматина, а активная представляет собой часть эухроматина. *Таким образом, оба состояния хроматина содержат одинаковые последовательности ДНК*. Когда хроматин приобрел неактивную организацию, она наследуется потомками клеток. Это пример эпигенетической наследственности, поскольку наследование признака не определяется последовательностью ДНК.

Наши основные представления об особенностях функционирования женских X-хромосом сложились к 1961 г. в форме гипотезы функционирования **одной X-хромосомы**. Самки мышей, гетерозиготных по мутации, затрагивающей окраску тела, сцепленную с полом, обладали мозаичным фенотипом, при котором окраска одних участков кодировалась геном дикого типа, а других — мутантным геном. Как следует из **рис. 6.34**, это можно объяснить, если принять, что *в небольшой популяции клеток-предшественников одна из двух X-хромосом в каждой клетке произвольным образом инактивируется*. Клетки, в которых инактивирована X-хромосома, несущая ген дикого типа, образуют потомство, экспрессирующее на активной хромосоме только мутантный аллель. При развитии окраски клетки, которые произошли от определенного предшественника, располагаются рядом, и т. о. образуют пятно определенного цвета, создавая видимый эффект мозаичности. В другом случае отдельные клетки в популяции экспрессируют тот или иной аллель, сцепленный с X-хромосомой. Например, у гетерозигот по локусу G6PD X-хромосомы любая из красных кровяных клеток будет экспрессировать только одну из двух аллельных форм. (У плацентарных млекопитающих происходит случайная инактивация одной X-хромосомы. У сумчатых выбор предопределен:

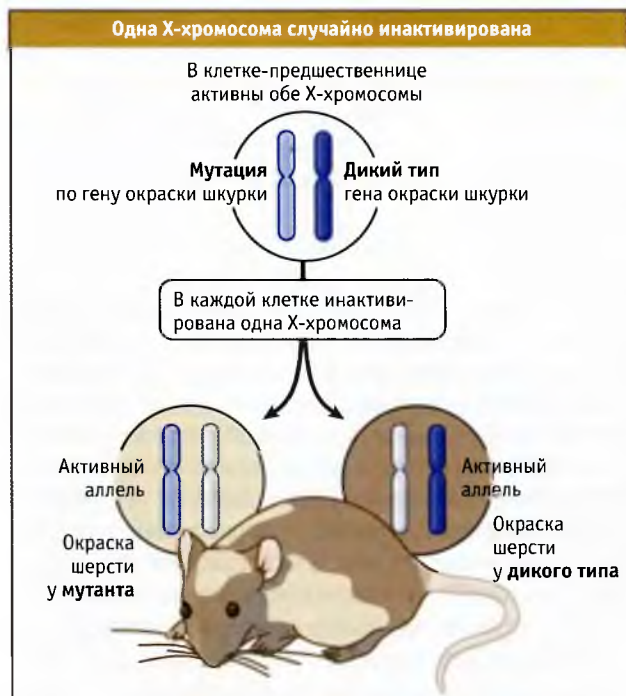


рис. 6.34. Мозаичный эффект, связанный с X-хромосомой, вызывается случайной инактивацией одной X-хромосомы в каждой клетке-предшественнице. Клетки, у которых + аллель находится на активной хромосоме, обладают диким фенотипом, но клетки, у которых на активной хромосоме находится аллель, приобретают мутантный фенотип

у них всегда наследуется инактивированная отцовская X-хромосома.)

Инактивация X-хромосомы у женских особей происходит в соответствии с **правилом n-1**; и если в клетке присутствуют несколько X-хромосом, инактивируются все, за исключением одной. Обычно у женских особей в клетках присутствуют две X-хромосомы, однако в редких случаях может наблюдаться 3X или более сложный генотип, и тогда только одна X-хромосома остается активной. Это позволяет предполагать существование общего механизма, который ограничивает протекание специфических процессов только одной хромосомой и защищает ее от инактивации, которой подвергаются остальные.

Для инактивации оказывается достаточным выключить один локус X-хромосомы. Когда между X-хромосомой и аутосомой происходит транслокация, этот локус попадает только в один из образующихся продуктов, и возможна инактивация только этого продукта. Исследуя разные транслокации, можно определить местонахождение этого локуса, который называется *Xic* (X-inactivation center). Клонированная область размером 450 тпн обладает всеми свойствами *Xic*. Когда эта область включается в аутосому, то образующаяся трансгенная аутосома может инактивироваться (в клеточной культуре).

Xic представляет собой *цис*-активируемый локус, содержащий всю информацию, необходимую для того,

чтобы определить количество X-хромосом и инактивировать все, кроме одной копии. Инактивация распространяется от локуса *Xic* по всей хромосоме. Если *Xic* присутствует в продукте транслокации между хромосомой и аутосомой, инактивация распространяется на область аутосомы (хотя эффект не всегда проявляется полностью).

Локус *Xic* содержит ген, называемый *Xist*, который экспрессируется только в неактивной X-хромосоме. Этот ген ведет себя совершенно противоположным образом по сравнению с прочими генами, присутствующими в хромосоме, которые выключаются. Делеция в локусе *Xist* предотвращает инактивацию X-хромосомы, однако не влияет на функционирование механизма подсчета X-хромосом (поскольку остальные хромосомы могут инактивироваться). Таким образом, *Xist* обладает двумя характерными чертами: содержит неидентифицированный компонент (или компоненты), необходимый для подсчета, и *Xist* ген, участвующий в инактивации.

Рис. 6.35 иллюстрирует роль *Xist* РНК в инактивации X-хромосомы. Ген кодирует РНК, у которой отсутствует открытая рамка считывания. Эта РНК «покрывает» X-хромосому, на которой она синтезировалась, что предполагает наличие у нее структурной роли. Эта РНК образуется при участии обеих женских X-хромосом до момента их инактивации. После инактивации РНК обнаруживается только на неактивной X-хромосоме.

До момента инактивации *Xist* РНК характеризуется периодом полусуществования порядка 2 ч. Инактивация

за счет стабилизации РНК на неактивной хромосоме. Для *Xist* РНК характерна пятнистость распределения вдоль хромосомы. Это позволяет предполагать, что ассоциация ее с белками с образованием определенных структур может играть стабилизирующую роль. Пока мы не знаем, какие дополнительные факторы могут участвовать в этом процессе и каким образом ограничивается распространение *Xist* РНК вдоль хромосомы. Процессы, характерные для неактивной X-хромосомы, включают отсутствие ацетилирования H4 гистона и метилирование последовательности CpG (см. MBIO:6-0006). По-видимому, они происходят позже, являясь частью механизма инактивации.

Правило n-1 предполагает, что стабилизация *Xist* РНК представляет собой процесс, происходящий «по умолчанию», и что некий блокирующий механизм предотвращает стабилизацию одной X-хромосомы (которая становится активной хромосомой). Это означает, что хотя *Xist* является необходимым и достаточным инструментом инактивации хромосомы, для поддержания функционирования активной X-хромосомы могут потребоваться продукты других генов.

6.33 Конденсация хромосом происходит под действием конденсинов

Основные положения

- SMC белки являются АТФазами и включают конденсины и когезины
- Гетеродимеры SMC белков связываются с другими субъединицами
- За счет образования положительных супервитков в ДНК конденсины обеспечивают более плотную спирализацию хроматина
- Конденсины обуславливают конденсацию хромосом в митозе
- Конденсация неактивных X-хромосом у *C. elegans* происходит под действием конденсинов, специфичных по отношению к определенным хромосомам

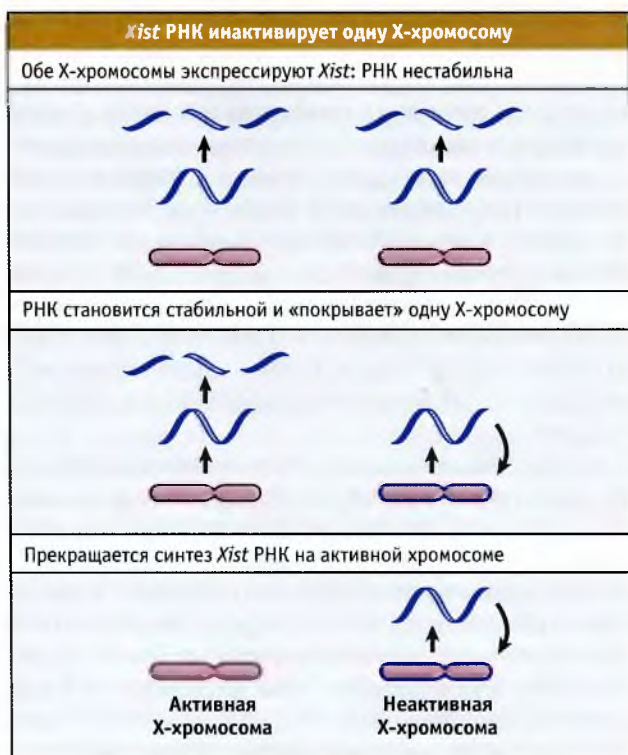


Рис. 6.35 Инактивация X-хромосомы включает этап стабилизации *Xist* РНК, которая покрывает неактивную хромосому

Структура хромосом в целом определяется их взаимодействием с белками семейства SMC (structural maintenance of chromosome). Эти белки представляют собой АТФазы, которые подразделяются на две функциональные группы. **Конденсины** контролируют структуру хромосом в целом и обеспечивают их конденсацию в компактную форму в митозе. **Когезины** участвуют в поддержании связей между сестринскими хроматидами, которые должны реализоваться в митозе. Обе группы представляют собой димеры, образованные SMC белками. Конденсины образуют комплексы, состоящие из коровых гетеродимеров SMC2-SMC4, связанных с другими белками (не относящимися к семейству SMC). Когезины имеют аналогичную структуру, построенную на основании гетеродимерного кора SMC1-SMC3.

Как показано на рис. 6.87, центральная часть молекулы SMC белка обладает суперспиральной структурой, которая разделена гибкой петлей. Как amino-, так и карбоксильные концевые участки характеризуются АТФ и ДНК-связывающими структурными мотивами. В зависимости от образования димеров за счет интра- или интермолекулярных взаимодействий, для объяснения механизма действия этих белков предложены различные модели.

На основании экспериментов с бактериальными гомологами SMC белков предполагается, что димеры образуются за счет антипараллельного взаимодействия между суперспиралями, так что N-концевой участок одной субъединицы связывается с С-концевым участком другой. Наличие гибкого петельного участка позволяет когезинам и конденсином изменять конфигурацию димера в зависимости от функциональной необходимости. На рис. 6.87 показано, что когезины обладают V-образной структурой, причем угол между плечами димера составляет 86° . Для димеров конденсинов характерна более сильная изогнутость молекул, и угол между плечами достигает всего 6° . Это позволяет когезинам удерживать рядом сестринские хромати-

ды, а конденсином участвовать в конденсации индивидуальных хромосом. На рис. 6.88 показано, что когезин может принимать форму развернутого димера, образующего поперечные сшивки между молекулами ДНК. Рис. 6.89 иллюстрирует, что димер конденсина может принимать V-образную форму за счет перегиба в области петли, причем при этом стягиваются вместе отстоящие друг от друга участки молекулы ДНК, что приводит к ее конденсации.

На основании экспериментов предложена альтернативная модель, предполагающая, что белки дрожжей димеризуются за счет интрамолекулярных взаимодействий. Таким образом, гомодимер образуется исключительно при взаимодействии двух идентичных субъединиц. Затем могут взаимодействовать димеры двух разных белков (в данном случае SMC1 и SMC3). Взаимодействие может осуществляться на уровне головок и петельных структур и сопровождается образованием окаймляющей структуры (рис. 6.90). Вместо прямого связывания с ДНК такая структура может удерживать ее молекулы вместе, окружая их.

Визуализация митотических хромосом показывает, что конденсины локализованы по всей длине хромосо-



рис. 6.87. Белок SMC содержит «прогулочный модуль», в котором присутствует последовательность, связывающая АТФ, и на концах находятся сайты связывания с ДНК, соединенные друг с другом суперспирализованными участками, между которыми расположен домен вращения

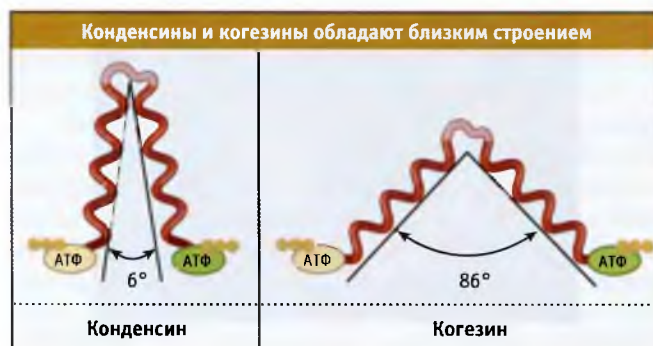


рис. 6.87. Две половины конденсина перекручены назад под углом 6° . Когезины существуют в более открытой конформации, и угол между двумя половинами молекулы составляет 86°

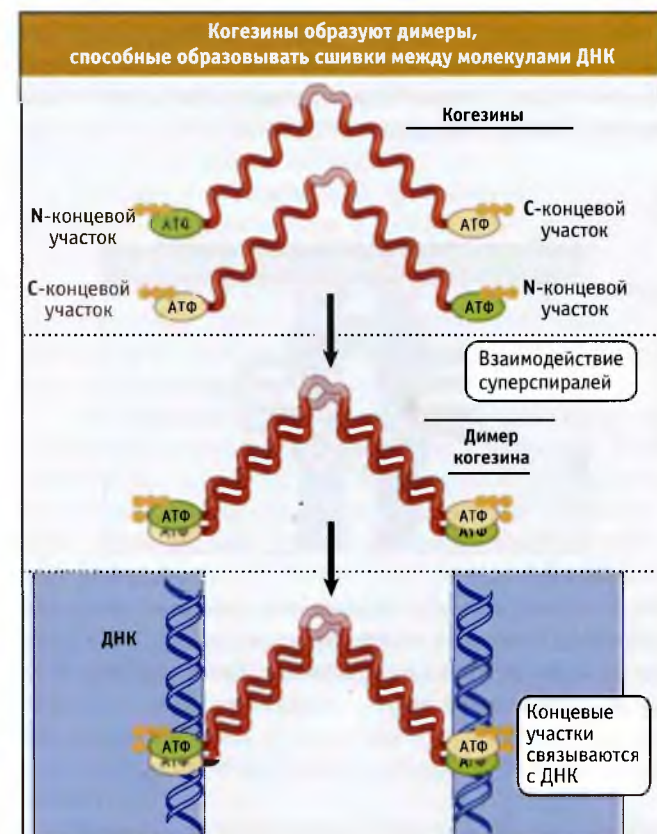
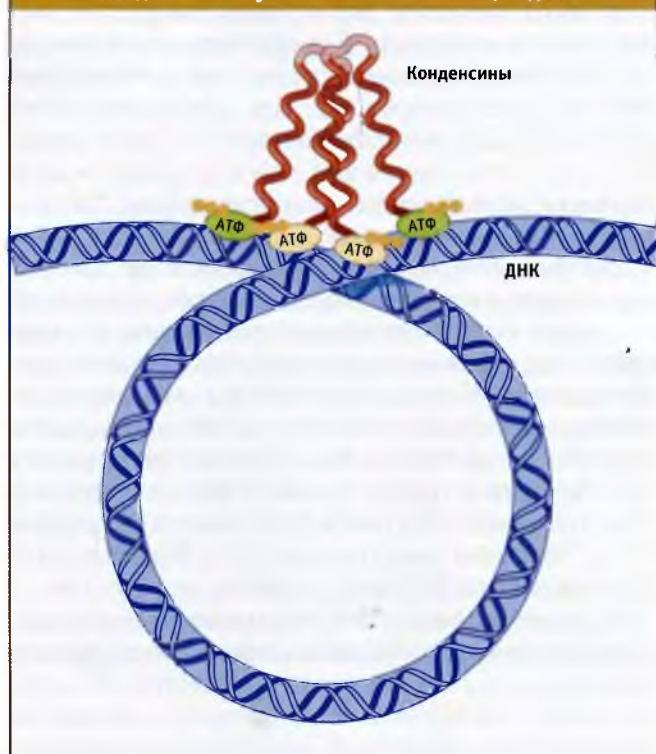


рис. 6.88. SMC белки димеризуются при взаимодействии центральных участков двух суперспиралей, расположенных антипараллельно. Оба концевых участка каждой субъединицы характеризуются присутствием последовательностей, связывающихся с АТФ и ДНК. Когезины могут образовывать протяженные структуры, посредством которых могут связываться две различных молекулы ДНК



Конденсины могут образовывать компактные структуры за счет дополнительного изгиба при участии домена вращения, что приводит к компактизации ДНК

Когезин может образовывать кольцо вокруг ДНК



Когезины могут образовывать димеры за счет межмолекулярных связей, а затем при взаимодействии головок и доменов вращения формировать мультимеры. Такие структуры, окружая две молекулы ДНК, могут удерживать их вместе

мы (). (Напротив, когезины обнаруживаются только на отдельных местах хромосомы.)

Конденсиновый комплекс получил свое название за способность вызывать конденсацию хроматина *in vitro*. Комплекс обладает способностью образовывать положительные супервитки в ДНК, используя энергию гидролиза АТФ и в присутствии топоизомеразы I. Эта

способность контролируется фосфорилированием субъединиц комплекса белков, отличных от SMC, которое происходит в митозе. Мы пока не знаем, каким образом это связано с другими модификациями хроматина, например с фосфорилированием гистонов. Активация конденсинового комплекса, особенно в митозе, подвергает сомнению его участие в образовании интерфазного гетерохроматина.

При других способах компенсации дозы генов происходят глубокие изменения хромосом. У самцов *Drosophila* на X-хромосоме обнаружен комплекс белков. В клетках XX эмбрионов *C. elegans* белковый комплекс ассоциирован с обеими X-хромосомами, однако в ядре XO эмбрионов белковые компоненты остаются распределенными диффузно. Белковый комплекс содержит кор, состоящий из SMC белков, и напоминает конденсиновый комплекс, который в других организмах связан с митотическими хромосомами. Это позволяет предполагать, что комплекс играет структурную роль, обеспечивая более конденсированное, неактивное состояние хромосом. Многочисленные сайты, расположенные на X-хромосоме, могут обеспечивать более полное распределение комплекса по хромосоме. Комплекс связывается с ними и затем распространяется по поверхности хромосомы.

Существует корреляция между активностью хроматина и степенью ацетилирования гистонов, особенно гистонов H3 и H4, которое происходит по сайтам, расположенным на N-терминальных «хвостах». Активация транскрипции связана с ацетилированием поблизости от промотора, и репрессия транскрипции связана с деацетилированием (см. MBIO:6-0007). Наиболее впечатляющая корреляция состоит в том, что в клетках женских особей млекопитающих гистон H4 в составе неактивной X-хромосомы ацетилирован не полностью.

Конденсины расположены вдоль оси хромосомы



Конденсины локализуются по всей длине митотической хромосомы. ДНК выделена красным цветом, а конденсины желтым. Фотография любезно предоставлена Ана Лосада и Татцуи Хирано, Лаборатория в Колд Спринг Харбор

С открытием нуклеосом, оказавшим революционизирующее влияние на состояние наших знаний о строении хроматина, оформились два одновременных направления дальнейших исследований:

- Структурный анализ, описывающий строение самих нуклеосом и способ их дальнейшей организации в структуры более высокого порядка.
- Функциональный анализ нуклеосом, имеющий целью связать события, происходящие при активации хроматина и его транскрипции, со структурными изменениями.

К числу первоочередных вопросов, требующих ответа, относятся вопросы строения 30-нм фибриллы хроматина в контексте структуры нуклеосом и различных составляющих ее белков, а также связанные с механизмами активации и инактивации транскрипции через модификацию нуклеосом.

В 1970-е гг. основными репрессорами транскрипции считались гистоны, которые необходимо было нейтрализовать для того, чтобы ген получил возможность экспрессироваться. Однако предположения о том, каким образом этого можно достигнуть, не выходили за рамки представления об их удалении из состава хроматина с тем, чтобы обеспечить доступ активаторов к ДНК. С учетом состояния наших сегодняшних знаний мы можем считать, что находимся на пути познания взаимосвязи между функционированием хроматина и его строением. Достигнут впечатляющий прогресс в исследовании роли ацетилирования и деацетилирования, а также других ферментативных модификаций гистонов, и мы начинаем понимать, как они изменяют локальную структуру хроматина и обеспечивают активацию промотора. Мы близки к объяснению механизмов активации промотора на основании этих структурных изменений. Рассматривая гистоны как репрессоры, мы начинаем понимать, каким образом при их взаимодействии с другими белками формируются области гетерохроматина, которые наследуются эпигенетически, и могут затрагивать как локальные, так и достаточно обширные области хроматина. Мы ожидаем, что все эти события можно будет описать с точки зрения структурных изменений индивидуальных компонентов, т. е. в терминах молекулярных изменений отдельных гистонов и других белков хроматина.

Понимание всей иерархии высшего уровня организации хромосомы пока еще затруднено. Несмотря на колоссальный прогресс, достигнутый в области изучения генома, мы не до конца понимаем структурные особенности полос и промежутков в хромосомах, роль ГЦ-богатых последовательностей ДНК и т. д. Мы пока не можем связать эти характеристики с ДНК-белковыми взаимодействиями. Даже несмотря на установление структуры 30-нм фибриллы хроматина, остается еще много неизвестного в отношении структур более высокого порядка. Такие существенные детали строения хромосомы как центромеры и теломеры немало способствовали по-

ниманию молекулярной организации ее компонентов, хотя мы пока не в полной мере представляем себе роль последовательностей ДНК в организации центромерной области хромосом высших эукариот.

Так же как и в других областях биологии, возможность связать детали структуры с ее функциональными изменениями обеспечивает более высокий уровень познания процесса.

6.35 Резюме

Генетический материал всех организмов и вирусов находится в форме плотно упакованного нуклеопротеина. В клетках эукариот транскрипционно активный хроматин находится в области эухроматина, который составляет большую часть интерфазного хроматина. Участки гетерохроматина упакованы в 5–10 раз более компактно и не проявляют транскрипционной активности. В момент деления, когда становятся различимы индивидуальные хромосомы, весь хроматин приобретает плотную упаковку. О существовании ультраструктуры хромосом свидетельствует образование G-полос после их прокрашивания красителем Гимза. Эти полосы представляют собой очень большие области (порядка 10^7 пн), с помощью которых можно устанавливать места транслокации отдельных фрагментов или другие изменения структуры хромосом.

У эукариот интерфазный хроматин и метафазные хромосомы организованы в большие петлеобразные структуры. Каждая петля может представлять собой независимый суперспирализованный домен. Основания петлеобразных структур присоединяются к метафазному каркасу хромосомы или к ядерному матриксу по местам специфических последовательностей ДНК.

В области центромеры находится кинетохор, который обеспечивает присоединение хромосомы к митотическому веретену. Обычно центромера окружена гетерохроматином. Центромерные последовательности ДНК идентифицированы только для дрожжей *S. cerevisiae*, у которых они состоят из коротких консервативных элементов — CDE-I и CDE-III, связывающих комплексы CBF1 и CBF3 соответственно, и из протяженной AT-богатой области, которая называется CDE-II. Эта область связывает Cse4p, образуя в хроматине специализированную структуру. Еще одна группа белков, которая связывается с этими комплексами, обеспечивают связь с микротрубочками.

Теломеры обеспечивают стабильность концов хромосомы. Почти все известные теломеры содержат множественные повторы, у которых одна цепь имеет состав $C_n(A/T)_m$, $n > 1$ и $m = 1-4$. Вторая цепь, $C_n(T/A)_m$ содержит выступающий конец, который служит матрицей для добавления оснований в определенном порядке. Фермент теломеразы представляет собой рибонуклеопroteinный комплекс, в котором РНК представляет собой

матрицу для синтеза цепи, богатой гуанином. Благодаря этому решается проблема репликации на самом конце дуплексной структуры. Теломера стабилизирует концы хромосом, поскольку выдающийся одноцепочечный участок $C_n(T/A)_m$ удаляет гомологичные участки в ранних повторяющихся единицах теломеры, образуя петлю, и таким образом, свободные концы не возникают.

Хромосомы типа ламповых щеток у амфибий и политенные хромосомы насекомых характеризуются крайне релаксированной структурой, и коэффициент их упаковки составляет < 100 . Политенные хромосомы *D. melanogaster* разделены на ~5000 полос, размер которых варьирует на порядок и в среднем достигает ~25 пн. Транскрипционно-активные области можно визуализировать даже в более релаксированных («пуффированных») структурах, у которых фибриллы хроматина распространяются от оси хромосомы. Это напоминает изменения, происходящие при транскрипции последовательностей эухроматина.

У эукариот хроматин состоит из нуклеосом. Нуклеосома содержит участок ДНК определенной длины, обычно ~200 пн, обернутый вокруг октамера, состоящего из двух копий каждого гистона H2A, H2B, H3 и H4. С каждой нуклеосомой связана одна молекула гистона H1. Почти вся геномная ДНК организована в нуклеосомы. Обработка нуклеазой микрококков показывает, что ДНК, упакованная в каждую нуклеосому, относится к одной из двух областей. ДНК линкерной области быстро переваривается эндонуклеазой, в то время как входящая в коровую область, размером 146 пн, более устойчива к действию фермента. Гистоны H3 и H4 относятся к числу наиболее консервативных, и тетрамер $H3_2-H4_2$ определяет размеры нуклеосомной частицы. Гистоны H2A и H2B организованы в виде двух димеров H2A-H2B. Октамеры собираются при последовательном добавлении двух димеров H2A-H2B к ядру $H3_2-H4_2$.

Нуклеосомы организованы в фибриллу диаметром 30-нм, которая содержит шесть нуклеосом на виток и характеризуется коэффициентом упаковки 40. При удалении гистона H1 фибрилла раскручивается в 10-нм нить, состоящую из цепи нуклеосом. По-видимому, 30-нм фибрилла состоит из 10-нм нити, закрученной в соленоид. Эта фибрилла является основным компонентом эу- и гетерохроматина; в дальнейшей организации фибриллы в хроматин и хромосомы принимают участие негистоновые белки.

Существуют два пути сборки нуклеосом. Путь, связанный с репликацией, характеризуется активацией фактора сборки нуклеосом, CAF-1, которая происходит под действием процессивной реплисомной субъединицы — PCNA. Фактор CAF-1 обеспечивает фиксацию тетрамера $H3_2-H4_2$ на дочерних дуплексах, образующихся при репликации. Тетрамеры могут образовываться или при разрушении существующих нуклеосом репликативной вилкой, или в результате сборки из вновь синтезированных гистонов. Таким же путем образуются димеры H2A-H2B, которые затем добавляются к тетрамеру $H3_2-H4_2$, необходимому для построения нуклеосомы. Поскольку тетрамеры $H3_2-H4_2$ и димеры H2A-H2B со-

бираются случайным образом, новые нуклеосомы могут содержать как предсуществующие, так и новосинтезированные гистоны.

В ходе транскрипции РНК-полимераза удаляет октамеры гистонов. После прохождения полимеразы по ДНК нуклеосомы образуются вновь. Это наблюдается, когда транскрипция не носит столь интенсивный характер, как, например, в случае рДНК, когда они удаляются полностью. Образование нуклеосом по пути, независимому от репликации, происходит при возмещении октамеров гистонов, которые были удалены при транскрипции. При этом вместо гистона H3 используется его вариант H3.3. По аналогичному пути происходит сборка нуклеосом на центромерных участках ДНК после окончания репликации, и также используется вариант H3 гистона.

Ацетилирование гистонов происходит как при репликации, так и при транскрипции и необходимо для образования менее компактной структуры хроматина. Некоторые белки, способствующие связыванию факторов транскрипции с ее основным аппаратом, проявляют ацетилазную активность по отношению к гистонам. Напротив, репрессоры часто ассоциированы с деацетилазной активностью. Ферменты модификации обычно проявляют специфичность по отношению к определенным аминокислотам в определенных гистонах. Наиболее общие сайты модификации локализованы на N-терминальных концах гистонов H3 и H4, которые выступают из нуклеосом между витками ДНК. Комплексы активации (или репрессии) обычно достигают больших размеров и часто характеризуются наличием нескольких ферментативных активностей, участвующих в различных модификациях компонентов хроматина.

Образование гетерохроматина происходит с участием белков, которые связываются со специфическими областями хромосом (таких, как теломеры) и взаимодействуют с гистонами. Образование неактивной структуры может распространяться вдоль фибриллы хроматина, начиная от центра инициации. Аналогичные события происходят в молчащих локусах типа спаривания у дрожжей.

Гетерохроматин начинает формироваться на определенных местах, и затем области распространяются на расстояние, величина которого не поддается точному определению. Когда гетерохроматин окончательно сформировался, характер распределения его областей наследуется в ходе протекания нескольких последовательных актов клеточного деления. Это служит примером эпигенетической наследственности, при которой две одинаковые последовательности ДНК могут быть связаны с различными белковыми структурами и поэтому обладают различной способностью к экспрессии. Таким образом объясняется наличие эффекта положения мозаичного типа у *Drosophila*.

Модификации «хвостов» гистонов запускают процесс реорганизации хроматина. Ацетилирование обычно связано с активацией генов. Ацетилазы гистонов присутствуют в комплексах активации, а деацетилазы — в комплексах инактивации. Метилирование гистонов со-

пряжено с инактивацией генов. Некоторые модификации гистонов могут проявлять синергический эффект.

Причина существования неактивного хроматина в теломерной области и в локусах типа спаривания у дрожжей связана с взаимодействием некоторых белков с N-терминальными «хвостами» гистонов H3 и H4. Образование неактивного комплекса может инициироваться связыванием одного белка на специфической последовательности ДНК; затем другие компоненты могут кооперативно связываться вдоль хромосомы.

Инактивация одной X-хромосомы у женских особей млекопитающих (у плацентарных) происходит случайным образом. Для подсчета числа X-хромосом необходимым и достаточным является локус *Xic*. Правило n-1 обеспечивает инактивацию всех X-хромосом, кроме одной. Локус *Xic* содержит ген *Xist*, кодирующий РНК, которая экспрессируется только в неактивной X-хромосоме. Стабилизация этой РНК представляет собой механизм, посредством которого одна X-хромосома поддерживается в неактивном состоянии.

Список литературы

6.3 Хромосомы обладают характерной полосатостью

Исследование

International Human Genome Sequencing Consortium, 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* v. 409 p. 860–921.

Saccone, S., De Sario, A., Wiegant, J., Raap, A. K., Della Valle, G., and Bernardi, G., 1993. Correlations between isochores and chromosomal bands in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 90 p. 11929–11933.

Venter, J. C., et al., 2001. The sequence of the human genome. *Science* v. 291 p. 1304–1350.

6.4 В молекуле ДНК эукариот существуют петли и домены, посредством которых она прикрепляется к опорным структурам

Исследование

Postow, L., Hardy, C. D., Arsuaga, J., and Cozzarelli, N. R., 2004. Topological domain structure of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev.* v. 18 p. 1766–1779.

6.6 Существенную роль в сегрегации хромосом играет центромера

Обзор

Hyman, A. A. and Sorger, P. K., 1995. Structure and function of kinetochores in budding yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 11 p. 471–495.

6.7 Центромеры хромосом *S. cerevisiae* содержат короткие последовательности ДНК

Обзор

Blackburn, E. H. and Szostak, J. W., 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* v. 53 p. 163–194.

Clarke, L., and Carbon, J., 1985. The structure and function of yeast centromeres. *Annu. Rev. Genet.* v. 19 p. 29–56.

Исследование

Fitzgerald-Hayes, M., Clarke, L., and Carbon, J., 1982. Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell* v. 29 p. 235–244.

6.8 Центромера связывает белковый комплекс

Обзор

Kitagawa, K., and Hieter, P., 2001. Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 2 p. 678–687.

Исследование

Lechner, J., and Carbon, J., 1991. A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. *Cell* v. 64 p. 717–725.

Meluh, P. B., and Koshland, D., 1997. Budding yeast centromere composition and assembly as revealed by in vitro cross-linking. *Genes Dev.* v. 11 p. 3401–3412.

Meluh, P. B., et al., 1998. Cse4p is a component of the core centromere of *S. cerevisiae*. *Cell* v. 94 p. 607–613.

Ortiz, J., Stemmann, O., Rank, S., and Lechner, J., 1999. A putative protein complex consisting of Ctf19, Mcm21, and Okp1 represents a missing link in the budding yeast kinetochore. *Genes Dev.* v. 13 p. 1140–1155.

6.9 В области центромеры могут содержаться повторяющиеся последовательности ДНК

Обзор

Wiens, G. R., and Sorger, P. K., 1998. Centromeric chromatin and epigenetic effects in kinetochore assembly. *Cell* v. 93 p. 313–316.

Исследование

Copenhaver, G. P., et al., 1999. Genetic definition and sequence analysis of Arabidopsis centromeres. *Science* v. 286 p. 2468–2474.

Haaf, T., Warburton, P. E., and Willard, H. F., 1992. Integration of human alpha-satellite DNA into simian chromosomes: Centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation. *Cell* v. 70 p. 681–696.

Sun, X., Wahlstrom, J., and Karpen, G., 1997. Molecular structure of a functional Drosophila centromere. *Cell* v. 91 p. 1007–1019.

6.10 Теломеры реплицируются по особому механизму

Обзор

Blackburn, E. H., and Szostak, J. W., 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu. Rev. Biochem.* v. 53 p. 163–194.

Zakian, V. A., 1989. Structure and function of telomeres. *Annu. Rev. Genet.* v. 23 p. 579–604.

Исследование

Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R., 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* v. 277 p. 955–959.

Wellinger, R. J., Ethier, K., Labrecque, P., and Zakian, V. A., 1996. Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* v. 85 p. 423–433.

6.11 Теломеры замыкают концы хромосом

Исследование

Griffith, J. D., et al., 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* v. 97 p. 503–514.

Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T., 1999. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* v. 283 p. 1321–1325.

van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T., 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* v. 92 p. 401–413.

6.15 Основной структурной единицей хроматина является нуклеосом

Обзор

Kornberg, R. D., 1977. Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* v. 46 p. 931–954.

McGhee, J. D., and Felsenfeld, G., 1980. Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem.* v. 49 p. 1115–1156.

Исследование

Kornberg, R. D., 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* v. 184 p. 868–871.

Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A., 1984. Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature* v. 311 p. 532–537.

6.16 ДНК обернута вокруг множества нуклеосом

Исследование

Finch, J. T. et al., 1977. Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* v. 269 p. 29–36.

6.17 Нуклеосомы обладают одинаковой структурой

Исследование

Shen, X., et al., 1995. Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vitro. *Cell* v. 82 p. 47–56.

6.18 Различная структура ДНК на поверхности нуклеосом

Обзор

Travers, A. A., and Klug, A., 1987. The bending of DNA in nucleosomes and its wider implications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 317 p. 537–561.

Wang, J., 1982. The path of DNA in the nucleosome. *Cell* v. 29 p. 724–726.

Исследование

Richmond, T. J., and Davey, C. A., 2003. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* v. 423 p. 145–150.

6.19 Организация октамера гистонов

Исследование

Angelov, D., Vitolo, J. M., Mutskov, V., Dimitrov, S., and Hayes, J. J., 2001. Preferential interaction of the core histone tail domains with linker DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 6599–6604.

Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B.-C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N., 1991. The nucleosomal core histone

octamer at 31 Å resolution: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 88 p. 10148–10152.

Luger, K., et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 28 Å resolution. *Nature* v. 389 p. 251–260.

6.20 Организация нуклеосом в фибрилле хроматина

Обзор

Felsenfeld, G. and McGhee, J. D., 1986. Structure of the 30 nm chromatin fiber. *Cell* v. 44 p. 375–377.

Исследование

Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R. R., and Richmond, T. J., 2004. Nucleosome arrays reveal the two-start organization of the chromatin fiber. *Science* v. 306 p. 1571–1573.

6.21 Репродукция хроматина требует сборки нуклеосом

Обзор

Osley, M. A., 1991. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* v. 60 p. 827–861.

Verreault, A., 2000. De novo nucleosome assembly: New pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* v. 14 p. 1430–1438.

Исследование

Ahmad, K., and Henikoff, S., 2002. The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* v. 9 p. 1191–1200.

Ahmad, K., and Henikoff, S., 2001. Centromeres are specialized replication domains in heterochromatin. *J. Cell Biol.* v. 153 p. 101–110.

Gruss, C., Wu, J., Koller, T., and Sogo, J. M., 1993. Disruption of the nucleosomes at the replication fork. *EMBO J.* v. 12 p. 4533–4545.

Ray-Gallet, D., Quivy, J. P., Scamps, C., Martini, E. M., Lipinski, M., and Almouzni, G., 2002. HIRA is critical for a nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Mol. Cell* v. 9 p. 1091–1100.

Shibahara, K., and Stillman, B., 1999. Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* v. 96 p. 575–585.

Smith, S., and Stillman, B., 1989. Purification and characterization of CAF-1, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication *in vitro*. *Cell* v. 58 p. 15–25.

Smith, S., and Stillman, B., 1991. Stepwise assembly of chromatin during DNA replication in vitro. *EMBO J.* v. 10 p. 971–980.

Yu, L., and Gorovsky, M. A., 1997. Constitutive expression, not a particular primary sequence, is the important feature of the H3 replacement variant hv2 in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* v. 17 p. 6303–6310.

6.23 Домены определяют области, содержащие активные гены

Исследование

Stalder, J. et al., 1980. Tissue-specific DNA cleavage in the globin chromatin domain introduced by DNAase I. *Cell* v. 20 p. 451–460.

- 6.24** **Организованы ли транскрибирующиеся гены в нуклеосомы?**
- Обзор**
- Kornberg, R. D., and Lorch, Y., 1992. Chromatin structure and transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 8 p. 563–587.
- 6.25** **При транскрипции октамеры гистонов удаляются**
- Исследование**
- Cavalli, G., and Thoma, F., 1993. Chromatin transitions during activation and repression of galactose-regulated genes in yeast. *EMBO J.* v. 12 p. 4603–4613.
- Studitsky, V. M., Clark, D. J., and Felsenfeld, G., 1994. A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template. *Cell.* v. 76 p. 371–382.
- 6.26** **Удаление нуклеосом и их последующая сборка требуют участия специфических факторов**
- Исследование**
- Belotserkovskaya, R., Oh, S., Bondarenko, V. A., Orphanides, G., Studitsky, V. M., and Reinberg, D., 2003. FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration. *Science* v. 301 p. 1090–1093.
- Saunders, A., Werner, J., Andrulis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D., and Lis, J. T., 2003. Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin *in vivo*. *Science* v. 301 p. 1094–1096.
- 6.27** **Сайты с повышенной чувствительностью к ДНКазе меняют структуру хроматина**
- Обзор**
- Gross, D. S., and Garrard, W. T., 1988. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* v. 57 p. 159–197.
- Исследование**
- Moyné, G., Harper, F., Saragosti, S., and Yaniv, M., 1982. Absence of nucleosomes in a histone-containing nucleoprotein complex obtained by dissociation of purified SV40 virions. *Cell* v. 30 p. 123–130.
- Scott, W. A., and Wigmore, D. J., 1978. Sites in SV40 chromatin which are preferentially cleaved by endonucleases. *Cell* v. 15 p. 1511–1518.
- Varshavsky, A. J., Sundin, O., and Bohn, M. J., 1978. SV40 viral minichromosome: Preferential exposure of the origin of replication as probed by restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* v. 5 p. 3469–3479.
- 6.28** **Ремоделирование хроматина представляет собой активный процесс**
- Обзор**
- Becker, P. B., and Horz, W., 2002. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu. Rev. Biochem.* v. 71 p. 247–273.
- Felsenfeld, G., 1992. Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* v. 355 p. 219–224.
- Grunstein, M., 1990. Histone function in transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* v. 6 p. 643–678.
- Jenuwein, T., and Allis, C. D., 2001. Translating the histone code. *Science* v. 293 p. 1074–1080.
- Narlikar, G. J., Fan, H. Y., and Kingston, R. E., 2002. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* v. 108 p. 475–487.
- Peterson, C. L., and Côté, J., 2004. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev.* v. 18 p. 602–616.
- Tsukiyama, T., 2002. The *in vivo* functions of ATP-dependent chromatin-remodelling factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 422–429.
- Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L., 2000. ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Mol. Cell Biol.* v. 20 p. 1899–1910.
- Исследование**
- Cairns, B. R., Kim, Y.-J., Sayre, M. H., Laurent, B. C., and Kornberg, R., 1994. A multisubunit complex containing the SWI/ADR6, SWI2/1, SWI3, SNF5, and SNF6 gene products isolated from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 91 p. 1950–622.
- Cote, J., Quinn, J., Workman, J. L., and Peterson, C. L., 1994. Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science* v. 265 p. 53–60.
- Gavin, I., Horn, P. J., and Peterson, C. L., 2001. SWI/SNF chromatin remodeling requires changes in DNA topology. *Mol. Cell* v. 7 p. 97–104.
- Hamiche, A., Kang, J. G., Dennis, C., Xiao, H., and Wu, C., 2001. Histone tails modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 14316–14321.
- Kadam, S., McAlpine, G. S., Phelan, M. L., Kingston, R. E., Jones, K. A., and Emerson, B. M., 2000. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.* v. 14 p. 2441–2451.
- Kingston, R. E., and Narlikar, G. J., 1999. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* v. 13 p. 2339–2352.
- Kwon, H., Imbaizano, A. N., Khavari, P. A., Kingston, R. E., and Green, M. R., 1994. Nucleosome disruption and enhancement of activator binding of human SWI/SNF complex. *Nature* v. 370 p. 477–481.
- Logie, C., and Peterson, C. L., 1997. Catalytic activity of the yeast SWI/SNF complex on reconstituted nucleosome arrays. *EMBO J.* v. 16 p. 6772–6782.
- Lorch, Y., Cairns, B. R., Zhang, M., and Kornberg, R. D., 1998. Activated RSC-nucleosome complex and persistently altered form of the nucleosome. *Cell* v. 94 p. 29–34.
- Lorch, Y., Zhang, M., and Kornberg, R. D., 1999. Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell* v. 96 p. 389–392.
- Peterson, C. L., and Herskowitz, I., 1992. Characterization of the yeast SWI1, SWI2, and SWI3 genes, which encode a global activator of transcription. *Cell* v. 68 p. 573–583.
- Robert, F., Young, R. A., and Struhl, K., 2002. Genome-wide location and regulated recruitment of the RSC nucleosome remodeling complex. *Genes Dev.* v. 16 p. 806–819.
- Schnitzler, G., Sif, S., and Kingston, R. E., 1998. Human SWI/SNF interconverts a nucleosome between its base state and a stable remodeled state. *Cell* v. 94 p. 17–27.
- Tamkun, J. W., Deuring, R., Scott, M. P., Kissinger, M., Pattatucci, A. M., Kaufman, T. C., and Kennison, J. A., 1992. Brahma: A regulator of *Drosophila* homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell* v. 68 p. 561–572.
- Tsukiyama, T., Daniel, C., Tamkun, J., and Wu, C., 1995. ISWI, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. *Cell* v. 83 p. 1021–1026.

Isukiyama, T., Palmer, T., Landel, T., Shiohach, J., and Wu, C., 1999. Characterization of the imitation switch subfamily of ATP-dependent chromatin-remodeling factors in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.* v. 13 p. 686–697.

Whitehouse, I., Flaus, A., Cairns, B. R., White, M. F., Workman, J. L., and Owen-Hughes, T., 1999. Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature* v. 400 p. 784–787.

Yudkovsky, N., Logie, C., Hahn, S., and Peterson, C. L., 1999. Recruitment of the SWI/SNF chromatin remodeling complex by transcriptional activators. *Genes Dev.* v. 13 p. 2369–2374.

6.29 Ацетилирование гистонов связано с генетической активностью

Обзор

Hirose, Y., and Manley, J. L., 2000. RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* v. 14 p. 1415–1429.

Orphanides, G., and Reinberg, D., 2000. RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* v. 407 p. 471–475.

Richards, E. J., Elgin, S. C., and Richards, S. C., 2002. Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: Rounding up the usual suspects. *Cell* v. 108 p. 489–500.

Verreault, A., 2000. De novo nucleosome assembly: new pieces in an old puzzle. *Genes Dev.* v. 14 p. 1430–1438.

Исследование

Akhtar, A., and Becker, P. B., 2000. Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol. Cell* v. 5 p. 367–375.

Bortvin, A., and Winston, F., 1996. Evidence that Spt6p controls chromatin structure by a direct interaction with histones. *Science* v. 272 p. 1473–1476.

Cosma, M. P., Tanaka, T., and Nasmyth, K., 1999. Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle- and developmentally regulated promoter. *Cell* v. 97 p. 299–311.

Hassan, A. H., Neely, K. E., and Workman, J. L., 2001. Histone acetyltransferase complexes stabilize swi/snf binding to promoter nucleosomes. *Cell* v. 104 p. 817–827.

Jackson, V., Shires, A., Tanphaichitr, N., and Chalkley, R., 1976. Modifications to histones immediately after synthesis. *J. Mol. Biol.* v. 104 p. 471–483.

Ling, X., Harkness, T. A., Schultz, M. C., Fisher-Adams, G., and Grunstein, M., 1996. Yeast histone H3 and H4 amino termini are important for nucleosome assembly in vivo and in vitro: Redundant and position-independent functions in assembly but not in gene regulation. *Genes Dev.* v. 10 p. 686–699.

Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S., and Reinberg, D., 1998. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. *Cell* v. 92 p. 105–116.

Shibahara, K., Verreault, A., and Stillman, B., 2000. The N-terminal domains of histones H3 and H4 are not necessary for chromatin assembly factor-1-mediated nucleosome assembly onto replicated DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 7766–7771.

Turner, B. M., Birley, A. J., and Lavender, J., 1992. Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* v. 69 p. 375–384.

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G. A., Winston, F., Buratowski, S., and Handa, H., 1998. DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes Dev.* v. 12 p. 343–356.

6.30 Гетерохроматин формируется за счет распространения события нуклеации

Исследование

Ahmad, K., and Henikoff, S., 2001. Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Cell* v. 104 p. 839–847.

6.31 Образование гетерохроматина зависит от взаимодействия белков с гистонами

Обзор

Loo, S., and Rine, J., 1995. Silencing and heritable domains of gene expression. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 11 p. 519–548.

Moazed, D., 2001. Common themes in mechanisms of gene silencing. *Mol. Cell* v. 8 p. 489–498.

Rusche, L. N., Kirchmaier, A. L., and Rine, J., 2003. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* v. 72 p. 481–516.

Thompson, J. S., Hecht, A., and Grunstein, M., 1993. Histones and the regulation of heterochromatin in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* v. 58 p. 247–256.

Zhang, Y., and Reinberg, D., 2001. Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* v. 15 p. 2343–2360.

Исследование

Ahmad, K., and Henikoff, S., 2001. Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Cell* v. 104 p. 839–847.

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T., 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* v. 410 p. 120–124.

Cheutin, T., McNairn, A. J., Jenuwein, T., Gilbert, D. M., Singh, P. B., and Misteli, T., 2003. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* v. 299 p. 721–725.

Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., and Grunstein, M., 1995. Histone H3 and H4 N-termini interact with the silent information regulators SIR3 and SIR4: A molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* v. 80 p. 583–592.

Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., and Guarente, L., 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* v. 403 p. 795–800.

James, T. C., and Elgin, S. C., 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *D. melanogaster* and its gene. *Mol. Cell Biol.* v. 6 p. 3862–3872.

Kayne, P. S., Kim, U. J., Han, M., Mullen, R. J., Yoshizaki, F., and Grunstein, M., 1988. Extremely conserved histone H4 N terminus is dispensable for growth but essential for repressing the silent mating loci in yeast. *Cell* v. 55 p. 27–39.

- Koonin, E. V., Zhou, S., and Lucchesi, J. C., 1995. The chromo superfamily: new members, duplication of the chromo domain and possible role in delivering transcription regulators to chromatin. *Nucleic Acids Res.* v. 23 p. 4229–4233.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T., 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* v. 410 p. 116–120.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S. T., Heller, R. C., Stebbins, J., Pillus, L., and Sternglanz, R., 2000. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 5807–5811.
- Manis, J. P., Gu, Y., Lansford, R., Sonoda, E., Ferrini, R., Davidson, L., Rajewsky, K., and Alt, F. W., 1998. Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J. Exp. Med.* v. 187 p. 2081–2089.
- Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D., 1994. Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* v. 8 p. 2257–2269.
- Nakagawa, H., Lee, J. K., Hurwitz, J., Allshire, R. C., Nakayama, J., Grewal, S. I., Tanaka, K., and Murakami, Y., 2002. Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin-specific histone tail modifications. *Genes Dev.* v. 16 p. 1766–1778.
- Nakayama, J., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D., and Grewal, S. I., 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* v. 292 p. 110–113.
- Palladino, F., Laroche, T., Gilson, E., Axelrod, A., Pillus, L., and Gasser, S. M., 1993. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell* v. 75 p. 543–555.
- Platero, J. S., Hartnett, T., and Eissenberg, J. C., 1995. Functional analysis of the chromo domain of HP1. *EMBO J.* v. 14 p. 3977–3986.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., and Reuter, G., 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *EMBO J.* v. 21 p. 1121–1131.
- Sekinger, E. A., and Gross, D. S., 2001. Silenced chromatin is permissive to activator binding and PIC recruitment. *Cell* v. 105 p. 403–414.
- Shore, D., and Nasmyth, K., 1987. Purification and cloning of a DNA-binding protein from yeast that binds to both silencer and activator elements. *Cell* v. 51 p. 721–732.
- Smith, J. S., Brachmann, C. B., Celic, I., Kenna, M. A., Muhammad, S., Starai, V. J., Avalos, J. L., Escalante-Semerena, J. C., Grubmeyer, C., Wolberger, C., and Boeke, J. D., 2000. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 97 p. 6658–6663.

6.32 X-хромосомы подвергаются глубоким изменениям

Обзор

- Plath, K., Mlynarczyk-Evans, S., Nusinow, D. A., and Panning, B., 2002. Xist RNA and the mechanism of x chromosome inactivation. *Annu. Rev. Genet.* v. 36 p. 233–278.

Исследование

- Jeppesen, P., and Turner, B. M., 1993. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* v. 74 p. 281–289.
- Lee, J. T. et al., 1996. A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. *Cell* v. 86 p. 83–94.
- Lyon, M. F., 1961. Gene action in the X chromosome of the mouse. *Nature* v. 190 p. 372–373.
- Panning, B., Dausman, J., and Jaenisch, R., 1997. X chromosome inactivation is mediated by Xist RNA stabilization. *Cell* v. 90 p. 907–916.
- Penny, G. D., et al., 1996. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* v. 379 p. 131–137.

6.33 Конденсация хромосом происходит под действием конденсинов

Обзор

- Hirano, T., 2000. Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu. Rev. Biochem.* v. 69 p. 115–144.
- Hirano, T., 1999. SMC-mediated chromosome mechanics: A conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev.* v. 13 p. 11–19.
- Hirano, T., 2002. The ABCs of SMC proteins: Two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* v. 16 p. 399–414.
- Jessberger, R., 2002. The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 3 p. 767–778.
- Nasmyth, K., 2002. Segregating sister genomes: The molecular biology of chromosome separation. *Science* v. 297 p. 559–565.

Исследование

- Csankovszki, G., McDonel, P., and Meyer, B. J., 2004. Recruitment and spreading of the *C. elegans* dosage compensation complex along X chromosomes. *Science* v. 303 p. 1182–1185.
- Haering, C. H., Lowe, J., Hochwage, A., and Nasmyth, K., 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Mol. Cell* v. 9 p. 773–788.
- Kimura, K., Rybenkov, V. V., Crisona, N. J., Hirano, T., and Cozzarelli, N. R., 1999. 13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: Implications for chromosome condensation. *Cell* v. 98 p. 239–248.

Микротрубочки

Линн Кассимери

Отдел биологии университета Лихай, Вифлеем, ПА

Эпителиальная клетка человека. Видны микротрубочки (окрашены зеленым) и ДНК (окрашена красным). Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай



КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛАВЫ

- 7.1** Введение
 - 7.2** Общие функции микротрубочек
 - 7.3** Микротрубочки представляют собой поляризованные полимеры α - и β -тубулина
 - 7.4** Очищенные субъединицы тубулина собираются в микротрубочки
 - 7.5** Сборка и разборка микротрубочек происходят в ходе специфического процесса, который обозначается как динамическая нестабильность
 - 7.6** Кэп ГТФ-тубулиновых субъединиц регулирует переходы динамической нестабильности
 - 7.7** Для инициации сборки клетки используют центры организации микротрубочек
 - 7.8** Динамика микротрубочек в клетках
 - 7.9** Зачем в клетках присутствуют динамичные микротрубочки?
 - 7.10** Для регуляции стабильности микротрубочек клетки используют несколько групп белков
 - 7.11** Общие представления о моторных белках микротрубочек
 - 7.12** Как работают моторные белки
 - 7.13** Каким образом карго связывается с соответствующим мотором
 - 7.14** Динамика микротрубочек и моторы совместно создают асимметричную организацию клетки
 - 7.15** Взаимодействие между микротрубочками и актиновыми филаментами
 - 7.16** Реснички и жгутики являются подвижными структурами
 - 7.17** Что дальше?
 - 7.18** Резюме
 - 7.19** Приложение: Что бы происходило, если бы тубулин не гидролизует ГТФ?
 - 7.20** Приложение: Метод восстановления флюоресценции после фотообесцвечивания
 - 7.21** Приложение: Синтез и модификация тубулина
 - 7.22** Приложение: Методы изучения подвижности моторных белков микротрубочек
- Список литературы

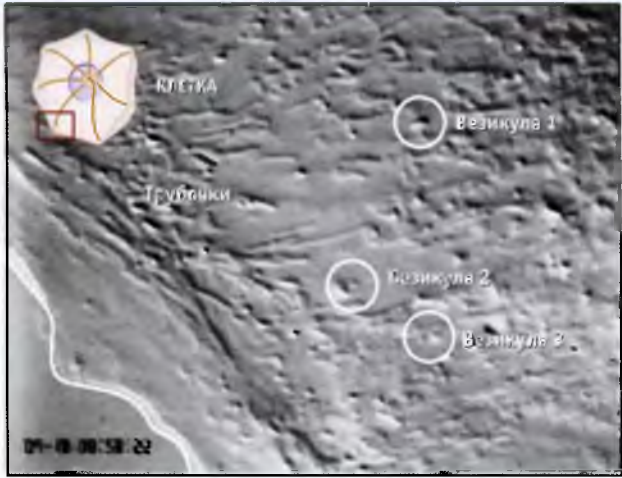
7.1 Введение

Основные положения

- Цитоскелет состоит из полимеров белковой природы. Каждый полимер состоит из нескольких тысяч идентичных субъединиц, связанных вместе с образованием филаментов
- Цитоскелет обеспечивает движение клеток и их механическую поддержку
- Клеточный цитоскелет состоит из трех типов полимеров: актиновые филаменты, промежуточные филаменты и микротрубочки
- Все полимеры имеют динамическую природу; они постоянно наращивают и теряют субъединицы
- Микротрубочки представляют собой полимеры субъединиц тубулина
- Микротрубочки почти всегда функционируют вместе с молекулярными моторами, которые генерируют усилия, осуществляя движение везикул и других комплексов по поверхности микротрубочек
- Реснички и жгутики представляют собой специализированные органеллы, состоящие из микротрубочек и моторных белков, которые обеспечивают движение клеток в жидкой среде или движение жидкости вдоль клеточной поверхности
- Химические соединения, разрушающие микротрубочки, применяются в медицине и в сельском хозяйстве

Цитоплазма эукариотических клеток находится в постоянном движении, поскольку органеллы все время перемещаются с места на место. Это движение особенно заметно в цитоплазме крупных клеток удлинённой формы, таких как нейроны (см. рис. 1). Движение цитоплазмы отмечается также и в других клетках (см. рис. 2).

Движение в цитоплазме



Участок цитоплазмы, примыкающий к краю клетки. Видны много везикул и часть тубулярных мембран, вероятно, ЭПР или митохондрии.

Фотография представляет собой кадр видеоизображения. Виден небольшой участок цитоплазмы клетки млекопитающих. Слева внизу виден край клетки; ядро находится справа вверху и не видно в кадре. Видео съемка показывает, что большая часть везикул находится в постоянном движении. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай

Движение органелл в аксоне



Показан небольшой участок аксона нейрона. Видно множество небольших органелл (показаны стрелками)



Почти все органеллы находятся в постоянном движении. Некоторые иногда задерживаются на месте или начинают двигаться в обратном направлении, однако большинство постоянно движется вдоль аксона

Три кадра видеоизображения аксона живого нейрона. На верхнем кадре схематически изображена вся нервная клетка. Три везикулы, помеченные красной, желтой и голубой стрелками, наблюдались на протяжении 6 с. Две везикулы движутся в направлении конца аксона, а одна в направлении тела клетки. Фотография любезно предоставлена Полом Форшером, Йельский университет

Движение оргanelл необходимо для выполнения ряда функций. Секреторные везикулы выходят из аппарата Гольджи, который расположен в середине клетки, и транспортируются к плазматической мембране, где экскретируют свое содержимое в межклеточную среду. В то же время везикулы, интернализированные в мембрану, транспортируются в эндосомы. Митохондрии все время находятся в движении, а ЭПР постоянно растягивается и реорганизуется. В митотических клетках хромосомы вначале выстраиваются в метафазную пластинку, а затем расходятся в противоположные стороны. Движение оргanelл и хромосом в правильном направлении и в надлежащее время обеспечивается **цитоскелетом**, который представляет собой белковые структуры, формирующие рельсовую транспортную систему клетки и моторных белков,двигающихся по ним.

Цитоскелет также обладает другими важными функциями: он обеспечивает подвижность клеток, а также необходим для организации и структурной поддержки формы всех клеток. Многие клетки движутся или самостоятельно, например находясь в организме (клетки животных), или перемещаясь с током окружающей среды (одноклеточные организмы и гаметы). Клетки, подобные белым кровяным клеткам, которые находят и разрушают патогенные бактерии, способны перемещаться по плоской поверхности. Другие, например сперматозоиды, чтобы достигнуть места назначения, передвигаются в жидкой среде. Цитоскелет обеспечивает все формы такого движения клеток и его направление. Наряду с кинематической функцией, цитоскелет обеспечивает организацию внутренней структуры клетки и формирует верхнюю и нижнюю, левую и правую, а также переднюю и заднюю ее части. Определяя общую характеристику цитоплазмы, цитоскелет задает общую форму клетки, образуя прямоугольные эпителиальные клетки, нейроны с длинными тонкими аксонами, и дендриты, которые у человека в длину могут достигать одного метра.

Цитоскелет состоит из трех основных типов структурных элементов: микротрубочек, **микрофиламентов** (см. 8 *Актин*) и промежуточных филаментов (см. 9 *Промежуточные филаменты*). Эти три типа структур, представленные на *рис. 7.3*, имеют много общих свойств. Каждый белок функционирует не как самостоятельная молекула, а как полимер, состоящий из множества идентичных белковых субъединиц. Подобно тому, как бусины, нанизанные на нитку, образуют ожерелье, полимеры цитоскелета выстраиваются в цитоплазме, связывая между собой тысячи белковых субъединиц. Основная особенность всех полимеров цитоскелета состоит в том, что они не представляют собой статические структуры, а постоянно наращивают и теряют субъединицы. Такая динамичная природа полимеров цитоскелета позволяет осуществлять его реорганизацию, образовывать новые или способствовать функционированию существующих транспортных путей в соответствии с внутриклеточными нуждами.

Хотя все три типа структурных белков проявляют общие свойства, каждый из них обладает уникальнос-

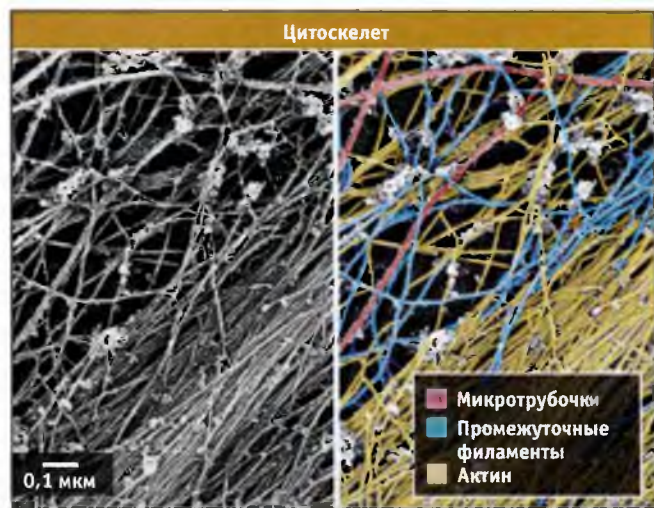


РИС. 7.3. Участок фибробласта в электронном микроскопе (слева). Видны многочисленные филаменты. На снимке справа три типа полимеров, из которых состоит цитоскелет эукариотической клетки, выделены различным цветом. Фотография любезно предоставлена Татьяной Свиткиной. Воспроизведено из *J. Struct. Biol.*, vol. 115, Svitkina, T. et al., *Improved Procedures ...* pp. 290–303. © 1995 с разрешения Elsevier

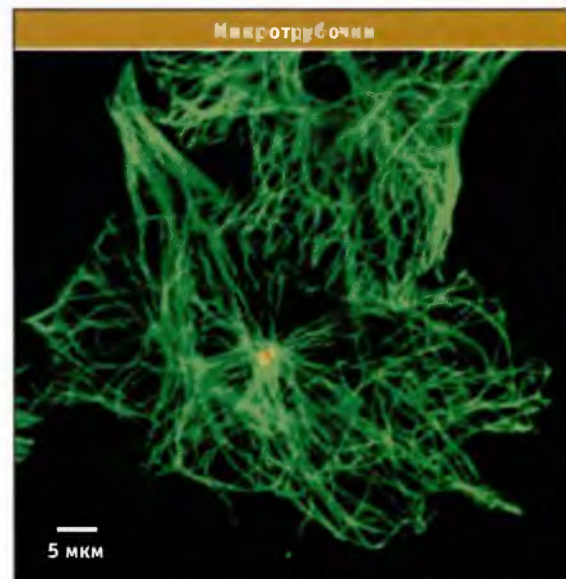


РИС. 7.4. Микротрубочки в фибробласте. Для визуализации микротрубочек клетки обрабатывали красителем, флуоресцирующим зеленым цветом. Микротрубочки организованы вокруг центральной точки (помеченной красным цветом) и распространяются в цитоплазму. Большинство микротрубочек обладает достаточной длиной для того, чтобы проникнуть из одной части клетки в другую. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай

тью, что делает его наиболее соответствующим выполнению определенных задач в клетке. Поэтому три типа полимеров будут рассмотрены отдельно, хотя они часто функционируют совместно.

Настоящая глава посвящается микротрубочкам. Основная субъединица, образующая микротрубочки, представляет собой белок тубулин. Соединяясь между собой, молекулы тубулина образуют полые трубочки около 25 нм в диаметре. Отсюда они получили свое название. Одна микротрубочка может содержать десятки и сотни тысяч молекул тубулина и в длину достигать нескольких микрон. Таким образом, микротрубочки способны распространяться более чем на половину длины большинства эукариотических клеток. Обычно интерфазные клетки содержат сотни длинных микротрубочек, проходящих через цитоплазму и соединяющих различные области клетки (Рис. 7.4).

Микротрубочки почти всегда функционируют совместно с молекулярными моторами, которые по ним продвигаются (см. 7.12 *Как работают моторные белки*). Эти моторные белки присоединяются к различным грузам, включая органеллы и везикулы, и транспортируют их по поверхности микротрубочек, подобно тому, как грузовики движутся по шоссе на дорогах. Микротрубочки и моторные белки также функционируют вместе при разделении реплицированных хромосом в митозе (см. 10 *Митоз*) и образуют основу подвижных структур, которые используются клеткой для перемещения в жидкости или для обеспечения движения жидкости вдоль ее поверхности (см. 7.16 *Реснички и жгутики являются подвижными структурами*). Микротрубочки и моторные белки даже используются вирусами, например ВИЧ и аденовирусами, для того чтобы они могли быстро достигнуть ядра и реплицироваться.

Небольшие молекулы органических соединений, которые нарушают полимеризацию микротрубочек, используются в медицине и в сельском хозяйстве. Вещества, в той или иной степени способные стабилизировать микротрубочки, блокируют митоз и применяются как средства для лечения рака. Одним из таких веществ является паклитаксел (Таксол™), формула которого представлена на Рис. 7.5 и который используется для лечения рака яичников и молочной железы. Таксол связывается с микротрубочками и стабилизирует их, предотвращая диссоциацию субъединиц тубулина. Колхицин (см. рис. 7.5) представляет собой еще один яд, оказывающий на микротрубочки противоположный эффект, т. е. вызывает их диссоциацию. Препарат используется для лечения подагры, поскольку разрушение микротрубочек блокирует миграцию белых кровяных клеток, ответственных за воспалительный процесс при этом заболевании. Низкомолекулярные вещества, влияющие на тубулин, находят важное применение в сельском хозяйстве. Например, Зоксамид™ (см. рис. 7.5) является фунгицидом, который специфически связывается с тубулинами грибов, тем самым предотвращая их рост. Препарат используется

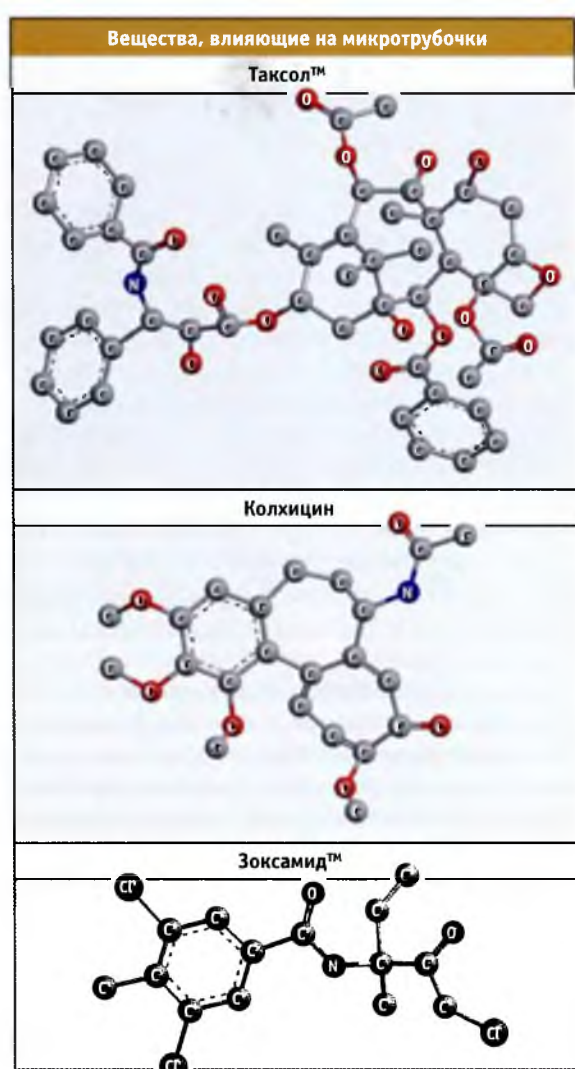


Рис. 7.5. Строение трех небольших органических молекул, нарушающих процесс сборки или разборки микротрубочек. Паклитаксел (Таксол™) и колхицин представляют собой природные продукты, образующиеся в некоторых растениях (тихоокеанский тис и безвременник осенний соответственно). Зоксамид™ является синтетическим веществом, которое было обнаружено при скрининге большого числа различных низкомолекулярных соединений по тесту нарушения функционирования микротрубочек

для борьбы с поздним фузариозным увяданием картофеля, грибковым заболеванием, которое вызвало массовый неурожай картофеля в Ирландии в 1850 г. В настоящее время активно проводится поиск новых препаратов, способных связываться с тубулином и могущих найти применение в медицине и сельском хозяйстве.

- Микротрубочки поддерживают структуру клеток, поскольку они являются наиболее прочными из полимеров цитоскелета. Микротрубочки устойчивы к сжатию
- В клетке происходят динамические процессы сборки и разборки микротрубочек, позволяющие быстро реорганизовать цитоскелет
- Клетки могут обеспечивать большую или меньшую динамичность характера функционирования микротрубочек, предоставляя им большие адаптационные возможности (при более динамичном характере) или повышая их устойчивость (при более стабильном характере)
- В соответствии со специфическими требованиями различные клетки характеризуются специфической организацией микротрубочек

Простые эксперименты, при которых разрушаются микротрубочки, иллюстрируют значимость этих компонентов цитоскелета. При действии веществ, аналогичных колхицину, связанные вместе субъединицы тубулина могут деполимеризоваться (см. 7.1 Введение). Эти вещества блокируют образование новых микротрубочек, вызывая дисбаланс между постоянным образованием и распадом компонентов цитоскелета. Микротрубочки, которые подверглись деполимеризации, не могут восстановиться, что вскоре приводит к потере всех микротрубочек в цитоплазме. Обычно, при деполимеризации микротрубочек, большинство клеток приобретает шарообразную форму. Также нарушается внутренняя организация клеток. Комплекс Гольджи, который обычно локализован рядом с ядром в виде дискретной структуры, образует рассеянные по клетке фрагменты. ЭПР, который представляет собой сеть, пронизывающую всю цитоплазму, собирается вокруг ядра, поскольку он связан с ядерной оболочкой. При удалении веществ, деполимеризующих микротрубочки, все эти изменения проходят. Сеть микротрубочек восстанавливается, возвращается форма клетки, а ЭПР и аппарат Гольджи занимают прежнее положение. Этот простой эксперимент иллюстрирует функции микротрубочек в организации структуры и подвижности клеток.

В клетке функции микротрубочек определяются двумя их свойствами, имеющими противоречивую природу: микротрубочки могут действовать как жесткие структурные элементы, и они в то же время они способны легко разрушаться. Характер структуры и относительно большой диаметр микротрубочек обеспечивают их относительную жесткость и устойчивость к сжатию. В этом отношении они напоминают водопроводный шланг, который на значительном протяжении может перегибаться, но при этом не сжимается. Однако, в отличие от шланга, микротрубочки характеризуются крайне динамичной природой. Они постоянно увеличиваются или укорачиваются за счет добавления или потери субъединиц. Укорочение микротрубочек может иметь особенно существенные последствия, так как при этом часто существенно уменьшается их длина, вплоть до полного ис-



Рис. 7.6. На снимке, сделанном во флуоресцентном микроскопе, показано около 12 клеток, в которых видны микротрубочки и хромосомы. Одна из митотических клеток, в которой микротрубочки собраны в митотическое веретено, окружена интерфазными клетками. Реорганизация микротрубочек, которая происходит при вступлении клетки в митоз, носит глубокий характер, но требует всего нескольких минут. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай

чезновения. После сборки микротрубочкам свойственна диссоциация, и часто клетка использует другие белки для их стабилизации и предотвращения этого процесса. Хотя свойство разрушаться кажется странным для структурных элементов, подобная неустойчивость обладает большим преимуществом, позволяя микротрубочкам при необходимости разбираться и реорганизовываться в течение минут. Примером этого является полная перестройка сети микротрубочек, которая происходит в начале митоза и занимает всего несколько минут (Рис. 7.6). Еще одним примером служит реорганизация микротрубочек, которая происходит в развивающихся ооцитах и иллюстрирует обширный характер этого процесса. На Рис. 7.7 показан ооцит лягушки *Xenopus laevis*. В диаметре он составляет около 1 мм в диаметре и содержит примерно полмиллиона микротрубочек, средняя длина которых достигает 600 мкм. Если все субъединицы этих микротрубочек вытянуть в одну непрерывную линию, то длина ее составит 300 м, т. е. три футбольных поля. Несмотря на столь большое количество микротрубочек, при стимуляции ооцита к созреванию в яйцеклетку весь цитоскелет деполимеризуется и реорганизуется в пределах 30 мин.

Для некоторых клеток динамическая природа микротрубочек означает больше чем просто способность к быстрому переходу одного типа цитоскелета в другой. Например, фибробласт должен обладать способностью перемещаться в теле и при этом менять направление

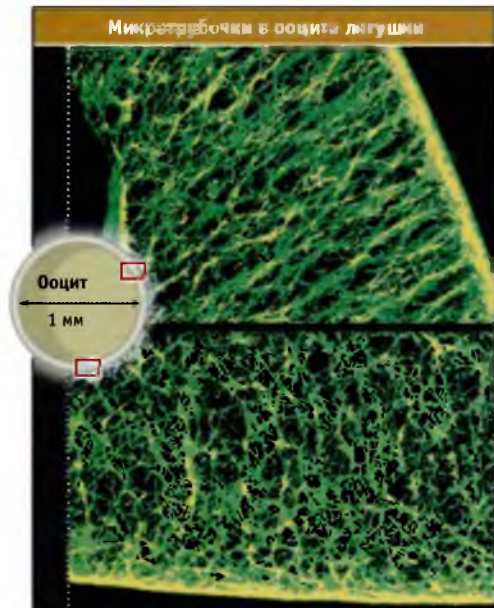


Рис. 7.7. Зрелый ооцит *Xenopus laevis* представляет собой крупную клетку, в которой плотно упакованы микротрубочки. На двух фотографиях представлены микротрубочки, расположенные близко к краям ооцита. Несмотря на большое количество присутствующих микротрубочек и на то, что их общая длина достигает существенной величины, они способны полностью разобратся в течение нескольких минут. Фотография любезно предоставлена Дэвидом Л. Гардом, Университет Юты

движения. В этих клетках микротрубочки организованы в виде радиальных лучистых структур, которые распространяются из одной точки, поблизости от ядра (рис. 7.8). Эти микротрубочки существуют недолго, в течение лишь части времени, необходимого для передвижения клетки на определенное расстояние. Фибробласт может продолжать двигаться, даже если все микротрубочки подверглись деполимеризации. Интересно, однако, что без микротрубочек клетка не способна изменять направление движения. По-видимому, для этого необходима динамическая природа микротрубочек.

Нейрон сильно отличается по форме и по поведению от фибробласта (рис. 7.8). Нейрон представляет собой неподвижную клетку, которая характеризуется небольшим телом и выступающими из него отростками (аксонами и дендритами), распространяющимися на большие расстояния. Внутри отростков проходит система микротрубочек. Эти микротрубочки переносят большое количество везикул и других материалов к синапсам и в противоположном направлении. В отличие от микротрубочек, присутствующих в фибробласте, отростки нейрона являются стабильными и играют основную роль в обеспечении структуры клетки. При деполимеризации происходит медленное разрушение отростков. Таким образом, нейроны используют особенности строения микротрубочек для создания стабильных структурных элементов.

Хотя зрелые нейроны используют микротрубочки для упрочения своей структуры, растущие нейроны так-

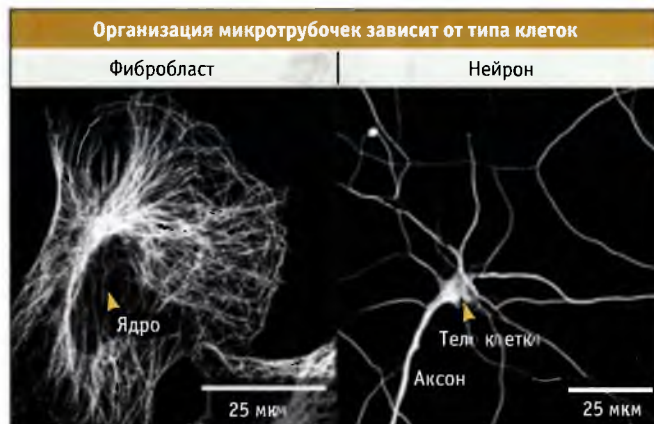


Рис. 7.8. Различная форма двух типов клеток требует разной организации их микротрубочек. В фибробласте человека видны отдельные микротрубочки, которые начинаются в точке, расположенной поблизости от ядра, и проходят через цитоплазму. В нейроне микротрубочки упакованы вместе в длинные тонкие образования, которые выходят из тела клетки. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай (слева) и Г. Витерсом, Витмановский колледж (справа)

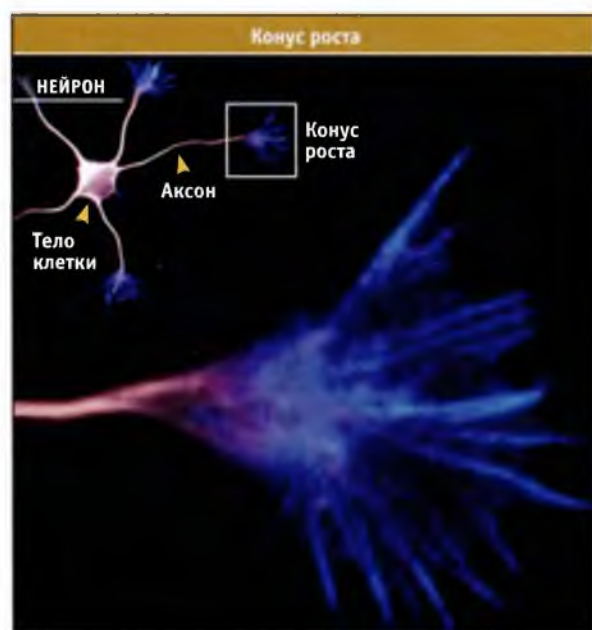


Рис. 7.9. Слева сверху изображен нейрон, от тела которого отходят несколько аксонов. На конце каждого аксона находится конус роста (обозначен голубым цветом). На основной фотографии в увеличенном виде показан конус роста правого аксона. Микротрубочки окрашены красным цветом, а актиновые филаменты голубым. Фотография любезно представлена д-ром Лейфом Демелтом и д-ром Шилли Халпейн, Исследовательский институт Скриппса

Линейное расположение

Расположение по периферии

Одноклеточные
делящиеся дрожжи

Ядерные эритроциты

Микротрубочки

Микротрубочки

Дрожжи *S. pombe* (слева) содержат относительно немного микротрубочек, собранных в пучки и расположенных в центре клетки. Микротрубочки транспортируют ростовые факторы к концевым участкам клетки. В красных кровяных клетках амфибий (справа) кольцевой пучок микротрубочек расположен под плазматической мембраной и помогает клетке справляться с деформациями при их прохождении через капилляры. Фотография любезно предоставлена Фонг Т. Тран. Пеннильванский университет (слева) и Линн Кассимери, Университет Лихай (справа)

же используют динамические свойства микротрубочек. Когда нейроны начинают расти и образуют синапсы с другими нейронами, их клеточные тела формируют тонкие выросты, которые становятся аксонами и дендритами. На конце каждого выроста находится очень активная подвижная область, которая называется конусом роста и которую можно видеть на рис. 7.3. Конусы роста распространяются на большие расстояния, и по мере их продвижения за ними формируются выросты. Конусы роста содержат динамические микротрубочки, которые функционируют так же, как и в подвижных фибробластах, и способствуют движению конусов роста. Таким образом, нейроны сами решают вопрос о том, в какие моменты и в каких местах клетки микротрубочки должны приобретать динамический характер, а когда должны оставаться стабильными. Способность регулировать динамическое состояние микротрубочек во времени и пространстве является общим свойством всех клеток.

Микротрубочки организованы в соответствии с индивидуальными нуждами каждой клетки. На рис. 7.3 представлены два близких по форме типа клеток: одноклеточные делящиеся дрожжи *Schizosaccharomyces pombe*, и ядерные эритроциты некоторых позвоночных, таких как птицы и амфибии. В том и другом случае клетки имеют продолговатую форму, однако микротрубочки у них организованы по-разному. В клетках *S. pombe* пучки микротрубочек ориентированы продольно и направлены к клеточному краю, где аккумулируются компоненты, необходимые для полярного роста клетки. Пучки микротрубочек также позиционируют ядро в центре клетки. В клетках *S. pombe* микротрубочки не выполняют защитной функции от механических воздействий, поскольку они защищены клеточной стенкой. В красных кровяных клетках обнаруживается совершенно другая организация микротрубочек, поскольку у них, как и у всех клеток животных, отсутствует клеточная стенка. Эти клетки обла-

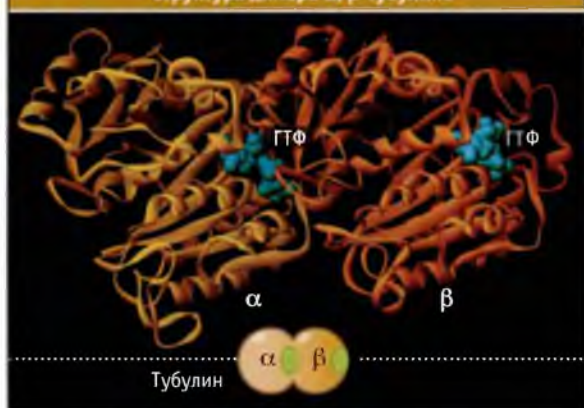
дают пучками микротрубочек, объединенными вместе с плазматической мембраной в структуру, расположенную по периферии клетки (т. н. маргинальный пучок). Микротрубочки маргинального пучка обеспечивают жесткость клеточной мембраны; такой же функцией в красных кровяных клетках млекопитающих обладают белки анкерин и спектрин.

Приведенные примеры иллюстрируют общие функции микротрубочек и порождают много вопросов. Каким образом микротрубочки способны столь быстро собираться и диссоциировать? Каким образом клетки регулируют динамику сборки и разборки микротрубочек? Что определяет организацию микротрубочек в клетке? Каким образом образующие цитоскелет микротрубочки участвуют в движении клеток? На все эти вопросы мы ответим в настоящей главе.

7.3 Микротрубочки представляют собой поляризованные полимеры α - и β -тубулина

Основные положения

- Микротрубочки представляют собой полые полимеры гетеродимеров тубулина и обладают полый структурой
- Микротрубочка образована из 13 линейных цепей субъединиц, которые называются протофиламентами и связаны между собой латерально
- Наличие латеральных связей между протофиламентами стабилизирует микротрубочки и ограничивает добавление и удаление субъединиц к концам микротрубочек
- Микротрубочки представляют собой поляризованные полимеры. Их плюс-концы заканчиваются β -тубулином и собираются быстрее. Минус-концы содержат α -тубулин, и они собираются медленнее



Основной структурной единицей микротрубочек является белок тубулин. Он представляет собой гетеродимер, состоящий из двух близких белков, α - и β -тубулина. Эти белки обладают на 40% одинаковой первичной структурой и никогда не обнаруживаются поодиночке. Во всех случаях одна молекула α -тубулина и одна β -тубулина связаны вместе, образуя 100 кДа гетеродимер. Этот гетеродимер обычно для простоты называется «тубулин», чтобы подчеркнуть факт, что он всегда функционирует как единое целое. Поскольку α - и β -тубулин имеют крутую форму, их гетеродимер похож на плод арахиса (рис. 7.11). Эта структура исследована при атомном разрешении: α - и β -тубулин имеют близкое строение и в димере расположены «линейно» так, что передняя часть молекулы одного примыкает к задней части молекулы другого.

Рис. 7.11. Трехмерная структура гетеродимера тубулина, основного строительного блока микротрубочек. Золотистым и медно-красным цветом выделены полипептидные цепи, составляющие две белковые субъединицы, а зеленым цветом — две молекулы ГТФ, связанные с каждым гетеродимером. Можно видеть сходство структур двух субъединиц и их расположение в комплексе как «голова к хвосту». В самом низу схематически представлен димер тубулина. С изменениями из статьи Nogales, E., Wolf, S. G., and Downing, K. H. *Nature*. 1998. 391: 199–203

Каждая молекула α - и β -тубулина связывает молекулу ГТФ. Строение гетеродимера тубулина показывает, что ГТФ, связанный с α -тубулином, расположен поблизости от места его контакта с β -тубулином (см. рис. 7.11). Этот ГТФ никогда не гидролизует и не обменивается с нуклеотидами, находящимися в растворе. Напротив, ГТФ, связанный с β -тубулином, оказывается открытым с другой стороны гетеродимера и может обмениваться с нуклеотидами, находящимися в растворе (см. рис. 7.11). При сборке микротрубочек ГТФ гидролизует до ГДФ. Этот гидролиз приводит к изменению конформации гетеродимера тубулина, что играет важную роль в динамических превращениях микротрубочек.

Микротрубочки участвуют в выполнении разнообразных клеточных функций, а в то же время строение микротрубочек и составляющих их субъединиц в различных клетках, от дрожжей до человека, практически одинаково. В последующих разделах будет описано строение микротрубочек, а также процесс их сборки (и диссоциации) из очищенных субъединиц в пробирке. Хотя поведение микротрубочек в пробирке имеет несколько отдаленное отношение к ситуации, имеющей место в клетке, его необходимо понимать, поскольку при этом выясняются основные свойства самих микротрубочек. Это, в свою очередь, позволяет выяснить, каким образом клетка организует микротрубочки и обеспечивает им возможность функционирования.

Микротрубочки представляют собой белковые полимеры, состоящие из тысяч тубулиновых субъединиц, организованных в полые структуры. Обычно микротрубочка состоит из 13 линейных цепей субъединиц, расположенных по длине параллельно; каждая цепь носит название **протофиламент**. Эти протофиламенты, показанные на рис. 7.12, соединяются по бокам, образуя микротрубочку. Хотя возможно образование микротрубочки из 11–15 протофиламентов, большая их часть, присутствующая в клетках, образована из 13 протофиламентов. Такая микротрубочка имеет диаметр 25 нм, т. е. в пять раз превышающий толщину ее стенки.

Микротрубочки являются полимерами тубулина

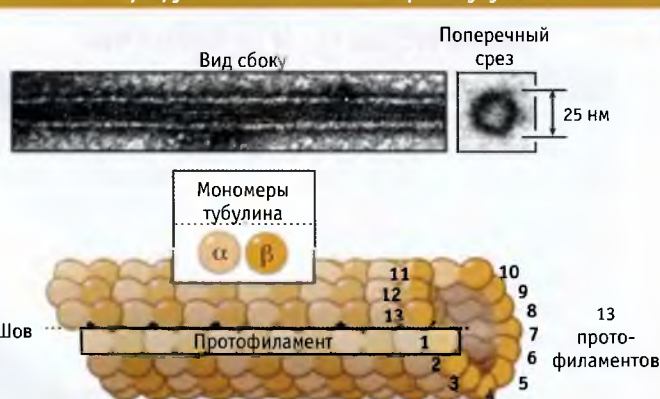


Рис. 7.12. Строение небольшого участка микротрубочки. В протофиламенте отдельные гетеродимеры тубулина расположены друг за другом, а сами протофиламенты связаны между собой боковыми связями, образуя полую трубочку. Все гетеродимеры ориентированы одинаковым образом — с одного конца микротрубочки расположены β -субъединицы, а с другого — α -субъединицы. В верхней части рисунка представлена электронная микрофотография микротрубочки, полимеризованной из очищенного тубулина. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай (слева), а микрофотография Гарольдом Эриксоном, медицинская школа Университета Дюка (справа)

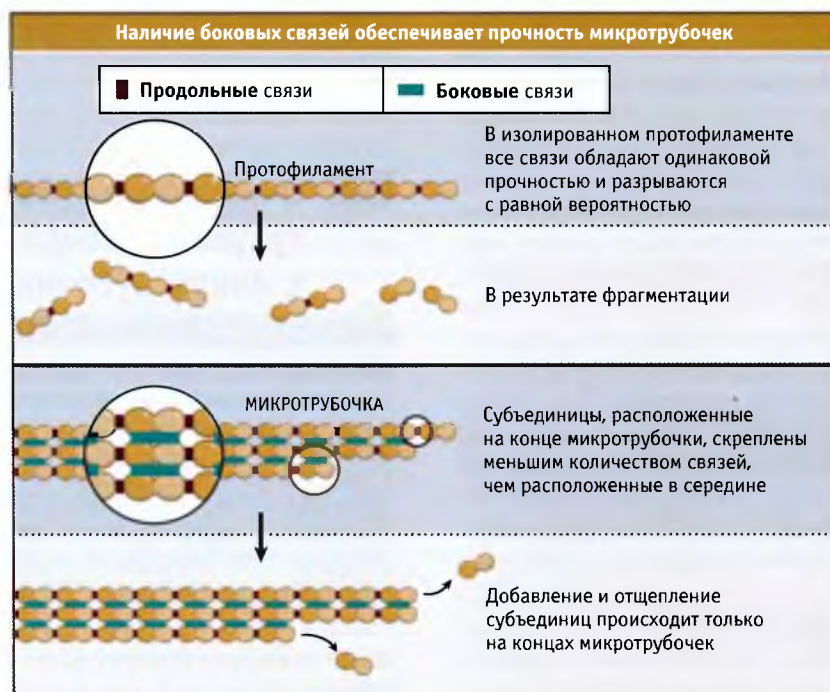
Гетеродимеры тубулина связаны по типу «голова к хвосту» вдоль длины каждого протофиламента. (см. рис. 7.12). В большинстве примыкающих протофиламентов α -тубулины располагаются ближе к другим α -тубулинам и β -тубулины к другим β -тубулинам. Поскольку примыкающие протофиламенты по отношению друг к другу выровнены не строго, то наблюдается некоторая прерывистость или шов, в котором α -тубулины одного протофиламента примыкают к β -тубулинам следующего. Возможно, что этот шов играет важную роль в сборке микротрубочек.

Каждый гетеродимер тубулина в микротрубочке образует прочные нековалентные связи с соседними гетеродимерами. Как схематически изображено на рис. 7.13, эти нековалентные связи возникают в продольном и латеральном направлениях между димерами в протофилменте. Одна продольная связь оказывается сильнее, чем одна латеральная связь, но наличие многочисленных латеральных связей делает полимер прочным. Легко продемонстрировать, почему это так. Субъединицы в отдельном протофилменте соединены только продольными связями. Все связи обладают одинаковой прочностью, так что они характеризуются равной вероятностью разрыва. Это делает один протофиламент способным к фрагментации (см. рис. 7.13). В микротрубочке субъеди-

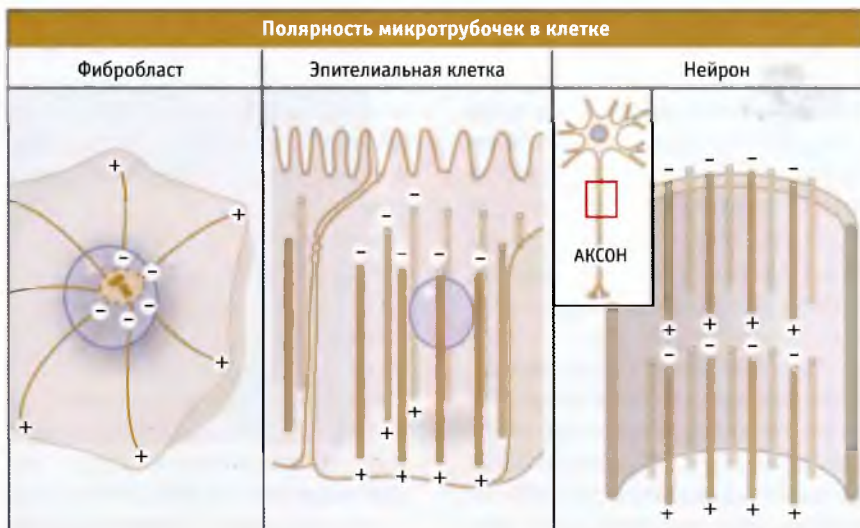
ницы в середине полимера также образуют латеральные связи с субъединицами в примыкающих протофиламентах. Для разрыва микротрубочки необходимо, чтобы у всех 13 протофиламентов одновременно в одном и том же месте разорвались продольные связи. Это крайне маловероятное событие, и поэтому микротрубочки рвутся крайне редко.

Наличие латеральных связей между субъединицами также делает маловероятным диссоциацию димеров тубулина в середине микротрубочки, поскольку высвобождение димера в этом случае требует одновременного разрыва нескольких связей. Вместо этого субъединицы добавляются только к концам филаментов, и там же происходит их диссоциация. В этих местах каждая субъединица присоединена к остатку микротрубочки несколькими связями (см. рис. 7.13).

Очищенные препараты гетеродимеров тубулина способны спонтанно образовывать боковые и продольные связи, приводящие к образованию микротрубочек. Поэтому сборка микротрубочек представляет собой **процесс самосборки**, при котором вся информация, необходимая для построения окончательной структуры, содержится в субъединицах. Примерами процессов самосборки является также полимеризация актиновых филаментов и сборка капсид некоторых вирусов.



Гетеродимеры тубулина образуют продольные связи (по длине протофиламента) и боковые связи (между субъединицами в примыкающих протофиламентах). Одиночные протофиламенты склонны к диссоциации, поскольку все связи обладают одной и той же прочностью и разрываются с равной вероятностью. Наличие боковых связей в микротрубочке делает маловероятным разрыв полимера в середине. Субъединицы добавляются или диссоциируют только на концах микротрубочек, где каждая удерживается меньшим количеством связей, чем в середине. Для простоты показаны только три протофиламента



Фиг. 7.12. В каждом из трех типов клеток все микротрубочки имеют одинаковую полярность. Это позволяет использовать полярность микротрубочки как чувствительный индикатор направления в цитоплазме. Например, в эпителиальной клетке направление от «+» к «-» означает «вверх». Форма клетки и ее способность различать специализированные области на поверхности или внутри зависят от полярности микротрубочек

Характер расположения субъединиц в микротрубочке обуславливает различия структуры ее концов (см. рис. 7.12). В каждом протофиламенте все гетеродимеры тубулина ориентированы одинаково, и в пределах микротрубочки все протофиламенты направлены также одинаково. Таким образом, кэп β -тубулина открыт с одной стороны микротрубочки (который называется плюс-конец), в то время как α -тубулин открыт с другого конца (минус-конец). Такая организация придает микротрубочке два очень важных свойства. Во-первых, два ее конца становятся структурно различными и ведут себя по-разному. Как мы увидим, клетки часто используют это свойство, например регулируя независимую сборку с двух концов микротрубочки. Во-вторых, каждая микротрубочка представляет собой полярную структуру (т. е. обладает внутренней двунаправленностью), и ее можно рассматривать как направленную определенным образом. Это полярность характерна для всей микротрубочки, а не только для ее концов. Стоит лишь посмотреть на поверхность микротрубочки в любой точке, даже расположенной в середине, и можно определить направление плюс- и минус-концов. Полярность микротрубочек позволяет им выполнять функцию двунаправленных путей для белковых молекулярных моторов и существенна для выполнения их роли во внутриклеточной организации.

иллюстрирует организацию микротрубочек в соответствии с их полярностью. Например, в фибробластах и других клетках с радиальным расположением микротрубочек они организованы так, что их минус-концы направлены к центру клетки, а плюс — к ее периферии. В эпителиальных клетках микротрубочки расположены параллельно друг другу, и идут сверху вниз, причем плюс-концы находятся

внизу, а минус — наверху. Аналогичным образом, все микротрубочки в аксоне ориентированы в одном и том же направлении. Для каждого типа клеток полярность расположения микротрубочек существенна для поддержания их структуры и функционирования.

7.4 Очищенные субъединицы тубулина собираются в микротрубочки

Основные положения

- Полимеризация микротрубочек начинается с образования некоторого количества центров полимеризации (небольших полимерных комплексов)
- Микротрубочки образуются при добавлении субъединиц тубулина к обоим ее концам
- В растворе всегда сохраняется критическая концентрация субъединиц тубулина. Для того чтобы происходила сборка трубочек, концентрация тубулина должна быть выше некоторого критического значения

Микротрубочки образуются при полимеризации единиц тубулина. Этот процесс можно изучать *in vitro*, используя препараты очищенного тубулина. Для образования микротрубочек сначала тубулин и ГТФ растворяют в соответствующем буфере, а затем раствор нагревают до 37 °C, чтобы начать полимеризацию (эти условия используют при изучении полимеризации тубулина из клеток млекопитающих). Образование микротрубочек легко контролировать с помощью измерения светорассеяния, поскольку в отличие от молекул тубулина, образующиеся

Полимеризация тубулина

Общее количество полимера



полимерные продукты рассеивают свет. Величина светорассеяния пропорциональна количеству образующегося полимера, из которого состоят микротрубочки.

На рис. 7.16 представлена зависимость образования полимера от времени. Началу процесса предшествует лаг-период, в течение которого полимер не образуется. Затем начинается образование полимера, количество которого линейно нарастает до достижения плато. Начальная фаза, при которой не обнаруживается полимера, называется фазой спонтанной нуклеации. Во время этой начальной лаг-фазы начинают образовываться небольшие центры полимеризации, состоящие лишь из нескольких субъединиц тубулина (рис. 7.16). Эти центры неустойчивы, поскольку с большей вероятностью подвергаются диссоциации, чем присоединяют дополнительные субъединицы. Однако некоторые могут расти дальше. Когда произошло объединение достаточного количества субъединиц (6–12), центр приобретает устойчивость, поскольку он с большей вероятностью начинает расти, чем диссоциировать. Поскольку образование достаточно крупных центров полимеризации затруднено, их возникновение является этапом, лимитирующим скорость процесса формирования микротрубочек. Клетки обладают специфическими белковыми комплексами, которые позволяют им преодолевать низкую скорость спонтанной полимеризации, ускорять этап нуклеации и устанавливать время его наступления.

Линейное увеличение количества полимера происходит за счет присоединения субъединиц тубулина к концам центров образования микротрубочек («ядрам»), которые образуются при спонтанной нуклеации. Каждая микротрубочка удлиняется за счет добавления субъединиц к обоим (плюс- и минус-) ее концам. Также происходит и диссоциация субъединиц, однако с гораздо меньшей частотой. В результате происходит наращивание субъединиц, как показано на рис. 7.17. Суммарная скорость роста определяется скоростью добавления субъединиц и их диссоциацией и описывается уравнением 7.1:

$$dP/dt = k_{on}[тубулин] - k_{off}$$

где dP/dt — количество полимера, образующегося в единицу времени, $[тубулин]$ — концентрация молекул тубулина в растворе, k_{on} — константа скорости поли-

Графическая иллюстрация зависимости образования полимера микротрубочек от времени при полимеризации очищенного тубулина *in vitro*. Вначале не происходит образования полимера. Затем, его количество со временем увеличивается линейно и выходит на плато. В течение каждой из трех стадий происходят различные молекулярные процессы



Рис. 7.16 Упрощенная схема нуклеации микротрубочек. Небольшое количество димеров может объединяться, однако обычно комплекс распадается. Впрочем, в отдельных случаях происходит добавление дополнительных димеров и их ассоциация. Если образовался комплекс из 6–12 димеров, то он с большей вероятностью будет продолжать расти. Образуется небольшой слой протофиламентов, который в конце концов формирует короткую микротрубочку, часто называемую «затравкой»

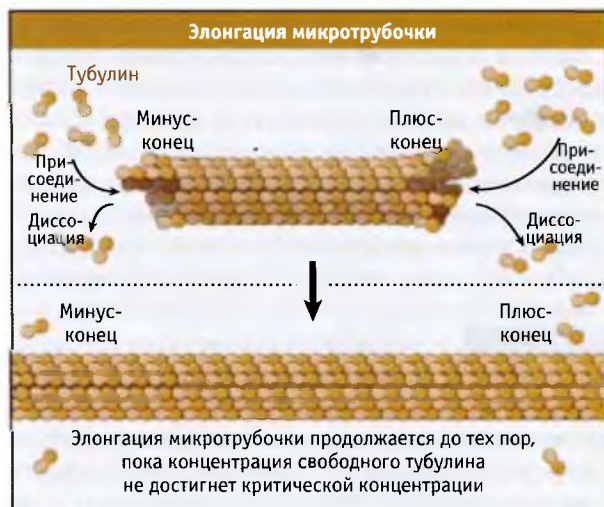


Рис. 7.17 После образования затравки микротрубочки происходит ее элонгация за счет добавления субъединиц с обоих концов. Один конец растет быстрее другого. Этот рост приводит к линейному увеличению общего количества полимера, которое наступает после фазы спонтанной нуклеации

меризации (ед. $M^{-1} c^{-1}$), а k_{off} — скорости диссоциации (ед. c^{-1}). Значения констант скорости для плюс- и минус-концов микротрубочек различаются, и поэтому для каждого конца полимера существует свое уравнение 7.1. Как следует из уравнения 7.1, при большей концентрации тубулина микротрубочки образуются быстрее.

В конце концов количество полимера достигает максимума по мере достижения системой стационарного состояния, при котором добавление субъединиц уравнивается их диссоциацией. Когда образовалось максимальное количество полимера, часть субъединиц тубулина остается в растворе. Эта концентрация тубулина называется **критической концентрацией (C_c)**, и она одинакова независимо от величины исходной концентрации. Если выразить критическую концентрацию математически, то легко понять, почему это так. В равновесном состоянии образования полимера не происходит, и т. о. dP/dt в уравнении 7.1 равняется нулю. При этом условии уравнение решается для тубулина:

$$[\text{тубулин}] = C_c = k_{\text{off}}/k_{\text{он}}$$

Критическая концентрация для очищенного тубулина составляет около 7 мкМ. Поскольку это такая концентрация субъединиц, которая всегда остается в растворе в состоянии равновесия, то концентрация димеров тубулина должна быть выше критической с тем, чтобы полимер мог образоваться. Аналогичным образом, если в состоянии равновесия полимеры присутствуют в большом количестве, то общая концентрация тубулина оказывается пониженной, то полимеры начинают диссоциировать, и их количество понижается. Это прекращается, когда концентрация растворимых субъединиц тубулина снова достигнет критического значения. Таким образом, критическую концентрацию можно представить как минимальную, необходимую для образования микротрубочек.

Важным является вопрос о судьбе индивидуальных микротрубочек при наступлении состояния равновесия. Наиболее простая возможность заключается в том, что, подобно большинству химических реакций, полимеризация микротрубочек на обоих концах приходит к состоянию равновесия с молекулами тубулина, находящимися в растворе. Если бы это имело место, наблюдался бы очень незначительный обмен субъединиц микротрубочек. Причины этого будут изложены (см. также **EXP:7-0001**). Экспериментальные данные, однако, свидетельствуют об обратном: в состоянии равновесия добавление и диссоциация субъединиц происходит достаточно интенсивно, т. е. гораздо интенсивнее, чем это можно ожидать исходя из представлений об обмене в состоянии равновесия. Это говорит о том, что в действительности происходит более сложный процесс, чем достижение простого равновесия. Механизмы, ответственные за столь усиленный обмен компонентов полимера, являются основополагающими для понимания поведения микротрубочек и обсуждаются в следующем разделе.

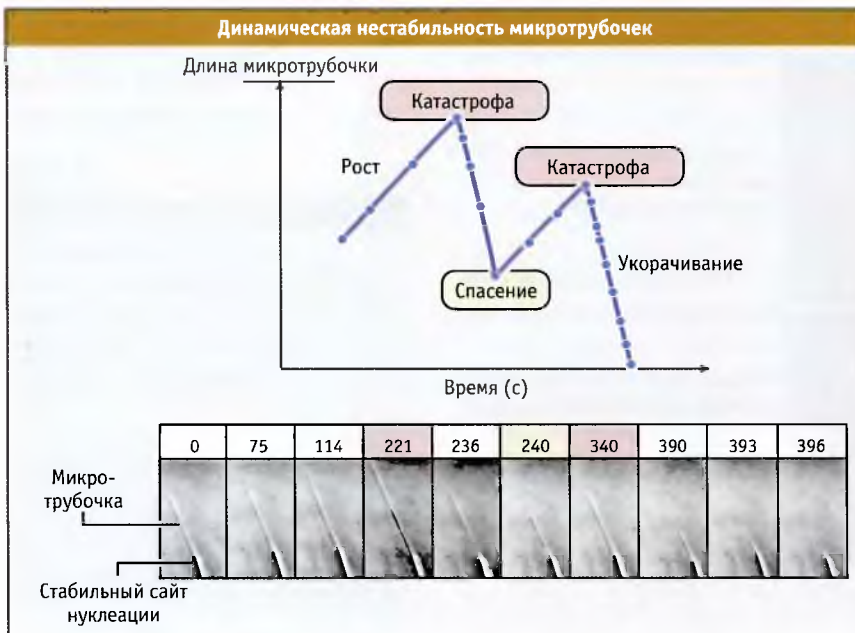
7.5

Сборка и разборка микротрубочек происходят в ходе специфического процесса, который обозначается как динамическая нестабильность

Основные положения

- Микротрубочки постоянно переключаются с фазы роста на фазу укорачивания; этот процесс обозначается как динамическая нестабильность
- Переход от состояния роста к состоянию укорачивания называется катастрофой
- Переход от состояния укорачивания к состоянию роста называется спасением
- Популяция микротрубочек растет и укорачивается асинхронно; в любой момент времени большая их часть находится в стадии роста и меньшая часть — в стадии укорачивания
- Строение растущих и укорачивающихся концов микротрубочек различно: растущие концы имеют выступы протофиламентов, а укорачивающиеся характеризуются участками, отклоняющимися в сторону от оси микротрубочки

В экспериментах *in vitro*, предпринятых с целью выяснения динамики и кинетики полимеризации микротрубочек, вначале использовали такие методы, как светорассеяние. Этим методом можно было измерять лишь общее количество полимера, присутствующее в данный момент времени. В середине 1980-х гг. были разработаны методы иммунофлуоресценции и электронной микроскопии, которые позволяли измерять степень полимеризации тубулина. В отличие от светорассеяния, эти методы позволяли визуализировать отдельные микротрубочки. В дальнейшем, эти микротрубочки можно было сосчитать и измерить их длину. Результаты этих экспериментов оказались совершенно неожиданными и помогли ответить на вопрос, почему обмен субъединиц тубулина в полимере происходит с большей скоростью, чем это можно предполагать на основании представления об установлении равновесия (см. **EXP:7-0002**). Если бы микротрубочки относились к равновесным полимерам, то в состоянии равновесия они бы обнаруживали лишь незначительные изменения длины, и их общее количество со временем существенно бы не менялось. Однако, используя новые методы, удалось показать, что в состоянии равновесия (соответствующем плато на рис. 7.15) изменяются как длина, так и количество микротрубочек. В продолжении примерно 40 мин некоторые микротрубочки становятся в десять раз длиннее, в то время как общее их количество снижается. В дополнительных экспериментах по исследованию микротрубочек, образующихся на центросоме (стабильные сайты нуклеации; см. также 7.7 Для инициации сборки клетки используют центры организации микротрубочек), также получились неожиданные результаты. Вначале микротрубочки полимеризовали на центросоме, а затем пробу разбавляли до концентрации тубулина ниже критической. В случае равновесного полимера все микротрубочки должны были бы сразу же начать разбираться, и этот процесс продолжался бы до повторного установ-



Одиночная микротрубочка растет от стабильного сайта нуклеации *in vitro*. Минус-конец присоединен к нуклеирующей структуре, а плюс-конец свободен. Рост микротрубочки регистрируется во времени с помощью микровидеосъемки. Процесс также представлен графически. Вначале микротрубочка растет, затем начинает резко укорачиваться. После достижения минимальной длины она начинает расти снова. Вскоре после этого происходит вторая катастрофа, и микротрубочка полностью разбирается. Отметим, что разборка происходит в несколько раз быстрее, чем рост. Сверху каждой видео рамки обозначено время в сек. Результаты видеосъемки любезно предоставлены Линн Кассимери, Университет Лихай

ления критической концентрации. Однако, хотя некоторые микротрубочки, действительно, диссоциировали, остальные продолжали полимеризацию, т. е. полученный результат оказался несовместимым с представлением о равновесном полимере. Эти, а также другие результаты позволили предложить модель полимеризации микротрубочек в ходе процесса, который получил название **динамическая нестабильность**. При этом процессе микротрубочки постоянно находятся либо в фазе роста, либо укорачивания, и между этими фазами существуют резкие переходы. Эти переходы называются **катастрофа**, если происходит переключение от роста к укорачиванию, и **спасение**, если укорачивание сменяется ростом.

Модель динамической нестабильности была подтверждена исследованиями с использованием метода световой микроскопии при наблюдении роста и укорачивания индивидуальных микротрубочек. На рис. 7.18 представлен такой эксперимент. В этих экспериментах было показано, что индивидуальная микротрубочка дорастает до длины несколько микрон, после чего наступает катастрофа и трубочка быстро укорачивается. Может наступить спасение, в результате чего микротрубочка возобновит рост, или она может полностью диссоциировать. На рис. 7.19 представлены два фрагмента видеозаписи микротрубочек, находящихся в фазе перехода между ростом и диссоциацией. Показаны две микротрубочки, которые предварительно получили из стабильной структуры (короткого фрагмента

аксономы жгутика — органеллы, состоящей из стабильных микротрубочек), одна растет на плюс-конце, а другая на минус-конце. Эти эксперименты показывают, что плюс концы микротрубочек растут быстрее, чем минус. Также на плюс-концах чаще происходит катастрофа, что делает их более динамичными по сравнению с минус концами.

Существенным признаком динамической нестабильности микротрубочек является преимущественное состояние их элонгации или диссоциации, иногда прерываемое переходами между ними. Поскольку катастрофы и спасения наступают через произвольные интервалы времени, поведение отдельных микротрубочек в группе носит гетерогенную и асинхронную природу. Большинство микротрубочек будут расти медленно, но в то же время некоторые будут расти быстро. Отдельные микротрубочки не достигают равновесной длины; а каждая из них обычно становится длиннее или короче.

Структура концов растущих и диссоциирующих микротрубочек различна. Концы микротрубочек при полимеризации часто образуют листообразные выступы за счет того, что некоторые протофиламенты оказываются длиннее других (см. рис. 7.20). Субъединицы добавляются только к концам протофиламентов. По мере элонгации каждого протофиламента, субъединицы образуют боковые связи с соседними, и в конце концов выступы превращаются в структуру микротрубочки. При деполимеризации микротрубочки, концы отдельных протофи-



В качестве стабильного сайта нуклеации при сборке очищенного тубулина *in vitro* использовали небольшой участок аксоны жгутика. Показаны два видео кадра. На верхнем кадре микротрубочка полимеризуется на каждом конце аксоны. У микротрубочки слева свободен плюс-конец; у микротрубочки справа — минус-конец. За время между съемкой верхнего и нижнего кадров левая микротрубочка диссоциировала полностью; микротрубочка справа диссоциировала частично, и затем снова начала рост. Результаты видеосъемки любезно предоставлены Линн Кассимери, Университет Лихай

ламентов закручиваются в кольца, внутренней стороной наружу. Субъединицы в отдельном, частично деструктурированном протофилamente держатся вместе только за счет продольных связей. Как обсуждалось выше (см. 7.3 *Микротрубочки представляют собой поляризованные*

полимеры α - и β -тубулина), связи между субъединицами в пределах одного протофиламента нарушаются с одинаковой вероятностью, приводя к быстрой деградации протофилментов за счет диссоциации концевых субъединиц и образование разломов в других местах.

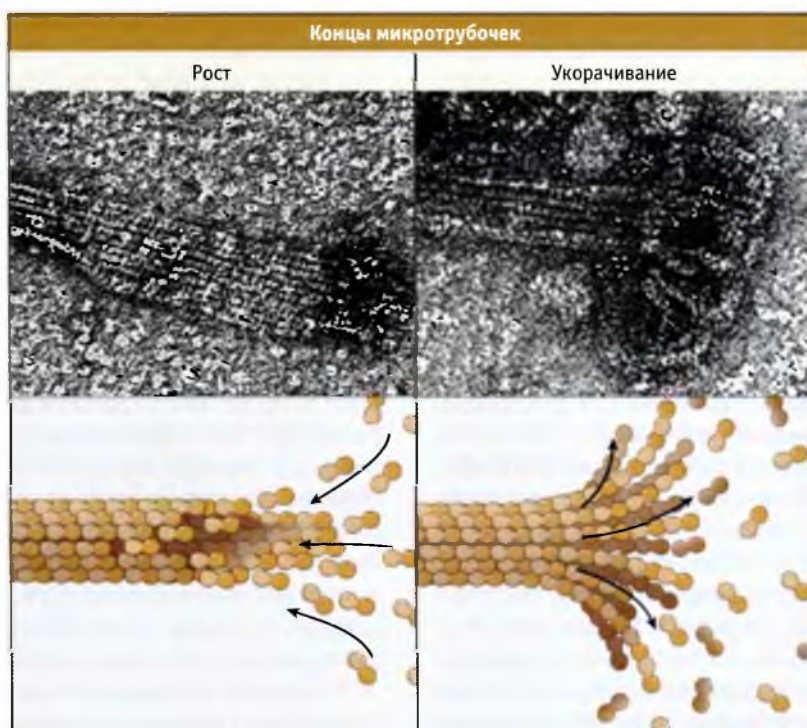


РИС. 7.20. Сверху представлены микрофотографии плюс-концов растущих и диссоциирующих микротрубочек, сделанные в электронном микроскопе. С одной стороны конца растущей микротрубочки выходят длинные протофилменты. Эти протофилменты расположены на плоской поверхности, к которой были присоединены микротрубочки при приготовлении препарата. Поэтому на конце протофилменты видны расположенными в плоскости. На диссоциирующем конце протофилменты отсоединяются от стенки микротрубочки и закручиваются в обратную сторону. Фотографии любезно предоставлены Линн Кассимери, Университет Лихай

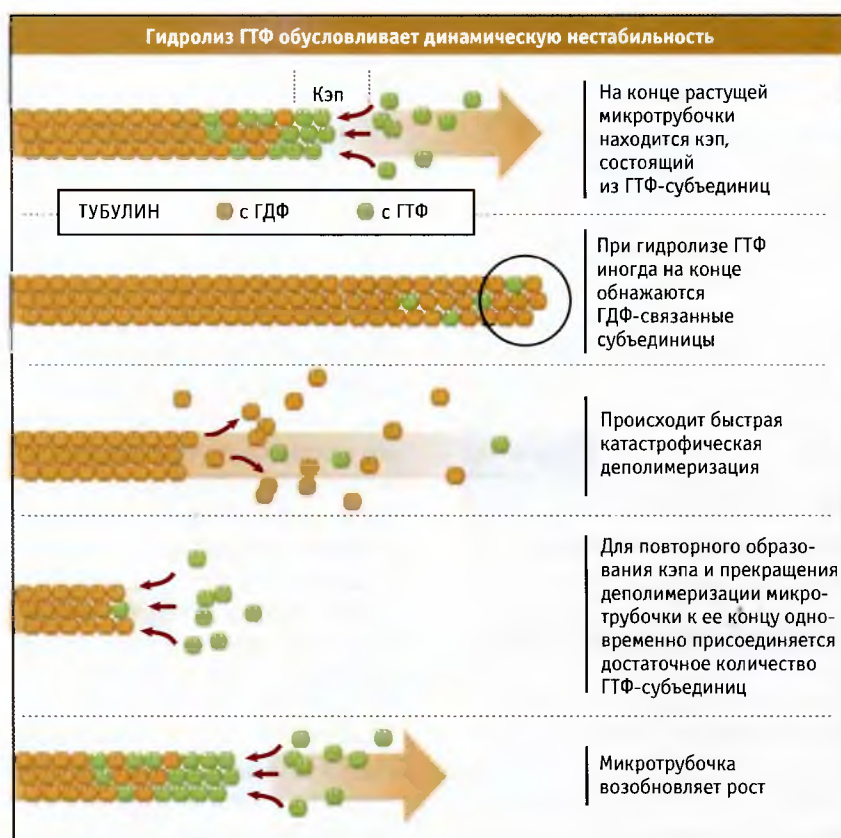
Кэп ГТФ-тубулиновых субъединиц регулирует переходы динамической неустойчивости

Основные положения

- На концах растущих микротрубочек образуются кэпы, состоящие из ГТФ-тубулина. Это объясняется тем, что ГТФ, связанный с β -тубулином, гидролизует до ГДФ вскоре после присоединения субъединицы к микротрубочке
- Основная масса микротрубочек состоит из ГДФ-тубулина
- Гидролиз ГТФ связан со структурными изменениями димеров тубулина
- ГТФ-тубулиновые комплексы образуют линейные протофиламенты, которые поддерживают контакты с субъединицами в соседних протофиламентах и дают им возможность расти
- ГДФ-тубулиновые комплексы диссоциируют от микротрубочек при разрыве боковых связей с соседними субъединицами, что приводит к постепенной деградации протофиламентов

Динамическая неустойчивость определяется способностью тубулина связываться с ГТФ и осуществлять его гидролиз. Сборка и разборка микротрубочек, обусловленные динамической неустойчивостью, представляют собой неравновесный процесс, требующий энергетических затрат. Энергия обеспечивается гидролизом ГТФ. По мере того как гетеродимеры тубулина включаются в микротрубочку, β -тубулин начинает гидролизовать связанный ГТФ до ГДФ. Гидролиз происходит не сразу, и между процессом полимеризации и его началом существует небольшой лаг-период. Таким образом, сердцевина растущей микротрубочки состоит из ГДФ-тубулиновых субъединиц, а на концах находятся ГТФ-тубулиновые кэпы.

Кэпы на концах микротрубочек регулируют динамическую неустойчивость и определяют, будет ли расти или укорачиваться (см. рис. 7.6). Укорачивающиеся микротрубочки теряют кэпы, и на их концах обнажа-



Схематическое изображение событий, происходящих на концах микротрубочек. ГТФ, связанный с β -тубулином, гидролизует сразу после присоединения димера тубулина к микротрубочке. При этом на растущем конце создается небольшой кэп из субъединиц, связанных с ГТФ. Микротрубочка растет все время, пока на конце ее присутствует кэп. Однако если на конце обнажаются субъединицы, связанные с ГДФ, то микротрубочка начинает очень быстро разбираться. Если в этот момент присоединяются субъединицы ГТФ, то это приводит к ее спасению. Деполимеризация происходит достаточно быстро, а спасение представляет собой редкий процесс, и поэтому большая часть микротрубочек деполимеризуются до наступления момента спасения

ГТФ-тубулиновые протофиламенты	ГДФ-тубулиновые протофиламенты
 <p>= ГТФ</p> <p>Наиболее стабильная конформация ПРЯМОЛИНЕЙНАЯ</p>	 <p>= ГДФ</p> <p>Наиболее стабильная конформация ИЗОГНУТАЯ</p>



ГТФ-кэп предотвращает переход ГДФ-тубулиновых протофиламентов в изогнутую конформацию



Если ГТФ-кэп теряется, протофиламенты скручиваются наружу



Отдельные развернутые филаменты отщепляются от микротрубочки и диссоциируют

ются ГДФ-тубулиновые субъединицы. Скорость диссоциации микротрубочек зависит от того, связаны ли с их концевыми субъединицами ГТФ или ГДФ. Концевые ГДФ-тубулиновые субъединицы диссоциируют примерно в 50 раз быстрее, чем ГТФ-тубулин. Поэтому наличие на концах микротрубочек ГДФ-тубулина приводит к их быстрой деполимеризации. Таким образом, катастрофа является результатом потери ГТФ-кэпа растущей микротрубочкой, а для спасения укорачивающейся микротрубочки требуется восстановление ее концевого ГТФ-кэпа (см. рис. 7.21).

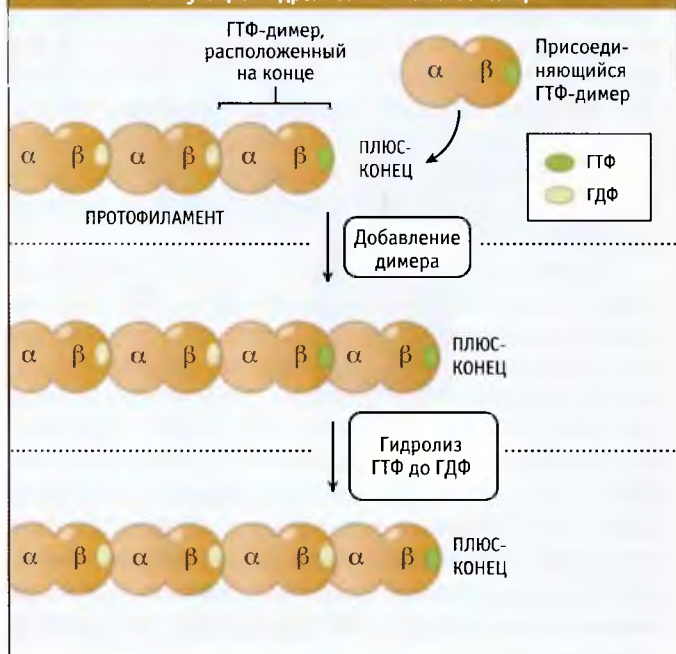
Присутствие ГТФ- или ГДФ-тубулинов на концах микротрубочек регулирует скорость их роста и диссоциации за счет изменения этих концевых структур. Исследования показали, что ГТФ-тубулин образует линейные протофиламенты. Однако ГДФ-тубулин более устойчив, поскольку закрученные протофиламенты очень напоминают присутствующие на концах диссоциирующих микротрубочек, как показано на рис. 7.22. Поэтому присутствие или отсутствие на концах микротрубочек ГТФ или ГДФ определяет их структуру, а от нее зависит, будет ли трубочка расти или укорачиваться. Кэп, состоящий из ГТФ-тубулина, обеспечивает линейность протофиламентов и предотвращает релаксацию ГДФ-тубулина, расположенного в середине микротрубочки, из его нормального закрученного состояния. Даже если на конце

ГТФ-кэп на конце микротрубочки определяет прямолинейное расположение протофиламентов, связанных с ГДФ и составляющих тело микротрубочки. Как только ГТФ-кэп утрачивается, протофиламенты изгибаются, приобретая более стабильную для них конформацию. По мере скручивания протофиламенты отделяются друг от друга и становятся более подверженными деградации. Наверху показаны нуклеотиды, связанные с каждой β -субъединицей. Для простоты на трех нижних рисунках представлены только нуклеотиды, связанные с субъединицей, расположенной на конце каждого протофиламента

микротрубочки обнажится ГДФ-тубулиновый кор, то разрываются боковые связи с соседними субъединицами, и протофиламенты закручиваются наружу своими внутренними поверхностями (см. рис. 7.22). Эти закрученные протофиламенты разрываются случайным образом, и образующиеся фрагменты деполимеризуются, образуя индивидуальные субъединицы (см. рис. 7.22).

Каким образом образуется ГТФ-кэп и как он удаляется с конца микротрубочки? Пока мы точно не знаем его размеры, но очевидно, что кэп относительно невелик (менее 200 субъединиц) и, вероятно, в глубину не превышает размера одного слоя субъединиц. Наличие кэпа предполагает, что вскоре после включения тубулина в полимер происходит гидролиз ГТФ, однако не раньше, чем другая молекула тубулина включится в тот же протофиламент. Возможно, что это определяется структурой тубулина и сайтом связывания ГТФ. На плюс-концах микротрубочек открывается ГТФ, связанный с β -тубулином. Рис. 7.23 показывает, что, когда к концу добавляется новый гетеродимер тубулина, его α -компонент начинает контактировать с ГТФ. Считается, что это приводит к гидролизу (см. **STRC:7-0001**). Такой механизм предполагает, что ГТФ-кэп всегда располагается на глубину одной субъединицы, поскольку добавление каждого нового гетеродимера стимулирует гидролиз в расположенной ниже структурной единице

Стимуляция гидролиза ГТФ на плюс-конце



микротрубочки. Поскольку связанный с β -тубулином ГТФ расположен на конце гетеродимера, он обнажается на конце протофиламента. α -тубулин присоединяющегося димера контактирует с ГТФ и вызывает его гидролиз. По этому механизму поддерживается ГТФ-кэп только на одном слое субъединиц

микротрубочки. Если все происходит таким образом, то как отщепляется ГТФ-кэп? Возможно, что происходит диссоциация концевых ГТФ-содержащих субъединиц. Нельзя также исключить спонтанный гидролиз ГТФ на концевых субъединицах. Однако он происходит гораздо медленнее, чем при стимуляции процесса после присоединения очередного тубулинового димера. Пока неизвестно, сколько должно обнажиться протофиламентов, содержащих ГДФ-кэпы, прежде чем начнет укорачиваться вся концевая структура.

Каким образом диссоциирующая микротрубочка, протофиламенты которой закручиваются наружу, снова начинает расти (т. е. переходит в фазу спасения)? Вероятно, ГТФ-тубулиновые субъединицы добавляются к концам протофиламентов даже во время скручивания, при их укорачивании. Однако добавление ГТФ-тубулина к разрушающемуся протофиламенту не приводит к стабилизации концов микротрубочек, потому что при этом не могут образовываться боковые связи с соседними протофиламентами. При спасении, по-видимому, необходимо, чтобы некоторые из отщепляющихся протофиламентов разрушались у стенки микротрубочки, тем самым давая возможность части ГТФ-тубулинов образовывать друг с другом боковые связи и стабилизировать ее конец.

Молекулярные модели, описывающие катастрофу и спасение микротрубочек, позволяют предполагать, что эти события носят маловероятный характер. Так и есть на самом деле. По сравнению с добавлением и отщеплением субъединиц от концов микротрубочек, катастрофы и спасения представляют собой редкие события. Например, в фибробластах, при диссоциации микротрубочек, прежде чем наступит спасение, должны удалиться примерно

11 000 субъединиц. Редкая частота наступления катастроф и спасений часто позволяет циклам полимеризации и деполимеризации осуществляться на значительной части длины микротрубочки, что иногда приводит к полной ее деполимеризации. Как будет показано, способность микротрубочек постоянно расти или диссоциировать затрагивает большие расстояния и существенна для выполнения роли, которую они играют в клетке.

7.7 Для инициации сборки клетки используют центры организации микротрубочек

Основные положения

- Образование микротрубочек в клетках происходит в центрах организации микротрубочек (ЦОМТ)
- Положение ЦОМТ определяет организацию микротрубочек в клетке
- В клетках млекопитающих ЦОМТ чаще всего представляет собой центросому
- Центросомы состоят из пары центриолей, окруженных перичентриолярным матриксом
- Перичентриолярный матрикс содержит γ -тубулин. Именно тубулин в комплексе с несколькими другими белками обеспечивает организацию микротрубочек
- В подвижных клетках млекопитающих содержится еще один вид ЦОМТ, базальные тельца

В предыдущих разделах описано, каким образом очищенный тубулин собирается в микротрубочки: вначале происходит процесс инициации (нуклеации), а затем

рост и укорачивание микротрубочек за счет добавления и отщепления субъединиц. Аналогичная последовательность событий происходит в клетках, однако там сборка микротрубочек начинается на специфической органелле, **центре организации микротрубочек (ЦОМТ)**, где происходит нуклеация. Поскольку процесс спонтанной нуклеации происходит крайне медленно, почти во всех клетках он осуществляется в ЦОМТ. Исходя из названия, ЦОМТ также организует микротрубочки в клетке, поскольку он часто остается связанным с минус-концами образованных микротрубочек, и, таким образом, определяет их положение и ориентацию.

В клетках млекопитающих обычно в качестве ЦОМТ выступает **центросома** (рис. 7.24). Она состоит из двух **центриолей**, окруженных **перичентриолярным материалом**. Центриоли представляют собой небольшие органеллы цилиндрической формы, расположенные в середине центросомы под прямым углом друг к другу. Центриоли образованы специфическими микротубулярными структурами, называемыми триплетами микротрубочек. Девять триплетов рас-

положены симметрично, формируя стенки цилиндра. Каждый триплет содержит одну полную (трубочку А) и две неполные микротрубочки (трубочки В и С). Наряду с α - и β -тубулином, центриоли также содержат еще два представителя семейства тубулиновых белков, δ - и ϵ -тубулины. Тубулины не являются единственными компонентами центриолей и перичентриолярного матрикса — в эти структуры входят еще по крайней мере 100 различных белков.

Первоначально на электронных микрофотографиях перичентриолярный материал выглядел в виде рыхлого слоя, окружающего центриоль и окрашенного более интенсивно по сравнению с окружающей цитоплазмой (см. рис. 7.24). Сейчас стало очевидно, что этот слой состоит из большого количества различных белков, определенным образом организованных вместе при участии центриоли. По крайней мере некоторые перичентриолярные белки организованы в виде трехмерной разветвленной структуры. Этот матрикс содержит **γ -тубулин**, являющийся представителем семейства тубулинов. Этот белок находится в комплексе с некоторыми другими белками,

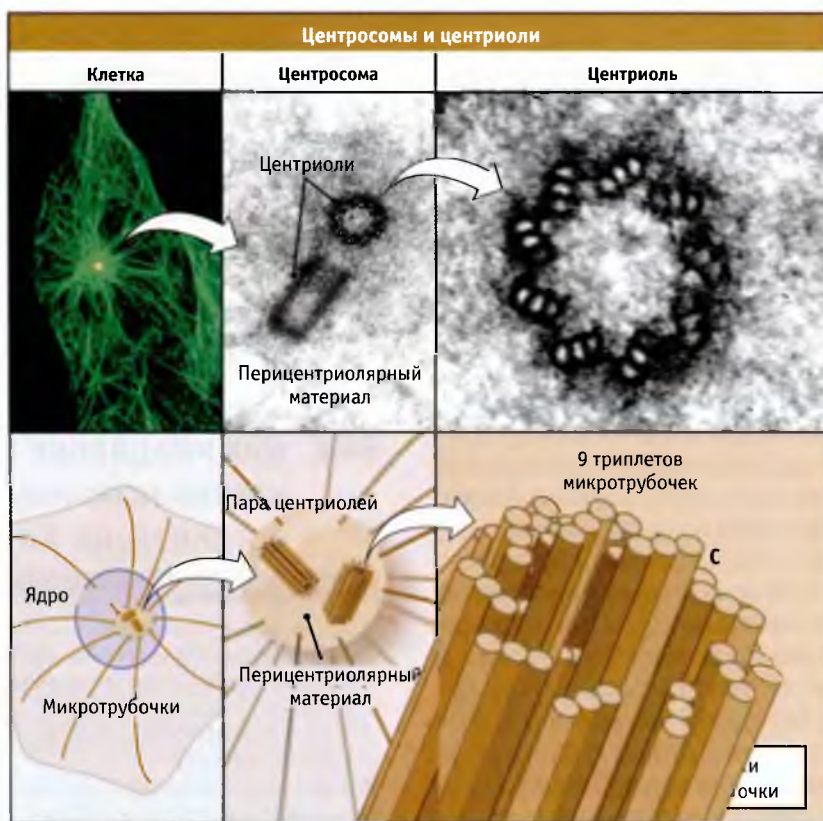
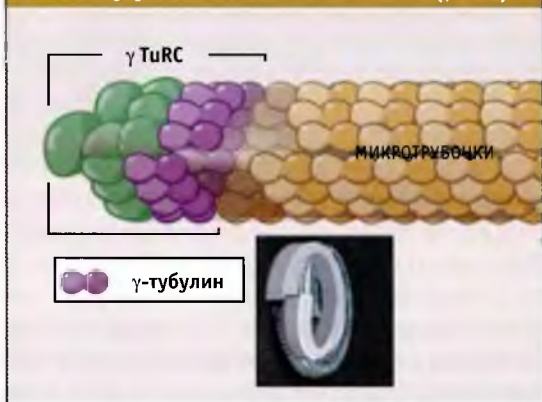


РИС. 7.24. Слева сверху представлена микрофотография клетки, сделанная во флуоресцентном микроскопе. Микротрубочки окрашены в зеленый цвет, а центросомы в желтый. Микротрубочки радиально расходятся от центросомы. В средней и правой частях верхней половины рисунка представлены электронные микрофотографии центросомы и одной из двух ее центриолей. На фотографии центросомы видно, что центриоли расположены под прямым углом друг к другу. Перичентриолярный материал выглядит в виде множества гранул, окружающих обе центриоли. Обратите, насколько более прозрачна цитоплазма в верхней и нижней частях фотографии. Фотографии любезно предоставлены Линн Кассимери, Университет Лихай

Гамма-тубулиновый кольцевой комплекс (γ TuRC)



Гамма-тубулин (обозначен пурпурным цветом) и ряд других белков (выделены зеленым цветом) образуют большой комплекс, который служит в качестве затравки для сборки микротрубочек на минус-концах. В этом комплексе γ -тубулиновые субъединицы расположены в виде витка спирали, образуя структуру, напоминающую разрезную шайбу (изображена внизу) того же диаметра, что и микротрубочка. Шаг спирали кольца, образованного γ -тубулином, такой же, как у субъединиц микротрубочки. Это позволяет предполагать, что комплекс нуклеирует микротрубочки путем позиционирования первого витка субъединиц. Фотографии любезно предоставлены Линн Кассимери, Университет Лихай

который носит название **γ -тубулиновый кольцевой комплекс (γ TuRC).**

Этот комплекс связывается с α - и β -тубулинами и является компонентом centrosомы, ответственной за нуклеацию микротрубочек. Механизм этого процесса еще не вполне ясен, однако предложена структура комплекса. Молекулы γ -тубулина в каждом γ TuRC расположены в виде витка очень плоской спирали. По форме комплекс напоминает разрезную шайбу (рис. 7.25). Эта структура похожа на один оборот спирали, если бы субъединицы тубулина располагались бок о бок вокруг поверхности микротрубочки. Такое строение предполагает, что γ TuRC служит как бы матрицей для образования конца микротрубочки. Так как γ TuRC нуклеирует микротрубочки, то ясно, что он делает это, начиная с их минус-конца.

Во многих клетках ориентация микротрубочек определяется в процессе их нуклеации, происходящей с участием γ TuRC. Поскольку γ TuRC связывается только с минус-концами микротрубочек, их плюс-концы отстоят далеко от centrosомы (рис. 7.26). Когда centrosома находится в центре клетки, микротрубочки располагаются звездообразно, причем все плюс-концы обращены к краю клетки.

Centrosомы воспроизводятся в ходе каждого клеточного цикла при подготовке к митозу. Вначале дублируются центриоли. Как показано на рис. 10.20, это происходит одновременно с репликацией ДНК (см. 11 *Регуляция клеточного цикла*). При дупликации под прямым углом к каждой из существующих центриолей образуются новые. При разделении centrosомы на две, каждая получает одну предсуществующую и одну вновь образованную центриоль. В митозе две новые centrosомы разделяются (см. 10 *Митоз*), и таким образом каждая дочерняя клетка получает по одной centrosоме, состоящей из двух центриолей. Почему новые центриоли образуются только рядом с существующими, почему у каждой из существующих образуется только одна новая центриоль, и почему они располагаются точно под прямым углом предсуществующим, остается неясным. Также неизвестно, каким образом центриоли участвуют в образовании перичентриолярного матрикса.

Centrosома представляет собой динамическую структуру, размеры которой меняются в ходе клеточного цикла. После дупликации centrosомы продолжают расти по мере подготовки клетки к митозу. При наступлении митоза скорость нуклеации микротрубочек в centrosомах возрастает примерно в 5 раз. Вероятно, такое увеличение «рождаемости микротрубочек» в митозе играет важную роль, поскольку для образования митотического веретена необходима очень высокая плотность микротрубочек.

Подвижные клетки млекопитающих (например, сперматозоиды) содержат еще один, более специализированный ЦОМТ, который называется базальным тельцем. Базальные тельца служат в качестве матриц для сборки аксонемы, структурного комплекса, состоящего из микротрубочек, который образует основу ресничек и жгутиков, и обуславливает их двигательную активность (см. 7.16 *Реснички и жгутики являются подвижными структурами*).



РИС. 7.26. Определенное расположение сайтов нуклеации является одним из путей организации микротрубочек в клетке. Все микротрубочки, нуклеация которых происходит на centrosоме, обладают одинаковой полярностью и часто остаются связанными с centrosомой. Этого оказывается достаточно для радиальной организации микротрубочек, при котором их минус-концы располагаются в центре клетки, а плюс-концы — на периферии. На фотографии centrosомы обозначены как две оранжевые точки. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай

Структурно, базальные тельца очень напоминают центриоли. Они обладают цилиндрической формой и состоят из таких же девяти триплетов микротрубочек, связанных друг с другом. Близость структуры отражает общность функций: в некоторых клетках базальные тельца могут превращаться в центриоли. Однако, в отличие от центриолей, они не функционируют попарно, и в данном случае нуклеация микротрубочек происходит непосредственно, а не с участием окружающего матрикса. При образовании ресничек и жгутиков микротрубочки растут непосредственно из триплетов базальных телец. В течение выполнения своей функции базальные тельца остаются присоединенными к минус-концам образовавшихся микротрубочек, которые находятся в основании ресничек и жгутиков.

Не во всех клетках centrosomes служат для нуклеации микротрубочек, однако во всех эукариотических клетках находится один или несколько тех или иных ЦОМТ, необходимых для нуклеации и организации микротрубочек. У грибов эквивалентом centrosomes является структура, которая называется **полярным тельцем веретена деления**. Эта структура заключена в ядерной оболочке. У клеток растений нет определенных структур, функционирующих как ЦОМТ, однако они обладают несколькими местами нуклеации микротрубочек, которые распределены по клетке. Во многих дифференцированных клетках млекопитающих, включая нейроны, эпителиальные и мышечные клетки, присутствуют пучки микротрубочек, которые не связаны с centrosomes. Это позволяет предполагать, что в клетках существуют другие, небольшие по размеру ЦОМТ, которые являются центрами сборки микротрубочек. Например, в эпителиальных клетках присутствует несколько сайтов нуклеации микротрубочек, расположенных поблизости от апикальной части клетки. Плюс-концы микротрубочек растут из апикальных ЦОМТ по направлению к базальной части клетки. Все ЦОМТ клеток растений, животных и грибов содержат γ -тубулин. Это позволяет предполагать, что все ЦОМТ используют одинаковый механизм для нуклеации микротрубочек.

одних микротрубочек и укорачивание других, в каждом конкретном случае для выяснения механизма необходимо наблюдать за индивидуальными микротрубочками в клетке. Для того чтобы иметь возможность проследить за сборкой микротрубочек, необходимо пометить тубулин с помощью флуоресцентной метки. Это достигается с помощью экспрессии тубулина, связанного с флуоресцирующим белком, или при введении в клетки очищенного тубулина, конъюгированного с флуоресцентным красителем. После этого клетки исследуют под световым микроскопом и через каждые несколько секунд регистрируют интенсивность флуоресценции. С помощью этого метода было получено статическое изображение микротрубочек в живой клетке, представленное на . В точках, примыкающих к краям клетки, можно видеть много отдельных микротрубочек, которые попеременно растут и укорачиваются. Такие типы микротрубочек часто расположены рядом друг с другом. На показаны две такие микротрубочки, расположенные рядом, ближе к краю клетки — одна из них растет, другая диссоциирует.

Описанный метод можно использовать для измерения длины микротрубочек с течением времени и для сравнения их поведения в клетках и *in vitro*. Было показано, что динамическая нестабильность микротрубочек, которые собираются *in vitro* из очищенного тубулина, и тех, которые находят-

7.8 Динамика микротрубочек в клетках

Основные положения

- Динамическая нестабильность является основным способом перестройки (обмена) микротрубочек в клетке
- Плюс-концы микротрубочек намного более динамичны в клетках, чем в системе *in vitro*
- Свободные минус-концы никогда не растут; они или стабилизируются, или деполимеризуются
- Клетки содержат субпопуляцию нединамичных стабильных микротрубочек

В клетках микротрубочки подвергаются сборке и разборке, которая обеспечивается механизмом динамической нестабильности. Поскольку понятие динамической нестабильности подразумевает одновременный рост

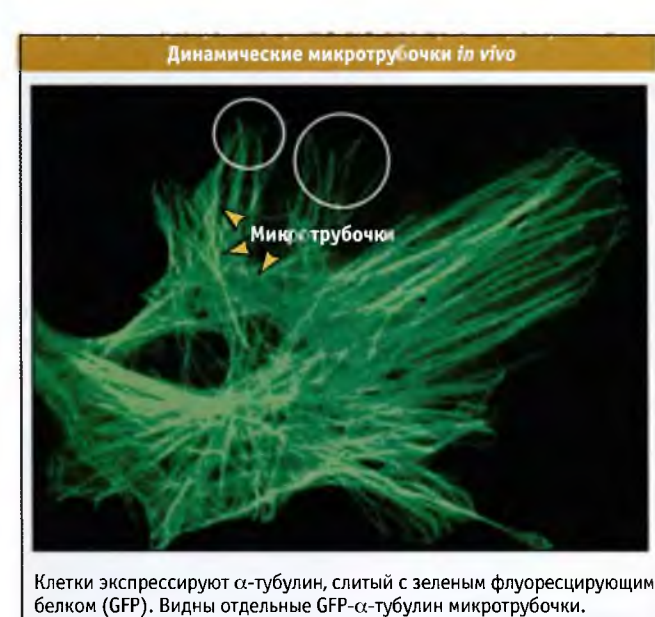


Рис. 7.27 Кадр видеосъемки клетки, которая экспрессирует флуоресцирующий тубулин. Микротрубочки окрашены зеленым цветом. Видеосъемка показывает, что за счет динамической нестабильности многие микротрубочки растут и укорачиваются. В двух выделенных областях клетки находятся динамические микротрубочки. На рис. 7.28 представлена серия изображений, полученных для одной из этих областей. Фотография любезно предоставлена Мишел Пил, Университет Лихай

Динамическая нестабильность *in vivo*

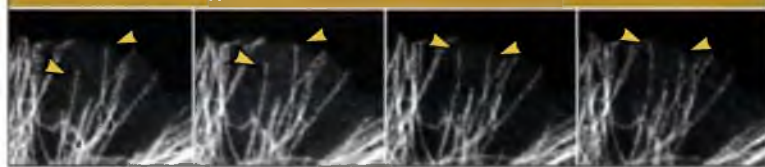


рис. 7.28. Видеосъемка небольшой области, расположенной на периферии клетки, которая экспрессирует флуоресцирующий тубулин. Показаны четыре рамки видеоизображения, записанного в течение определенного времени. Стрелками обозначены две индивидуальные микротрубочки. Микротрубочка, расположенная слева, постоянно растет, в то время как правая укорачивается. Фотографии любезно предоставлены Линн Кассимери, Университет Лихай

ся в клетках, различна. В живых клетках плюс-концы микротрубочек гораздо более динамичны, чем у микротрубочек, полимеризованных из очищенного тубулина. Плюс-концы микротрубочек в клетках растут в 5–10 раз быстрее, чем *in vitro*. Как следует из рис. 7.29, микротрубочки, находящиеся в клетках, также чаще переключаются от процесса роста к укорочению. Для микротрубочек *in vitro* реже наблюдаются паузы, в продолжение которых не регистрируется ни роста, ни укорочения. Для микротрубочек в клетке такие паузы регистрируются часто. Эти различия между характером динамики микротрубочек *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о том, что клетка меняет динамическую нестабильность, ускоряя или замедляя этот процесс. Как будет ясно из дальнейшего изложения, это достигается за счет действия белков, связывающихся с микротрубочками.

Способность клеток регулировать процесс сборки микротрубочек впервые была продемонстрирована при сравнении их динамики в интерфазе и в митозе. Первоначально, для наблюдения за процессами, происходящими с микротрубочками в клетке, использовался метод, позволяющий измерить скорость, с которой в определенном участке клетки образуются новые микротрубочки. Эта техника называется **методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания** (FRAP) (см. 7.20 Приложение: Метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания). На рис. 7.30 представлены фотогра-

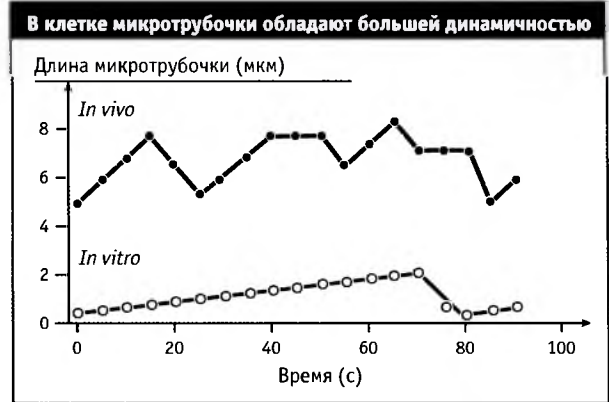


рис. 7.29. Каждая кривая показывает изменение длины микротрубочки во времени. Линия голубого цвета показывает рост микротрубочки из очищенного тубулина *in vitro*. Как видно, трубочка растет более одной минуты, затем происходит почти полная ее деполимеризация, после чего рост возобновляется. Красным цветом обозначена кривая, отражающая рост типичной микротрубочки, находящейся в клетке. По длине эта трубочка в несколько раз превышает образующуюся *in vitro*, и для нее характерно большее число переходов за тот же промежуток времени. В отличие от системы *in vitro*, при каждом цикле деполимеризации трубочка укорачивается лишь частично, и иногда между состоянием роста и укорачивания наблюдается пауза

рис. 7.30. Исследование быстрой оборачиваемости микротрубочек веретена с помощью метода восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP). Представлены микротрубочки митотического веретена в клетке, которая экспрессирует флуоресцирующий тубулин. Полюса веретена расположены вверх и вниз. В промежутке времени между съемкой первой и второй рамок флуоресцентная метка тубулина подвергается локальному фотообесцвечиванию на участке, расположенном поперек веретена (выделен скобками). В течение 60 с флуоресценция в обесцвеченной области возвращается к первоначальной интенсивности. Это свидетельствует о том, что через выделенный участок проходят новые микротрубочки, содержащие флуоресцирующие субъединицы тубулина. Появление микротрубочек является результатом постоянной сборки и разборки микротрубочек веретена. Фотографии любезно предоставлены Линн Кассимери, Университет Лихай

Микротрубочки веретена быстро оборачиваются



фии, отражающие изменения микротрубочек, наблюдаемые с помощью FRAP. Было показано, что интерфазные микротрубочки деполимеризуются и замещаются ново-полимеризованными микротрубочками с полупериодом 5–10 мин, в то время как митотические микротрубочки замещаются с полупериодом 0,5–1 мин. Прямое наблюдение за отдельными микротрубочками в митотических клетках с помощью вышеописанной техники показало, что увеличение скорости обмена связано с изменением частоты переходов (например, больше катастроф, меньше спасений) и сильным укорачиванием пауз. Пример изменения частоты переходов представлен на графике (рис. 7.31).

Изменение динамики микротрубочек, которое наблюдается при вступлении клетки в митоз, происходит с участием цитоплазмы. Динамика микротрубочек может регулироваться и в отдельных частях клетки. Например, для микротрубочек, расположенных вблизи клеточного центра, характерна небольшая вероятность наступления катастроф. Они постоянно растут по направлению к периферии клетки. Переключение между ростом и укорочением гораздо чаще происходит в областях, примыкающих к границе клетки вблизи от плазматической мембраны. Если бы в глубине и на периферии клетки не было дифференциальной регуляции динамики, то лишь некоторые микротрубочки достигли бы ее границ.

Не для всех микротрубочек характерна одна и та же динамика. Многие интерфазные клетки характеризуются присутствием двух различных популяций микротрубо-



РИС. 7.31. Две кривые, описывающие изменение длины типичных интерфазных (голубая линия) и митотических (красная линия) микротрубочек во времени. Интерфазные микротрубочки гораздо длиннее, и длина их практически не меняется, причем иногда они не растут и не укорачиваются. Длина митотических микротрубочек непостоянна, и с каждым циклом деполимеризации они сокращаются. Из-за изменений параметров динамической нестабильности, в зависимости от фазы клеточного цикла, митотические микротрубочки выглядят короче и более динамичны, чем интерфазные

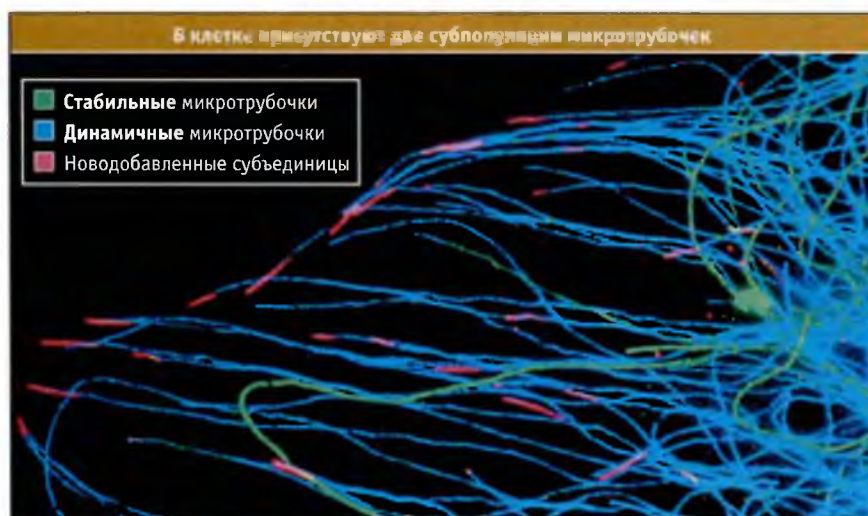


РИС. 7.32. Фотография небольшой области вблизи края клетки, сделанная с помощью флуоресцентного микроскопа. Ковалентно-модифицированная форма тубулина находится только в стабильных микротрубочках и отмечена зеленым цветом; немодифицированная форма тубулина обозначена синим цветом. Непосредственно перед приготовлением препаратов для микроскопии в клетки вводили меченый тубулин, чтобы пометить концы растущих трубочек (обозначен красным цветом). В клетке микротрубочки окрашены либо зеленым, либо синим цветом, что указывает на существование двух отдельных их субпопуляций. Только для синих микротрубочек характерны красные экзпы. Это говорит о том, что к стабильным микротрубочкам субъединицы не присоединяются. Фотография любезно предоставлена Грегг Гандерсон, Колледж врачей и хирургов Колумбийского университета. Воспроизведено из Infante, A. S., et al. *J. Cell. Sci.* 2000. 113: 3907–3919. С разрешения Company of Biologists, Ltd.

чек, которые различаются по скорости обменности. Одна из популяций обладает динамическим характером и обменивается быстро (в течение минут). Вторая состоит из микротрубочек, которые гораздо более стабильны и часто существуют в продолжение часа или дольше. Эти стабильные микротрубочки не растут и не укорачиваются на плюс-концах, что позволяет предполагать, что эти концы у них каким-то образом экранированы. На рис. 7.32 отчетливо видны различия между этими субпопуляциями.

Стабильные микротрубочки образуются из динамических, хотя пока неясно, каким образом это происходит. В клетках содержится несколько ферментов, которые различными путями ковалентно модифицируют α -тубулин. Возможно, что это играет определенную роль (см. 7.21 Приложение: Синтез и модификации тубулина). Стабильные микротрубочки содержат гораздо больше модифицированного тубулина, чем динамические. Это позволяет предполагать, что они являются основными субстратами для этих ферментов и что модифицированные формы тубулина могут подавлять динамику микротрубочек. Функции стабильных микротрубочек пока остаются неясными, однако очевидно, что в разных клетках содержится их различное количество. В недифференцированных клетках примерно 70% микротрубочек представляют

собой динамичные структуры, а 30% — стабильные. Стабильные микротрубочки гораздо более характерны для неделящихся дифференцированных клеток, таких как мышечные и эпителиальные, а также нейроны.

Нуклеация микротрубочек происходит на центросомах, однако не все микротрубочки остаются связанными с ними. Микротрубочки способны высвободиться от центросом, однако скорость, с которой это происходит, зависит от типа клеток и стадии отхождения цикла. Отделение микротрубочек от центросом приводит к их появлению в цитоплазме со свободными плюс- и минус-концами. Свободные микротрубочки также могут образовываться при распаде связанных с центросомами форм.

Свободные микротрубочки могут существовать в клетке в том случае, если их минус-концы стабилизированы, хотя механизм стабилизации неизвестен. В фибробластах свободные микротрубочки быстро диссоциируют, и остаются только те из них, которые связаны с центросомами. В эпителиальных клетках и нейронах минус-концы структур стабильны, и свободные микротрубочки могут существовать в цитоплазме. Эти свободные микротрубочки могут транспортироваться и организовываться при помощи молекулярных моторов (см. 7.11 Общие пред-

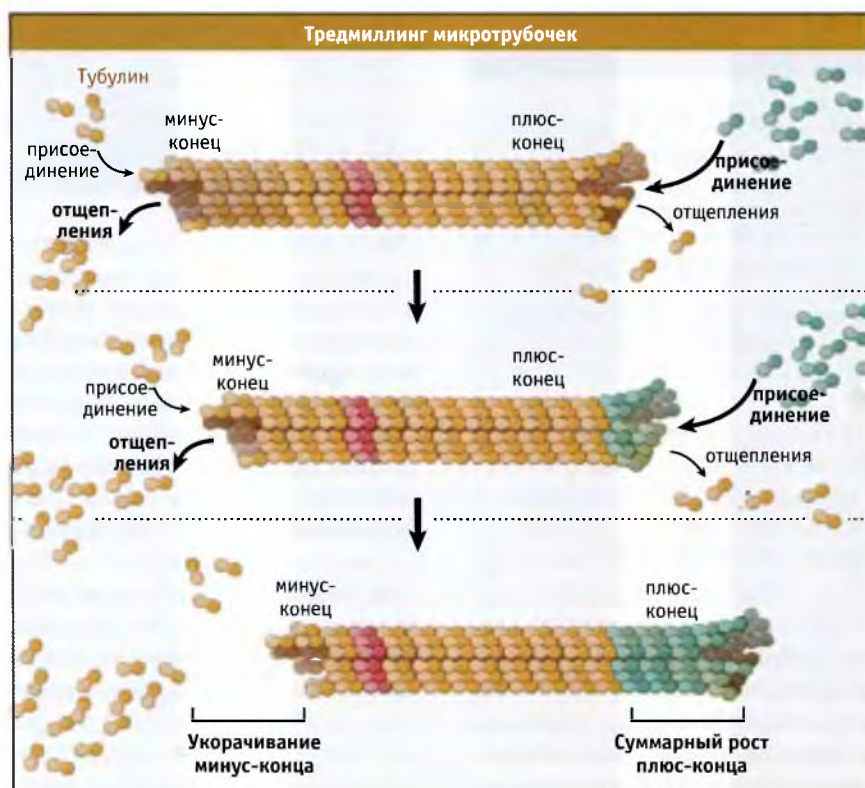


рис. 7.32. В некоторых условиях на микротрубочках происходит процесс тредмиллинга, при котором тубулиновые субъединицы преимущественно добавляются к плюс-концу микротрубочки и отщепляются на минус-конце. Нарастание субъединиц с одного конца микротрубочки и диссоциация их с другого означает, что происходит непрерывный «круговорот» тубулиновых субъединиц, сопровождающийся их продвижением от плюс- к минус-концу. Это показано на примере субъединиц, обозначенных красным цветом. Тредмиллинг является основным путем обменности микротрубочек в клетках растений

ставления о моторных белках микротрубочек), которые позволяют клеткам организовывать микротрубочки в структуры, отличные от радиальных, характерных, например, для фибробластов (см. рис. 7.8).

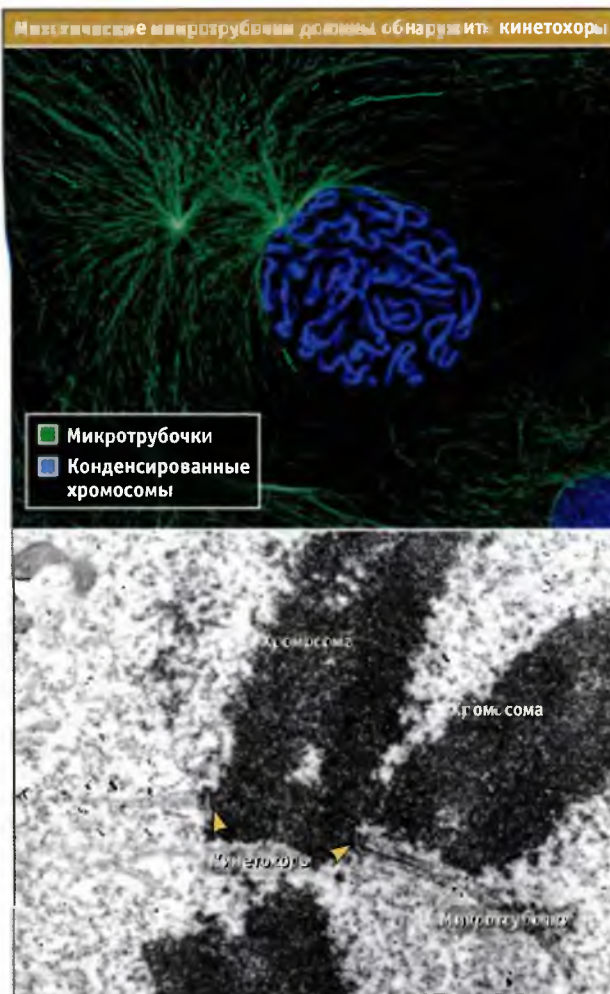
В некоторых клетках, в которых микротрубочки не связаны с центросомами, они подвергаются перестройке (тредмиллингу). Этот процесс характеризуется тем, что за счет динамической нестабильности общий рост микротрубочки обеспечивается преимущественным наращиванием плюс-конца, в то время как минус-конец укорачивается. За счет этого процесса тубулиновые субъединицы присоединяются к плюс-концу и отщепляются с минус-конца. При этом длина микротрубочки сдвигается, как показано на . Процесс тредмиллинга характерен для клеток растений, в которых отсутствуют центросомы (см. 17.15 *Взаимодействия между микротрубочками и актиновыми филаментами*). Тредмиллинг требует участия дополнительных белков и не происходит в растворе очищенного тубулина (подробнее о тредмиллинге актиновых филаментов см. 8 *Актин*).

7.9 Зачем в клетках присутствуют динамичные микротрубочки?

Основные положения

- Динамичные микротрубочки выполняют функцию внутриклеточного поиска и способны быстро обнаруживать необходимые мишени, независимо от их расположения
- Динамичные микротрубочки обладают адаптивными возможностями и способностью к быстрой реорганизации
- Рост и укорочение микротрубочек генерируют силу и могут использоваться для перемещения везикул и других внутриклеточных структур
- Способность микротрубочек генерировать усилия позволяет им самоорганизовываться в звездообразные структуры

Такое свойство микротрубочек цитоскелета, как их нестабильность выработалось в ходе эволюции, поскольку динамичные микротрубочки обнаружены в клетках всех известных эукариотических организмов. Это позволяет предполагать, что на протяжении уже по крайней мере 700 млн лет наличие динамичных микротрубочек является характерной особенностью клеток эукариот. Почему отбор благоприятствовал закреплению в составе клеточных компонентов динамичных полимеров, потребляющих энергию (при гидролизе ГТФ), а не статичных структур, которые необходимо создать лишь один раз? Очевидно, что динамичные микротрубочки легче адаптируются к изменению клеточной активности. Они выполняют функции поиска, способны к реорганизации, и даже могут генерировать механические усилия. Все эти свойства делают цитоскелет, компонентом которого являются динамичные микротрубочки, хорошо приспособленным к разнообразным изменениям клеточных функций. Рис. 7.6 иллюстрирует динамическую перестройку цитоске-



На верхней фотографии представлены микротрубочки и конденсированные хромосомы при вступлении клетки в митоз. На нижнем снимке, сделанном с помощью электронного микроскопа, виден небольшой участок конденсированной хромосомы и два кинетохора. Видны несколько микротрубочек, идущих к каждому кинетохору. Представленные фотографии иллюстрируют случайное расположение хромосом в начале митоза и крайне небольшие размеры кинетохора по сравнению с целой хромосомой. Верхняя фотография показывает плотность динамичных микротрубочек, образованных на каждой центросоме. Плотность микротрубочек и их динамический характер дают им возможность надежно обнаружить каждый кинетохор, несмотря на его незначительные размеры и нефиксированное положение внутри клетки. Верхняя фотография любезно предоставлена Конли Л. Ридер, Уодсвордский центр, нижняя — Линн Кассимери, Университет Лихай

летных микротрубочек при вступлении клетки в митоз; это лишь один пример адаптивных возможностей микротрубочек. (Все это было бы невозможно, если бы микротрубочки не обладали способностью к гидролизу ГТФ. Важность гидролиза ГТФ для обеспечения адаптивных возможностей микротрубочек подчеркивается анализом ситуации, которая могла бы сложиться, если бы микротрубочки не обладали способностью к

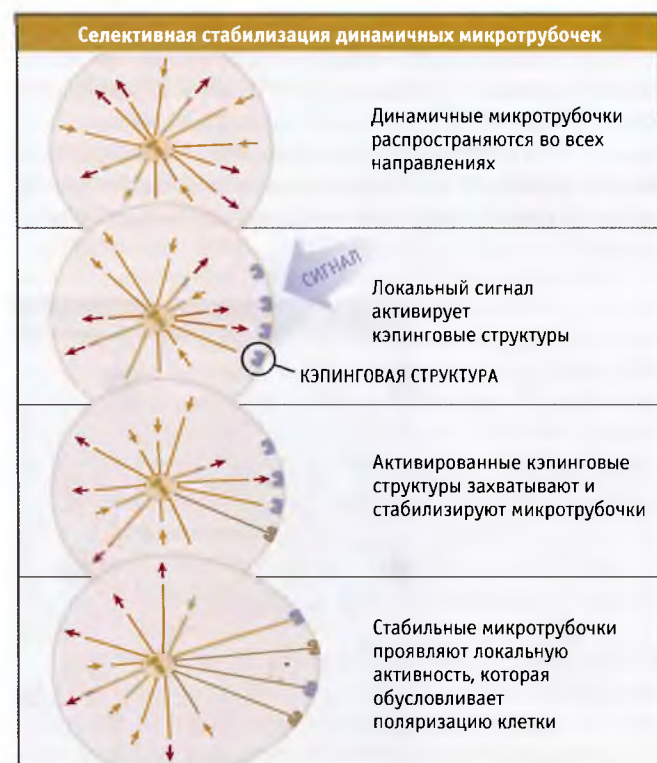
гидролизу ГТФ; см. 7.19 Приложение: Что бы происходило, если бы тубулин не гидролизировал ГТФ?)

Способность динамичных микротрубочек осуществлять функцию внутриклеточного поиска иллюстрируется образованием митотического веретена. Для образования этой структуры необходимо, чтобы микротрубочки, образующиеся на centrosомах, нашли кинетохоры и связались с ними своими плюс-концами. Кинетохор представляет собой область на каждой хромосоме, к которой присоединяются микротрубочки митотического веретена. В клеточном масштабе кинетохоры чрезвычайно малы, и centrosомы отстоят от них на значительном расстоянии (). При масштабировании клетки таким образом, чтобы каждый кинетохор по размеру соответствовал бы дюймовому буллиу в центре доски для игры в дартс, centrosома отстояла бы от него на расстоянии броска дротика. Если бы ориентация микротрубочек осуществлялась посредством centrosом, это потребовало бы невероятных усилий и «знания» деталей расположения кинетохора. Вместо этого, за счет динамической нестабильности, centrosомы надежно соединяются с кинетохорами, что не требует каких-либо дополнительных усилий. Centrosомы нуклеируют организацию микротрубочки во всех направлениях, тщательно зондируя всю цитоплазму с помощью массы окончаний этих растущих микроструктур. Микротрубочки, которые не обнаруживают кинетохор, быстро диссоциируют, высвобождая тубулиновые субъединицы для построения новых. Те немногие, которые его находят, стабилизируются, устанавливая связь между полюсами и хромосомами. Хотя лишь небольшая часть микротрубочек находит кинетохор, быстрый постоянный процесс их сборки и разборки за счет динамической нестабильности позволяет всего за несколько минут найти все кинетохоры и связать их с centrosомами. За столь короткий отрезок времени каждый кинетохор связывает до 40 микротрубочек. Этот механизм образования веретена носит название **поиска и захвата** и обладает тем преимуществом, что для него не требуется предварительно устанавливать расстояние между centrosомами и кинетохорами. Такая гибкость системы используется при каждом делении, поскольку положение хромосом оказывается различным для каждой клетки в начале митоза и для каждого деления.

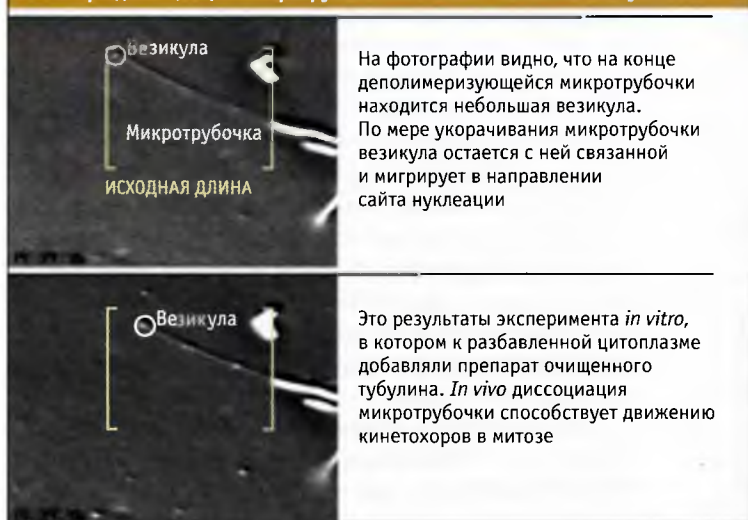
На рисунке представлены процессы роста, разборки и избирательной стабилизации микротрубочек, которые обеспечивают образование митотического веретена, а также необходимы для осуществления других функций, особенно связанных с реакцией клеток на изменения окружения. Клеткам часто необходимо осуществлять процессы поляризации по отношению к сигналам, которые возникают на плазматической мембране, например при контакте с другими клетками. Место получения клеткой сигнала предсказать заранее невозможно, и оно может занимать лишь небольшую часть клеточной поверхности. Однако постоянно протекающие процессы сборки и разборки динамических микротрубочек в цитоплазме обеспечивают возможность обнаружения сигнала. Если в результате приема клеткой сигнала происходит стабилизация мик-

ротрубочек, они начинают функционировать как транспортные пути для везикул, обеспечивая их поступление в определенную клеточную область. За счет образования новой мембраны в определенной области, клетка поляризуется и приобретает более удлинненную форму. Одним из примеров локальной стабилизации микротрубочек и поляризации клеток является зарастание клетками участка, образующегося при удалении части монослоя культуры, растущей в чашке Петри (искусственная рана). Для зарастания необходимо, чтобы клетки, расположенные с краю, переместились на пустой участок и начали делиться. До начала движения клетки должны поляризоваться в нужном направлении. При поляризации происходит реориентация микротрубочек, за счет локальной стабилизации тех из них, которые обращены в сторону раны.

В ходе эволюции закрепление динамических микротрубочек в качестве элементов внутриклеточных струк-



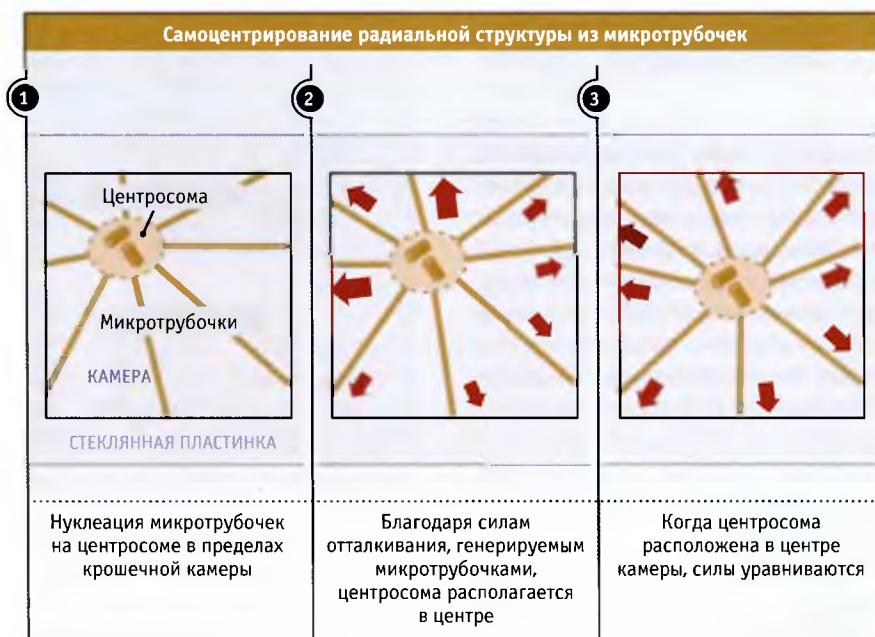
Локальные изменения стабильности микротрубочек обеспечивают поляризацию клеток и изменение ее формы. Как представлено на рисунке, в клетке округлой формы вначале микротрубочки располагаются радиально. Микротрубочки все время исследуют клетку, постоянно оборачиваясь за счет динамической нестабильности. При поступлении локального сигнала происходит стабилизация части микротрубочек. Затем стабильные микротрубочки создают полярность клетки и определяют специализацию региона, например, за счет направленного транспорта везикул к определенному участку мембраны. Этот механизм «селективной стабилизации» представляет собой один из путей, посредством которого может меняться случайный характер сборки и разборки микротрубочек и образовываться поляризованная клетка



Представлены два кадра видеозаписи. В эксперименте *in vitro* к концу микротрубочки была присоединена везикула. При укорачивании микротрубочки по направлению к сайту нуклеации везикула остается связанной с концом микротрубочки и транспортируется в том же направлении. Фотографии любезно предоставлены Линн Кассимери, Университет Лихай

тур произошло также потому, что они оказались способными генерировать механические усилия и обеспечивать подвижность различных объектов. Подвижность объекта зависит от его способности фиксироваться на конце растущей или укорачивающейся микротрубочки, что позволяет ему передвигаться при изменении ее длины. Этой способностью обладают некоторые белки и

органеллы, включая хромосомы и некоторые везикулы, которые могут транспортироваться на концах микротрубочек. На рис. 7.35 показано перемещение везикулы, расположенной на кончике укорачивающейся микротрубочки. Для движения, связанного с укорачиванием микротрубочек, используется энергия ГТФ, запасаемая в микротрубочке при ее полимеризации. Большинство



В этом эксперименте для формирования радиального расположения динамических микротрубочек в крошечной камере, по размеру напоминающей клетку, использовали centrosому. В течение нескольких минут centrosома самопроизвольно перемещалась в центр за счет возникновения сил отталкивания растущих микротрубочек от стенок камеры. Относительная величина возникающих сил выражается стрелками различной толщины. Способность центрирования или балансировки трехмерной конструкции, состоящей из микротрубочек, продемонстрированная в этом эксперименте, иногда может использоваться для позиционирования внутриклеточных структур

актов перемещения, происходящих в клетках, осуществляют с помощью молекулярных моторов, а не за счет роста и укорачивания микротрубочек. Заманчиво предположить, однако, что динамические микротрубочки развились потому, что давали возможность быстрой реорганизации цитоскелета в ответ на внешний сигнал, обладали способностью к поиску мишеней в цитоплазме, а также могли генерировать механические усилия. (Подробнее о молекулярных моторах см. 7.11 Общие представления о моторных белках микротрубочек.)

Способность динамических микротрубочек генерировать усилия также может использоваться для позиционирования цитоскелета. Это проявляется даже при отсутствии клеточной организации. На рис. 7.37 представлены результаты эксперимента с чистыми центросомами и тубулином, иллюстрирующие это положение. Если поместить центросому в пределы очень малого ограниченного пространства (типа камеры, получаемой методом фотопечати на поверхности стекла, т. е. с применением технологии, которая используется для изготовления компьютерных чипов), а затем стимулировать процесс нуклеации микротрубочек, то центросома будет мигрировать в центр камеры, независимо от положения, которое она исходно занимала. Это происходит потому, что растущие микротрубочки отталкиваются от стенок камеры. Поскольку последние неподвижны, то центросома и микротрубочки смещаются. Когда центросома занимает центральное положение, механические усилия во всех направлениях уравниваются. Процесс развивается аналогично тому, который происходит в клетке, когда в цитоплазме в направлении плазматической мембраны начинает расти много микротрубочек. Так же как и микротрубочки в искусственной камере, в клетке эти микроструктуры растут в направлении плазматической мембраны, позиционируя центросому в центре.

7.10 Для регуляции стабильности микротрубочек клетки используют несколько групп белков

Основные положения

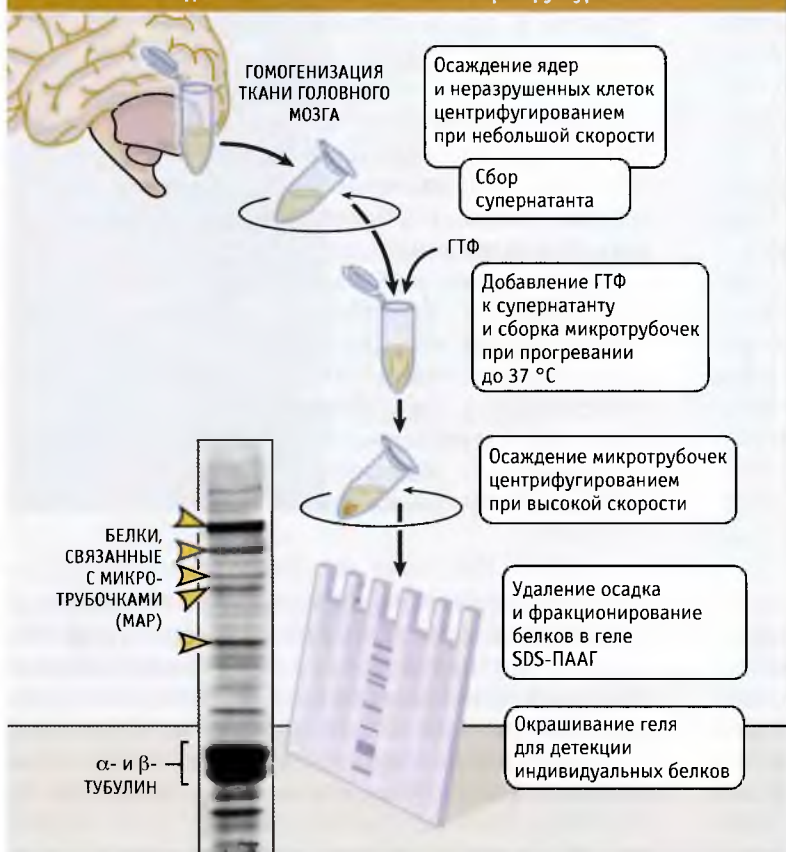
- Белки, связанные с микротрубочками (MAP), регулируют их сборку, стабилизируя или дестабилизируя микротрубочки
- MAP определяют степень вероятности роста или диссоциации микротрубочки
- MAP могут присоединяться к различным сайтам на микротрубочках. Некоторые белки связываются с телом трубочки, некоторые только с концами. Другие связываются только с димерами тубулина, предотвращая их дальнейшую полимеризацию
- Оборачиваемость микротрубочек регулируется изменением баланса между активными стабилизаторами и дестабилизаторами
- Активность MAP регулируется их фосфорилированием
- MAP также способны связывать мембраны или белковые комплексы с микротрубочками

Являясь компонентом цитоскелета, микротрубочки используются клеткой для выполнения разнообразных функций. В одних случаях необходимы стабильные микротрубочки, в других используются динамические. Часто в клетках, к стенкам или концам микротрубочек присоединяются органеллы или другие структуры (включая прочие компоненты цитоскелета). Для выполнения всех этих задач клетки используют ряд белков, которые называются **белками, связанными с микротрубочками** (англ. *microtubule-associated proteins*, MAP). Некоторые MAP модифицируют динамическую нестабильность, активируя или ингибируя процессы полимеризации или деполимеризации тубулина на концах микротрубочек. Другие функционируют в качестве линкеров между концами микротрубочек и мембранными везикулами или другими микроструктурами. Некоторые MAP выполняют обе функции, регулируя сборку микротрубочек и связывание с ними различных компонентов.

Впервые MAP были идентифицированы в составе белков препаратов микротрубочек, выделенных из ткани головного мозга млекопитающих. Эта процедура схематически представлена на рис. 7.38. Два белка, названные MAP2 и tau, обнаружены только в нейронах, и обеспечивают существование долгоживущих микротрубочек, необходимых для функционирования аксонов и дендритов. Они присоединяются вдоль тела микротрубочек. Поскольку эти белки присоединяются сразу к нескольким субъединицам тубулина, они определяют частоту наступления переходов динамической нестабильности. Оба белка подавляют наступление катастроф и сильно увеличивают вероятность спасения микротрубочек, тем самым делая маловероятной их разборку. В результате образуются длинные микротрубочки, которые существуют гораздо дольше, чем это возможно для микротрубочек, содержащих только тубулин. Обычно эти белки связываются по длине всей микротрубочки, покрывая ее поверхность, и выглядят как скобы, укрепленные на стенке микротрубочки, сильно затрудняющие отщепление субъединиц.

Некоторые белки связываются только с плюс-концами микротрубочек. Они обозначаются как «+TIPs». Если пометить эти белки флуоресцентной меткой, они будут выглядеть как короткие участки, расположенные на плюс-концах микротрубочек (рис. 7.39). +TIPs связываются с микротрубочкой только при наличии растущего плюс-конца и, по-видимому, способны перемещаться на растущий конец. На рис. 7.40 представлена микрофотография клетки, экспрессирующей флуоресцентно меченый +TIP. Видеосъемка показывает, что белок выглядит как множество небольших комет, движущихся в цитоплазме, причем каждая комета соответствует растущему концу отдельной микротрубочки. Предполагается, что по мере добавления новых тубулиновых субъединиц к растущему концу микротрубочки к ним присоединяются индивидуальные белки +TIP. Каждый белок остается связанным с микротрубочкой лишь в течение короткого времени и затем отщепляется. Пока белок находится в

Белки, связанные с микротрубочками, выделяются совместно с этими микроструктурами



Показано, как были идентифицированы первые МАР. Для этого использовали головной мозг, поскольку нейроны содержат много микротрубочек. Ткань мозга гомогенизировали в среде, вызывающей деполимеризацию микротрубочек. При последующем центрифугировании удалялись неразрушенные тканевые фрагменты, и в супернатанте оставались только растворимые белки, включая тубулин, который содержится во всех микротрубочках нейронов головного мозга. После деполимеризации тубулина микротрубочки осаждали повторным центрифугированием. Наряду с α - и β -тубулином, обнаруживалось много других белков. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай



Фотография участка клетки, сделанная с помощью флуоресцентного микроскопа. Тубулин флуоресцирует красным, а белок EB1, представитель семейства МАР, который связывается только с плюс-концами растущих микротрубочек, — зеленым. Ядро обладает синей флуоресценцией. Белок EB1 присутствует только в коротких элонгированных сегментах на концах микротрубочек. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай

Белок +TIP является маркером растущих концов микротрубочек



Микрофотография эпителиальной клетки, сделанная во флуоресцентном микроскопе, показывающая расположение +TIP и белка EB1, локализованных на концах растущих микротрубочек. Большая часть флуоресцирующего материала обнаруживается в виде множества мелких, слегка удлинненных пятен, рассеянных по цитоплазме. Белок также присутствует в центросоме

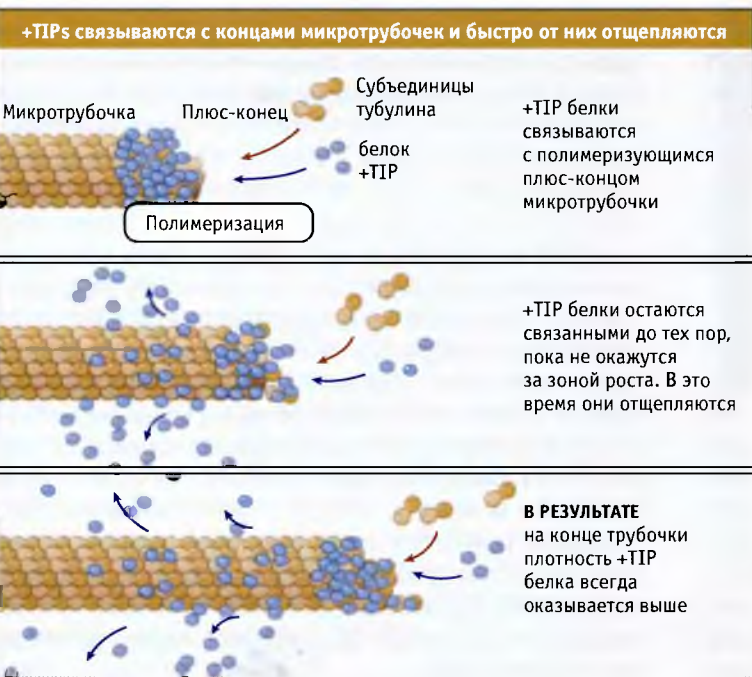
Одна из рамок видеосъемки эпителиальной клетки, показывающая флуоресцирующий +TIP и EB1 белок, связанные с концами микротрубочек. Поскольку белки +TIP связываются с растущими концами микротрубочек, они выглядят как флуоресцирующие кометы, «пролетающие» по цитоплазме. Фактически это движение отражает рост микротрубочек. EB1-GFP препараты эпителиальных клеток предоставлены Ю. С. Тулу и П. Уодсвордом

связанном состоянии, микротрубочка продолжает расти, и к ней все время добавляются новые +TIPs. Постоянное добавление белков +TIP к концу микротрубочки и их отщепление, когда они оказываются позади зоны

роста, позволяет прийти к выводу, о том, что концентрация связанного +TIP белка на концах микротрубочек всегда выше (). С концами микротрубочек связываются несколько различных групп белков. Один из белков, родственник +TIP, обнаружен в различных клетках и называется CLIP-170. Этот белок служит примером MAP белка, обладающего двумя функциями, поскольку он способен стабилизировать микротрубочки, способствуя их спасению, а также связывать с ними эндосомы.

Когда в клетке возникает необходимость в очень динамичных микротрубочках, например в митозе, их обмен возрастает. При этом скорость обмена субъединиц увеличивается за счет MAP, которые снижают стабильность микротрубочек. В основе дестабилизирующего действия белков лежит увеличение вероятности наступления катастроф, приводящих к укорачиванию микротрубочек. Они также снижают вероятность наступления спасения и до начала возобновления роста микротрубочки теряют много своих субъединиц. Дестабилизаторы реализуют свое действие по трем механизмам: они способны разрушать ГТФ-кэпы и стимулировать наступление катастроф; они могут разрезать микротрубочки на куски с образованием множества концов, способных к диссоциации; и наконец, они связывают свободные тубулиновые субъединицы, что снижает доступное для полимеризации количество тубулина. Эти механизмы представлены на

Разрезание микротрубочек происходит с помощью белка катанина, который получил свое название от японского слова «катана», что значит меч. Катанин действует, связываясь со стенкой микротрубочки и нарушая контакты между субъединицами тубулина. Для образования разреза необходимо присоединение к микротрубочке нескольких молекул катанина, а также гидролиз АТФ. Хотя механизм разрезания микротру-



Механизм связывания и высвобождения белков +TIP, позволяющий им локализоваться на растущем конце микротрубочки

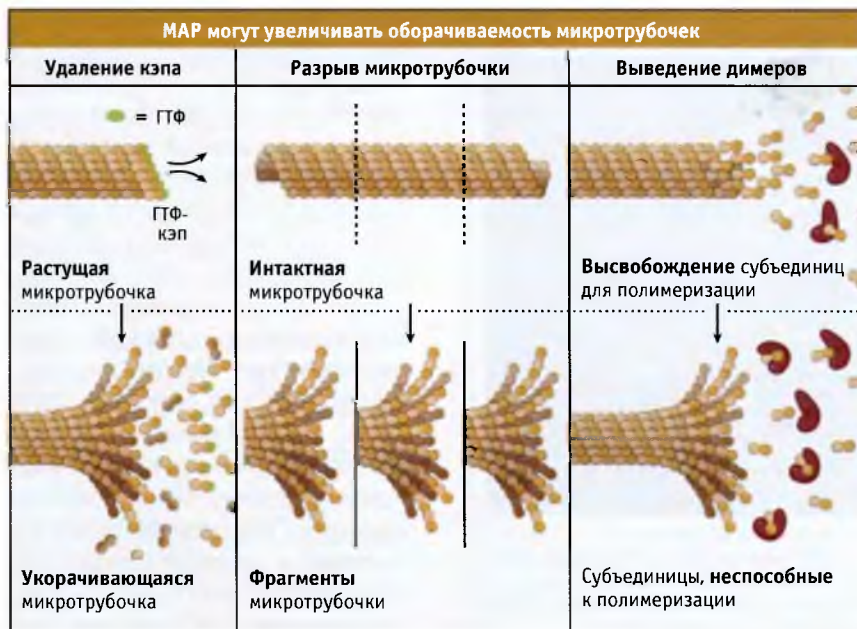


РИС. 7.42. Три пути дестабилизации микротрубочек. Удаление ГТФ-кэпа или разрыв трубочки приводят к обнажению концевых ГДФ-субъединиц и вызывают диссоциацию. При разрыве также увеличивается число концов, способных к одновременной деполимеризации. Связывание свободных тубулиновых субъединиц замедляет полимеризацию и увеличивает вероятность гидролиза ГТФ в субъединицах на конце каждого протофиламента

бочек вполне понятен, пока не ясно, каким образом катанин реализует свою активность в клетке. Белок обнаружен во всех клетках, и исследования на мутантах и с применением ингибиторов свидетельствуют о том, что он участвует в основных клеточных процессах. Например, в клетках некоторых организмов катанин необходим для сборки митотического веретена. Также белок требуется для организации микротрубочек в клетках растений. Однако в обоих случаях непонятно, каким конкретным образом он реализует свой эффект в клетке. Возможно, что он ускоряет деполимеризацию длинных микротрубочек, разрезая их на несколько частей. Это особенно необходимо для крупных клеток, таких как яйцеклетка. Впрочем, катанин может играть и другую роль. Он обнаружен в centrosомах некоторых клеток, и предполагается, что белок принимает участие в отделении новообразованных микротрубочек от ЦОМТ.

Примером белка, дестабилизирующего микротрубочку за счет разрушения ГТФ-кэпа, служит кинезин, связанный с митотической центромерой (МСАК). Он является представителем группы молекулярных моторов — кинезинов и играет важную роль в контроле динамики микротрубочек в митозе (см. 7.11 *Общие представления о моторных белках микротрубочек*). В отличие от большинства белковых моторов, МСАК не транспортирует различные молекулы. Он лишь связывается с концами микротрубочек и дестабилизирует их структуру, способствуя образованию протофила-

ментов, которые отклоняются от прямолинейной ориентации. Такие закрученные протофиламенты теряют контакт с соседними субъединицами, разрушается ГТФ-кэп, и микротрубочка начинает укорачиваться. Затем из деполимеризующихся тубулиновых субъединиц высвобождается МСАК, который снова может связаться с микротрубочками.

Насколько динамичными являются микротрубочки в определенный момент времени, зависит от состояния баланса между стабилизаторами и дестабилизаторами. Сдвиг баланса при активации или инактивации различных МАР повлечет за собой или увеличение стабильности микротрубочек, или усиление обмена субъединиц. Предположение о том, что динамика микротрубочек регулируется за счет баланса между стабилизирующими и дестабилизирующими МАР, впервые было выдвинуто при исследовании двух МАР из яйцеклеток лягушки — ХМАР215 (стабилизатор микротрубочек) и МСАК. Удаление из клеток белка ХМАР215 приводит к относительному увеличению содержания белка МСАК; в результате этого в клетке образуются очень короткие микротрубочки, и увеличивается частота наступления катастроф (рис. 7.43). Напротив, удаление МСАК благоприятствует смещению баланса в сторону более стабильных микротрубочек, которые достигают значительной длины, поскольку катастрофы наступают редко. Необходим надлежащий баланс между ХМАР215 и МСАК; в противном случае образуется функционально неполноценное веретено деления.

МАР определяют длину и количество микротрубочек

Состояние баланса между эффектами стабилизаторов и дестабилизаторов



Инактивация дестабилизаторов

Неактивен



Большое число длинных микротрубочек, поскольку катастрофы редки

Инактивация стабилизаторов

Неактивен



Очень короткие микротрубочки и частые катастрофы

Рис. 7.43. Размеры структур, состоящих из микротрубочек, определяются совместным действием МАР, которые оказывают стабилизирующее и дестабилизирующее действие. При инактивации дестабилизаторов наступление катастрофы становится менее вероятным, и это приводит к образованию структур, содержащих большое количество микротрубочек. Инактивация стабилизаторов оказывает противоположное действие. Поддержание необходимого баланса между противоположным эффектом компонентов позволяет контролировать размер структуры, состоящей из микротрубочек, и при необходимости быстро менять его

Каким образом регулируется активность МАР? Вообще говоря, изменения стабильности микротрубочек наступают слишком быстро для того, чтобы они обеспечивались экспрессией генов, кодирующих МАР. Поэтому активность многих МАР регулируется степенью их фосфорилирования. Например, при фосфорилировании белка tau его сродство к микротрубочкам снижается. Это приводит к снижению стабилизирующих свойств белка. Фосфорилирование МАР не обязательно проходит во всей клетке. При локальной активации киназы в небольшой области клетки активность МАР может измениться только в этой области. Переключая функции стабилизаторов и дестабилизаторов между состояниями «включено» и «выключено», клетка может

поддерживать баланс, обеспечивающий присутствие более стабильных или более динамических микротрубочек. За счет локального изменения активности МАР, клетка может реагировать на поступление внешних сигналов, обеспечивая в определенных своих частях рост более длинных микротрубочек или их диссоциацию. Локальная регуляция активности МАР происходит при изменении клеточной подвижности и, в частности, при сборке митотического веретена.

Фосфорилирование белка tau связано с болезнью Альцгеймера, хотя и не показано, что изменение динамики микротрубочек играет роль при этом заболевании. Когда tau белок подвергается гиперфосфорилированию, он образует фибриллярные агрегаты, которые можно наблюдать в головном мозге больных (рис. 7.44). Неясно, являются ли изменения белка tau, которые развиваются при болезни Альцгеймера, причиной или следствием патологического процесса. Хотя причинная роль изменений белка tau при болезни Альцгеймера не установлена, некоторые другие нейродегенеративные заболевания вызываются мутациями по гену tau и также приводят к образованию фибриллярных агрегатов tau белка и к развитию болезни.



Рис. 7.44. При болезни Альцгеймера, являющейся нейродегенеративным заболеванием, один из МАР белков нейронов — tau, подвергается гиперфосфорилированию и образует агрегаты, состоящие из парных спирализованных филаментов. Представлена микрофотография выделенных агрегатов, сделанная с помощью электронного микроскопа. Любезно предоставлена Деной Аппельт и Брайаном Балиным, Колледж остеопатий Филадельфия, 1994

7.11 Общие представления о моторных белках микротрубочек

Основные положения

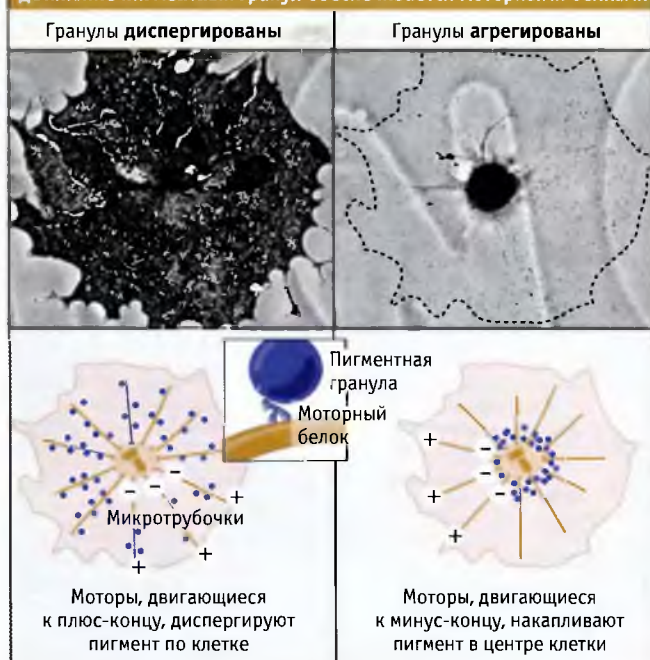
- Для выполнения почти каждой клеточной функции, связанной с микротрубочками, необходимы соответствующие моторные белки
- Молекулярные моторы представляют собой ферменты, которые способны генерировать усилия и совершать «прогулку» по микротрубочке в направлении плюс- или минус-конца
- Домен мотора, называемый «головным», связывается с микротрубочками и генерирует усилия
- «Хвостовой» домен обычно связывается с мембраной или с карго (грузом)
- Кинезины в основном «прогуливаются» по направлению к плюс-концу микротрубочки
- Динеины «прогуливаются» в направлении минус-конца микротрубочки

Одна из основных функций микротрубочек состоит в том, что они служат внутриклеточными транспортными путями для перемещения материалов из одного места клетки в другое. Транспортные средства, которые перевозят грузы по этим внутриклеточным магистралям, называются **молекулярными моторами**. Они представляют собой белки, способные связываться с микротрубочками и многократно использующие циклический процесс гидролиза АТФ в качестве источника энергии для постоянного движения вдоль микротрубочки. Моторные белки доставляют секреторные везикулы к плазматической мембране, обеспечивают транспорт интернализованных везикул в эндосомы, и осуществляют внутриклеточное движение митохондрий и ЭПР. Очень наглядным и красочным примером работы молекулярных моторов является согласованное движение пигментных гранул (небольших везикул, содержащих молекулы пигмента) в клетках чешуек и кожи некоторых видов рыб и амфибий. В ответ на гормональный стимул или на сигнал со стороны центральной нервной системы, молекулярные моторы попеременно концентрируют эти везикулы в середине клетки или распределяют их по цитоплазме. В результате животное меняет окраску, что выполняет защитную функцию от хищников. Соответствующие примеры представлены на рис. 7.45, 7.46 и 7.47.

Наряду с обеспечением подвижности ряда внутренних мембран клетки, моторы участвуют в перемещении хромосом в митозе и в позиционировании веретена. Они также обеспечивают движение ресничек и жгутиков, дающее возможность таким специализированным клеткам, как сперматозоиды, перемещаться в жидкой среде, а неподвижным клеткам транспортировать через поверхность различные материалы. Некоторые вирусы используют клеточные моторы для своей транспортировки в ядро; одним из примеров таких вирусов является ВИЧ.

Однако транспортная функция не является единственной для молекулярных моторов. В отличие от

Движение пигментных гранул обеспечивается моторными белками



На фотографии представлена клетка, содержащая тысячи пигментных гранул — мелких частиц, наполненных темным пигментом. На картинке справа, в светлой области, в виде мелких точек видны отдельные гранулы. К каждой грануле присоединены моторные белки,двигающиеся в сторону плюс- и минус-концов. В ответ на появление гормона мелатонина, минус-концевые моторы сдвигают гранулы от периферии вдоль микротрубочки, и пигмент накапливается в центре клетки. В отсутствие гормона, другие моторы транспортируют гранулы в обратном направлении, и пигмент снова распределяется по всей клетке. Фотография любезно предоставлена Владимиром Родионовым, Медицинский центр университета Коннектикут

транспортных средств, которые лишь перевозят грузы по готовым шоссе, молекулярные моторы также способны изменять форму и расположение транспортной системы микротрубочек, вдоль которых они перемещаются. Из краткого описания некоторых возможностей молекулярных моторов должно быть очевидно, что они представляют собой обязательный компонент всех эукариотических клеток и играют основополагающую роль во всех процессах, происходящих с участием микротрубочек.

В клетке находятся два семейства молекулярных моторов, которые перемещаются вдоль микротрубочек. Это **кинезины**, которые обычно направляются к плюс-концам микротрубочек, и **динеины**, осуществляющие движение в минус-направлении. Наряду с направлением движения мотора, организация сети микротрубочек является источником навигационной информации, необходимой для направления карго к определенному участку клетки. В случае радиальной структуры сети микротрубочек, характерной для типичного фибробласта

Перемещение пигментных гранул

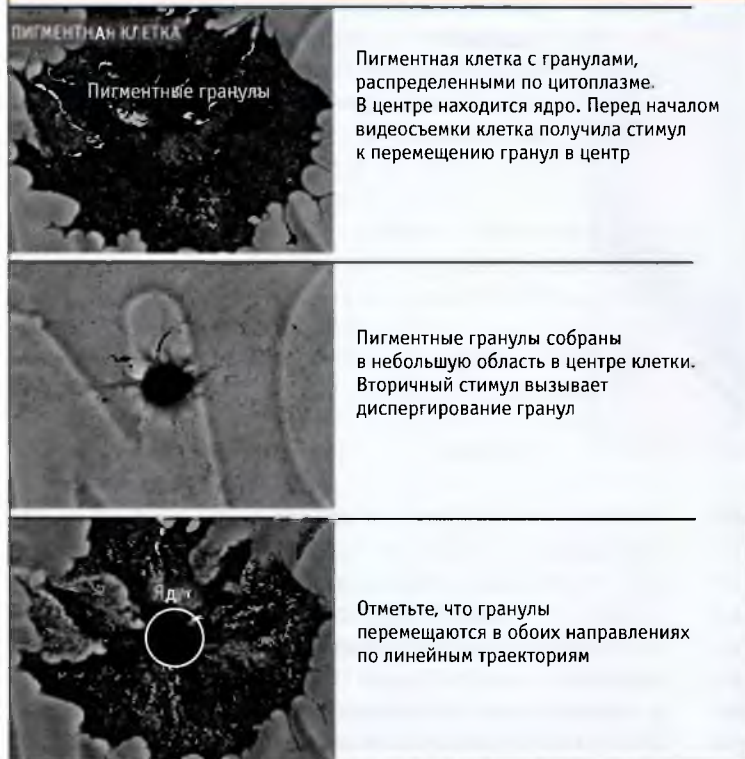


РИС. 7.46. Кадры видеосъемки перемещения пигментных гранул в клетке. На верхнем кадре пигментные гранулы распределены по клетке. На среднем гранулы агрегированы в центре. Нижний кадр показывает возвращение гранул к их исходному распределению по клетке. Видеосъемка показывает, что движение пигментных гранул происходит по линейным траекториям. Кадры видеосъемки любезно предоставлены Владимиром Родионовым, медицинский центр университета Коннектикут

(см. рис. 7.8), моторы, которые движутся к минус-концу микротрубочек, будут транспортировать карго в центр клетки (например, к ядру или к аппарату Гольджи). В то же время плюс-моторы будут перемещать карго к периферии (например, на плазматическую мембрану).

Движение вдоль структуры полярного полимера в одном направлении является существенной особенностью всех молекулярных моторов, независимо от того, перемещаются они вдоль микротрубочек или актино-

вых филаментов. В данном случае полярность полимера способствует направленности движения и проявлению навигационных характеристик мотора. Промежуточные филаменты не обладают полярностью (см. 9 *Промежуточные филаменты*), и не обнаружено моторов, использующих их в качестве транспортных путей.

Карго, которое переносят кинезин и динеин, может также включать сами микротрубочки, и моторные белки часто принимают участие в их организации и реорга-

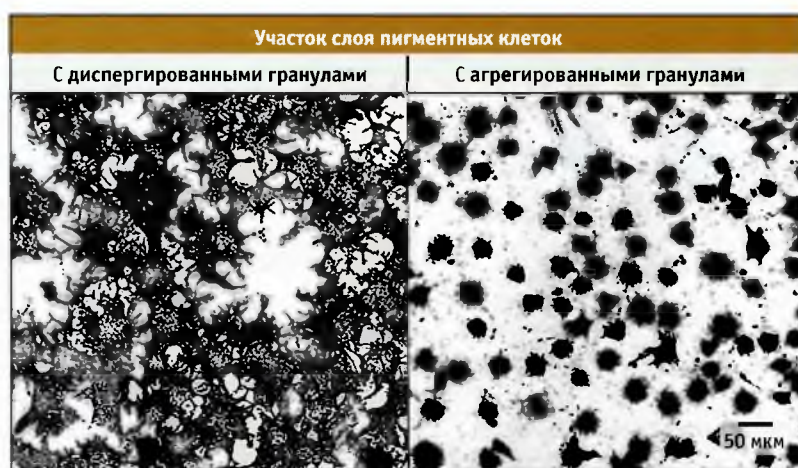
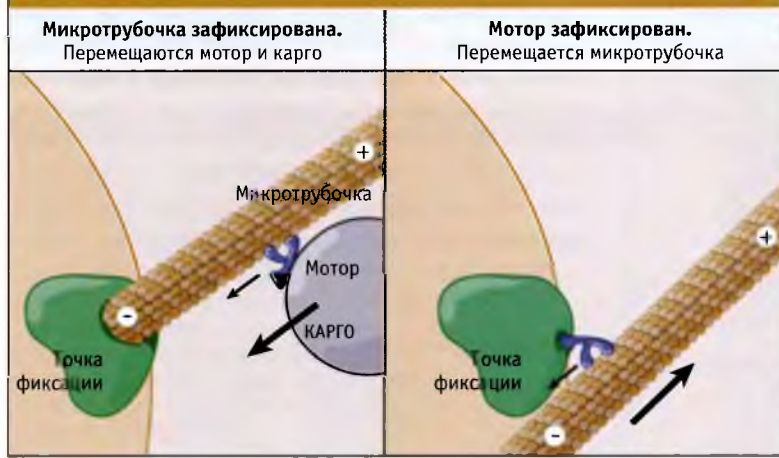


РИС. 7.47. Обычно пигментные клетки равномерно расположены по всей коже. Перемещение пигмента в центр каждой клетки позволяет животному менять окраску. На рисунке иллюстрирующем этот переход, представлен участок слоя пигментных клеток, растущих в культуре. Фотография любезно предоставлена Владимиром Родионовым, Медицинский центр университета Коннектикут

Рис. 7.48 Движение мотора или микротрубочки относительно друг друга зависит от того, какой объект зафиксирован. В клетке возможны оба варианта. При фиксации микротрубочки возможно перемещение везикул, а закрепление мотора приводит к перегруппировке цитоскелета



низации. Как показано на Рис. 7.48, если микротрубочка закреплена (например, присоединена к centrosome), то мотор может продвигаться вдоль нее и транспортировать карго. Если, наоборот, зафиксирован моторный белок (например, связан с кортикальным слоем клетки), то мотор приводит в движение микротрубочку, помогая реорганизовать всю структуру (см. рис. 7.50). При движении микротрубочки для навигационных целей важна

ее полярность; в этом случае полярность микротрубочки определяет направление ее собственного движения.

Все молекулярные моторы, в том числе актин-миозиновый (см. 8 *Актин*), имеют характерную форму, которая позволяет им выполнять свою задачу. Эта форма видна при исследовании выделенных препаратов белковых моторов в электронном микроскопе (Рис. 7.49). Во всех случаях мотор состоит из двух одинаковых больших глобулярных

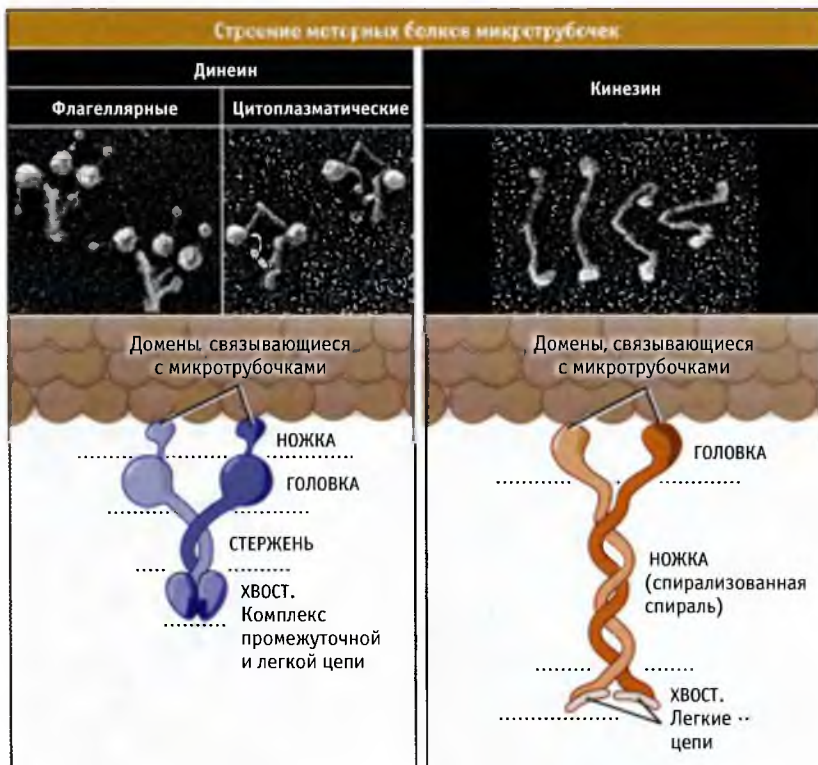


Рис. 7.49. Строение моторных белков микротрубочек по результатам исследований в электронном микроскопе с использованием метода кругового напыления (вверху). В нижней части рисунка схематически представлено связывание моторов с микротрубочками. Каждый мотор состоит из двух или более крупных полипептидов (тяжелых цепей) и нескольких полипептидов меньшего размера (промежуточные и легкие цепи). Фотографии любезно предоставлены Джоном Хойзером, медицинский факультет Вашингтонского университета

доменов, присоединенными к концу еще одного домена, имеющего форму длинного стержня. Поэтому в целом мотор имеет удлинненную форму (4–100 нм). Многие моторы также имеют на другом конце вторую пару меньших по размеру глобулярных доменов. Большие глобулярные домены содержат сайты связывания полимерных молекул (микротрубочек или актиновых филаментов) и АТФ, и называются «головными» или «моторными» доменами. Только эти домены участвуют в выработке силы; остальные служат для ее использования внутри клетки в определенных целях. Динеиновые моторы обладают дополнительной «ножкой», которая выглядит как вырост на глобулярном домене. У динеинов с микротрубочками связывается самый кончик этого выроста. На противоположном конце мотора расположен «хвостовой» домен; в этом месте с мотором связывается карго, например везикулы.

Обычно молекула мотора содержит несколько полипептидов различной длины. Основной полипептид представляет собой димер, состоящий из больших полипептидов, и называется **тяжелой цепью**. Две тяжелые цепи имеют структуру спиралей, которые почти на всем протяжении связаны между собой и образуют центральную стержнеобразную область мотора. Участки, относящиеся к концам спиралей, образуют головной и хвостовой домены. В каждом типе мотора с каждой тяжелой цепью связаны один или два меньших по размеру полипептида, которые называются **легкими цепями**. Они часто выполняют регуляторные функции.

Кинезиновое семейство молекулярных моторов достаточно велико; в клетках человека содержится около 45 различных кинезиновых моторов. Одно это позволяет предполагать, что они выполняют в клетках разнообразные роли, и некоторые из них являются достаточно

высокоспециализированными белками. Более половины кинезинов участвует в транспорте карго в различные компартменты клетки, а остальные функционируют в митозе. В пределах моторного домена кинезины обладают высокой степенью гомологии. Вне этого домена они обнаруживают гораздо большее разнообразие в структуре и часто проявляют существенные различия. По-видимому, эти вариабельные районы способствуют связыванию кинезинов со специфическими карго.

В зависимости от положения моторного домена в тяжелой цепи, семейство кинезинов подразделяется на три группы. У первого из идентифицированных кинезинов моторный домен был расположен поблизости от N-концевого участка цепи. Этот «стандартный» кинезин транспортирует везикулы в направлении плюс-конца микротрубочки. У остальных представителей семейства кинезинов моторный домен расположен ближе к С-концевому участку тяжелой цепи. Такое расположение моторного домена характерно для кинезинов, которые осуществляют транспорт к минус-концу микротрубочки. У нескольких кинезинов моторные домены расположены в середине тяжелой цепи (например, у МСАК). Эти кинезины не участвуют в обеспечении транспортных потребностей клетки, а регулируют динамику микротрубочек, используя энергию гидролиза АТФ для ослабления их концевых структур (см. 7.10 *Для регуляции стабильности микротрубочек клетки используют несколько групп белков*).

Хвостовые домены некоторых кинезиновых моторов могут ассоциировать друг с другом, образуя биполярные моторы, содержащие четыре головных домена. Как показано на РИС. 7.50, наличие моторных доменов, ориентированных в противоположных направлениях, позволяет этим моторам одновременно связываться с

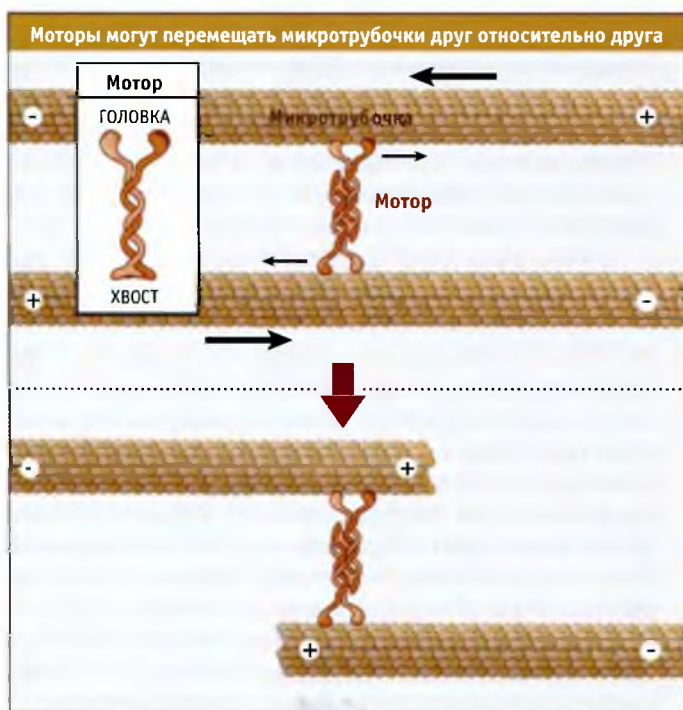


РИС. 7.50. Некоторые кинезины, соединяясь своими хвостовыми доменами, образуют биполярные моторы с двумя моторными доменами на концах. Такие моторы способны одновременно присоединяться к двум противоположно ориентированным микротрубочкам и перемещать их. При этом микротрубочки движутся друг относительно друга. Направление движения мотора обозначено маленькими стрелками; большие стрелки показывают направление перемещения микротрубочек

двумя микротрубочками, вызывая их перемещение. Такое перемещение микротрубочек относительно друг друга особенно важно в митозе (см. 10 Митоз). Оно необходимо для образования как митотического веретена, так и срединного тела — структуры, состоящей из микротрубочек, и играющей существенную роль в цитокинезе. Очевидно, что моторы этого типа участвуют в перегруппировке микротрубочек цитоскелета, и единственным карго для них служат сами микротрубочки.

По сравнению с кинезиновым семейством моторов, динеиновая группа относительно невелика. В отличие от кинезинов, динеины движутся только в направлении минус-конца микротрубочек. Во всех клетках присутствует единственная цитоплазматическая форма динеина, которая принимает участие в транспорте карго и в митозе. Она представляет собой димер, состоящий из двух одинаковых тяжелых цепей, которые в каждой молекуле динеина образуют два моторных домена. Остальные представители группы динеинов, аксонемные динеины, обнаружены исключительно в жгутиках и ресничках. В отличие от цитоплазматических динеинов, они являются гетеродимерами или гетеротримерами, состоящими из различных субъединиц тяжелой цепи, и обладают двумя или тремя моторными доменами. Подробнее об аксонемных динеинах и их участии в движении жгутиков и ресничек см. 7.16. *Реснички и жгутики являются подвижными структурами*).

7.12 Как работают моторные белки

Основные положения

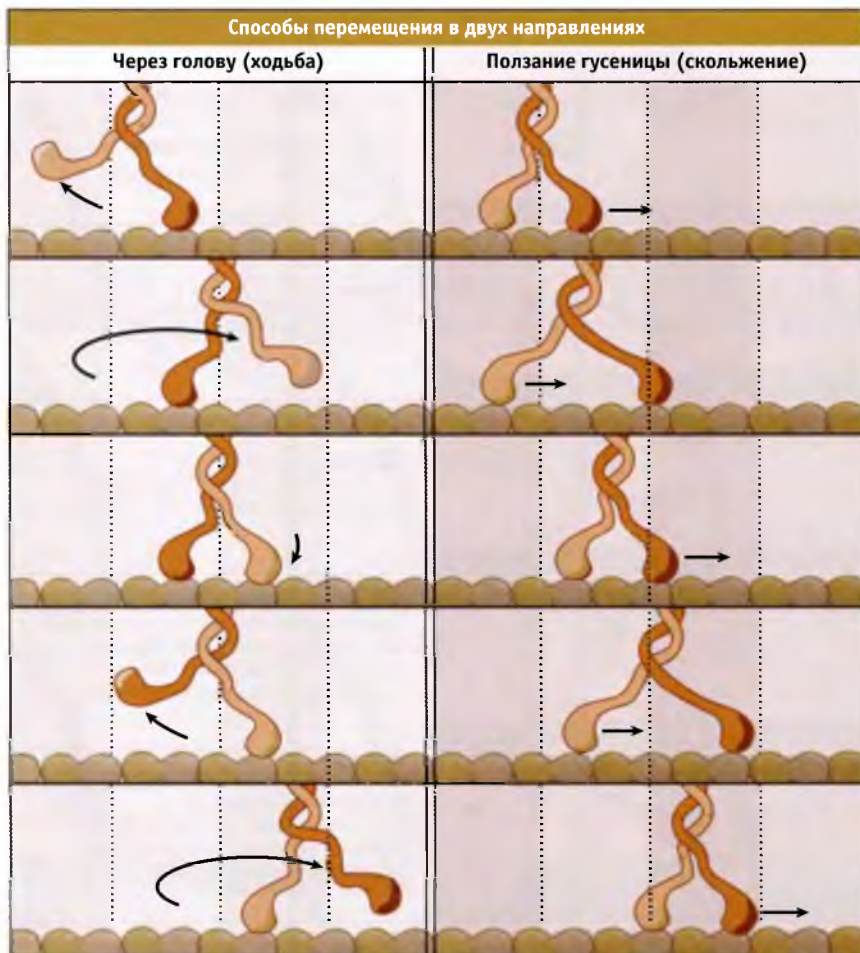
- Для осуществления движения моторные белки используют энергию гидролиза АТФ
- Прочность связывания домена головки мотора с микротрубочкой определяется нуклеотидом, ассоциированным с головкой. Это может быть АТФ или АДФ. Связывание может происходить и без участия нуклеотида
- При гидролизе АТФ меняется также форма головки. Это изменение формы амплифицируется, что обеспечивает более выраженное движение мотора
- Циклы гидролиза АТФ и высвобождения нуклеотида сопряжены с присоединением к микротрубочке и с изменениями формы домена головки мотора. Используя этот механизм, мотор движется по микротрубочке, делая один шаг на каждый цикл гидролиза АТФ

В качестве топлива молекулярные моторы используют АТФ, но каким образом моторные белки превращают химическую энергию АТФ в механическую работу? В данном разделе мы рассмотрим, как происходит движение моторных белков по микротрубочкам. Мы бы очень мало знали об этом, если бы не имели возможности наблюдать за движением моторов. Здесь мы не будем подробно рассматривать, каким образом исследуют эти процессы, однако интересующиеся читатели могут найти всю информацию в 7.22 Приложение: Методы изучения подвижности моторных белков микротрубочек.

Основное требование, предъявляемое к мотору, заключается в том, чтобы за время между присоединением АТФ и образованием АДФ могли пройти очень существенные конформационные перестройки. Это достигается за счет изменений моторного домена и примыкающих к нему участков молекулы и напоминает процесс управления движением наших конечностей. В обоих случаях небольшие локальные изменения формы или положения усиливаются и приводят к гораздо более выраженным изменениям в другом месте. Например, относительно небольшое сокращение мышцы бедра при ходьбе вызывает перемещение голени вверх и вперед, и, таким образом, незначительные изменения длины мышцы усиливаются, вызывая гораздо более выраженные изменения в положении ноги. В случае моторных белков, в результате гидролиза АТФ до АДФ в области связывания нуклеотида (нуклеотид-связывающий карман) происходят небольшие изменения формы головки моторного домена. Эти изменения усиливаются, проявляясь в другой части молекулы в перемещении вперед одной из головок.

Так же как и пешеходы, молекулярные моторы должны быть способны открепляться от поверхности, на которой они находятся; в противном случае ни те, ни другие не смогут продвигаться дальше. Так же как и пешеход, для того, чтобы шагнуть вперед должен поднять ногу, белковый мотор должен открепиться от микротрубочки для дальнейшего продвижения. Насколько прочно мотор связывается с микротрубочкой, зависит от содержимого нуклеотид-связывающего кармана. Он может не содержать нуклеотидов, содержать АТФ или АДФ. Для кинезинов связывание с микротрубочками оказывается наиболее прочным, когда в области кармана находится связанный АТФ. Связь мотора с микротрубочкой регулируется за счет гидролиза АТФ и при высвобождении нуклеотида. Это происходит за счет изменения прочности связи кинезина с микротрубочкой. Поскольку при гидролизе АТФ также изменяется форма головки моторного домена, процессы связывания нуклеотида, его гидролиза и высвобождения обеспечивают координацию между формой мотора и его связыванием с микротрубочкой. Это позволяет мотору сделать один «шаг» на каждую молекулу гидролизованного АТФ, т. е. осуществить один цикл: связывание с микротрубочкой, изменение конформации и высвобождение нуклеотида.

Для мотора с двумя головками можно представить два различных способа перемещения вдоль микротрубочки. Мотор может шагать «через голову», как это представлено на рис. 7.51. При этом, при каждом шаге вперед, головка, расположенная сзади, проходит мимо передней головки. Такой способ напоминает движения, которые мы совершаем при ходьбе, с каждым шагом перенося вперед ногу. Другой способ предполагает, что движение доменов мотора напоминает ползущую гусеницу. Головка, расположенная сзади, подтягивается по направлению к передней, затем передняя начинает двигаться вперед и цикл повторяется (см. рис. 7.51). Все известные моторы с двумя головками перемещаются по микротрубочкам, шагая «через голову». Иными словами, можно представить, что кинезин и другие моторы «прогуливаются» по микротрубочке.



Два способа перемещения мотора с двумя головками по микротрубочке. При согласованных движениях двух головок кинезин перемещается как ползущая гусеница (справа). При этом головка, обозначенная красным цветом, продвигается вперед, а помеченная оранжевым к ней подтягивается, и весь цикл повторяется. Оранжевая головка никогда не занимает место впереди красной. Хотя существование этого способа вполне вероятно, такой мотор пока не найден. Все известные моторы с двумя головками перемещаются по шагающему механизму: две головки перемещаются одна за другой, попеременно становясь ведущими (слева)

Важную роль в перемещении кинезина играет малый домен. Он называется **шейным линкером** и представляет собой последовательность, состоящую из 15 аминокислот, которая находится между головкой и спирализованной ножкой. Шейный линкер является частью молекулы кинезина, которая усиливает небольшие изменения структуры нуклеотид-связывающего кармана для того, чтобы обеспечить кинезину возможность делать длинные шаги. Усиление достигается за счет качательных движений шейных линкеров, которые можно рассматривать как «ноги» молекулы кинезина. Как мы вскоре увидим, перемещение кинезина обеспечивается АТФазным циклом обеих головок, контролирующим движение шейных линкеров.

При продвижении кинезина по микротрубочке обе головки работают в тандеме. Изменения, происходящие в одной из головок, часто являются результатом изменений в другой. Чтобы понять, каким образом цикл гидролиза

АТФ обеспечивает движение мотора по микротрубочке, начнем с момента прикрепления кинезина (FYL 7.57). Одна из головок прочно зафиксирована на микротрубочке, и ее связывающий карман не содержит нуклеотидов. За головкой расположен шейный линкер. Связывающий карман второй головки содержит АДФ, и сама головка свободно расположена вдоль микротрубочки. Кинезин готов сделать первый шаг, и между обеими головками начинают разворачиваться события, координирующие их дальнейшие движения. При связывании АТФ с передней головкой (головка 1) ее шейный линкер отклоняется вперед по направлению к плюс-концу микротрубочки. Это движение приводит к тому, что головка 1 перемещает головку 2 в лидирующее положение, и она располагается над следующим сайтом связывания на микротрубочке. Затем головка связывается с сайтом и отщепляет АДФ. Гидролиз АТФ, связанного с головкой 1, приводит к упрочению взаимодействия между головкой 2 и микротру-

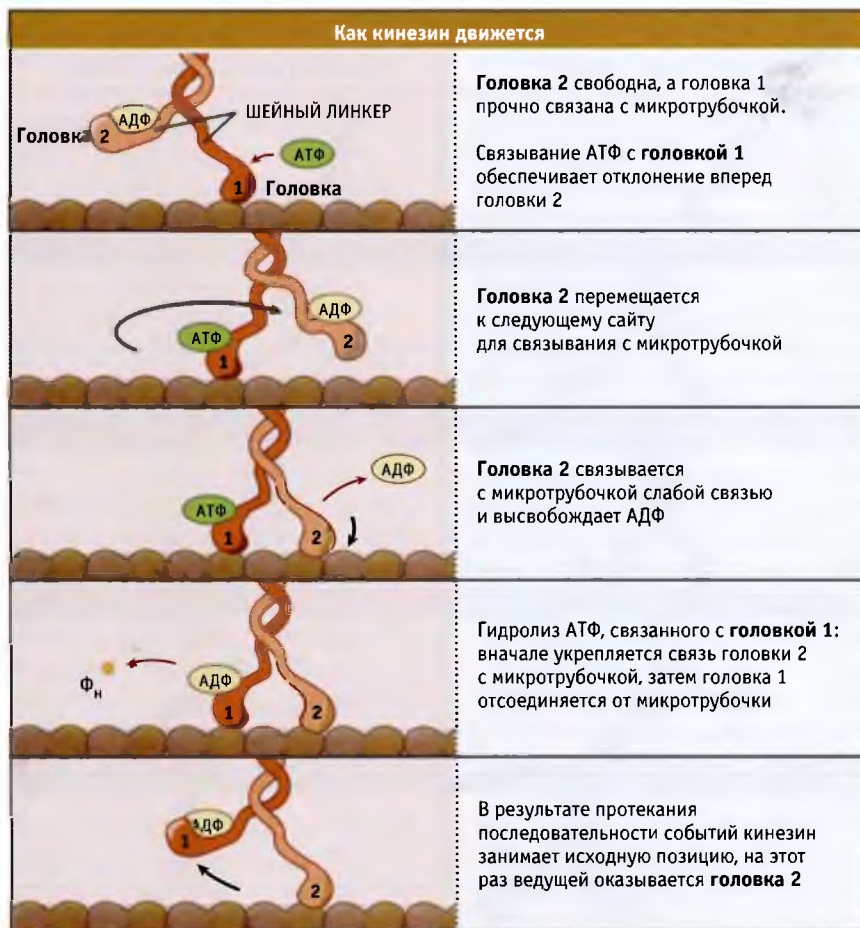
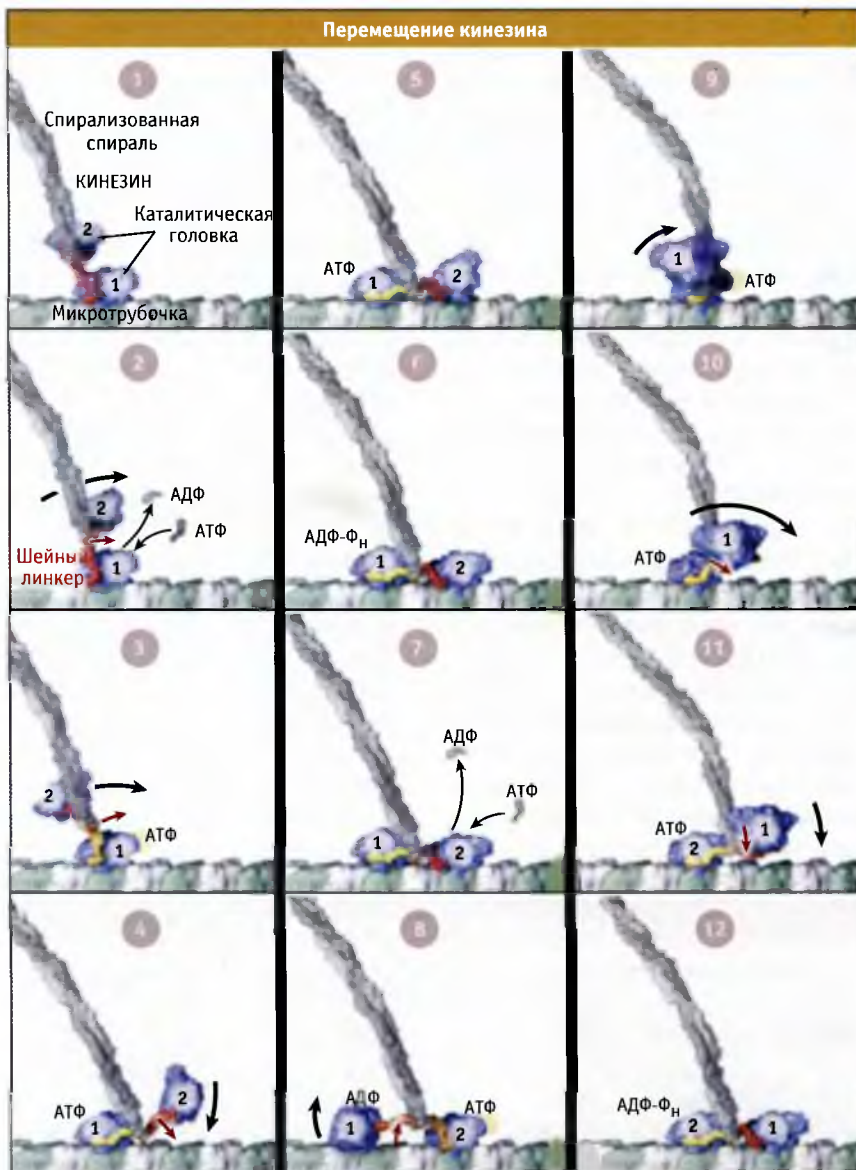


РИС. 7.52. Последовательность процессов, приводящих к перемещению кинезина по микротрубочке. Несколько раз в ответ на изменения в одной головке, в другой также происходят изменения. Заметьте, что по меньшей мере одна из головок кинезина всегда прочно связана с микротрубочкой

бочкой. Кинезин переходит в промежуточное состояние, при котором обе головки оказываются прочно связанными с микротрубочкой. Как только головка 2, которая теперь занимает лидирующее положение, прочно связалась с микротрубочкой, головка 1 высвобождает фосфатную группу, образующуюся при гидролизе АТФ. Этот процесс приводит к отщеплению головки 1 от микротрубочки и вызывает конформационные изменения в головке 2, в результате которых повторно открывается активный сайт. Вся цепь описанных событий возвращает кинезин в исходное состояние лишь с той разницей, что впереди теперь находится головка 2, и молекула кинезина расположена на 8 нм ближе к плюс-концу микротрубочки. Когда головка 2 связывает АТФ, наступает второй цикл, и затем две головки будут меняться ролями в течение сотен или тысяч циклов, делая каждый раз по шагу и продвигая мотор вдоль микротрубочки по направлению к плюс-концу. На РИС. 7.53 представлена серия анимированных изображений молекулы кинезина, которая делает несколько последовательных шагов. Схема иллюстрирует, каким образом координация процессов с участием обеих головок и обмен ролями между ними после каждого шага позволяет мотору двигаться по микротрубочке.

Последовательность процессов, которые происходят при выполнении кинезином каждого шага, напоминают действия канатоходца, шагающего по канату, закрепленному высоко над землей. Вначале кинезин, стоя на одной ноге, сохраняет равновесие и находится в устойчивом положении. Затем он переносит другую ногу вперед (изменение положения шейного линкера) и осторожно нащупывает ею канат (предварительное связывание передней головки). Только когда кинезин убедится в том, что передняя нога надежно ориентирована на канате, он переносит на нее свой вес (укрепление связывания передней головки). Затем кинезин высвобождает вторую ногу и отрывает ее от каната, принимая положение для следующего шага. Если кинезин, так же как и канатоходец, переставит вторую ногу, прочно не укрепив первую, прогулка закончена. Канатоходец оказывается на земле, а белок далеко от микротрубочки. Если бы кинезин часто освобождал вторую ногу, не дожидаясь, пока передняя нога прочно укрепились, то постоянное движение на большие расстояния стало бы невозможным.

Механизм перемещения кинезина предполагает существование строгой скоординированности в работе обеих головок. Каким образом это достигается? Как одна



Кадры видеоанимации, показывающие скоординированное движение двух головок кинезина по микротрубочке. Две головки (обозначены 1 и 2) выделены синим цветом, суперспирализованная область, серым, и область шейного линкера, желтым (при направлении вперед) и красным (при направлении назад). Для простоты показан только один протофиламент микротрубочки. α -, β -субъединицы тубулина выделены белым и зеленым цветами соответственно, и плюс-конец расположен справа. Анимация любезно предоставлена Ронем Миллиганом, Исследовательский институт Скриппса Рональдом Вейлом, Медицинский центр Говарда Хьюза и Грэма Джонсона, fivth.com

головка «узнает», что делает другая? По-видимому, сообщение между головками осуществляется при помощи шейных линкеров. Когда обе головки кинезина прочно связаны с микротрубочкой, шейные линкеры выпрямлены и находятся под механическим напряжением. Очевидно, это позволяет головкам общаться друг с другом и координировать свою деятельность (например, АТФазный цикл). Наличие механического напряжения указывает одной головке, что другая прочно связана с микротрубочкой. Поэтому одна головка может безопасно

отсоединиться от микротрубочки. За счет механического напряжения, вероятно, осуществляется координация деятельности головок, в результате чего устанавливается, насколько быстро проходят различные этапы АТФазного цикла. Например, если бы механическое напряжение вызывало значительное ускорение высвобождения фосфата, то ведомая головка не откреплялась бы от микротрубочки до момента прочного связывания ведущей головки.

Подвижность динезинов также связана с усилением изменений конформации, однако структурные измене-

ния происходят на еще большем расстоянии. Кинезин и динеин продвигаются по микротрубочке 8-м шагами, что эквивалентно длине одного тубулинового гетеродимера. Кинезин «осторожно» продвигается по протофиламенту, ступая с одного гетеродимера на следующий. Для сравнения, динеин, при перемещении к минус-концу микротрубочки, «бредет» как пешеход, случайно наступая между протофиламентами.

Механизм движения кинезинов дает им возможность постоянно продвигаться по микротрубочке (т. е. их движение является высоко «процессивным»). Например, в экспериментах *in vitro* один кинезиновый мотор с присоединенными к нему стеклянными шариками (выполняющими роль удобного карго) и содержащий две головки способен сделать сотни и тысячи шагов вдоль микротрубочки и, не отсоединяясь от нее, переместить шарики на значительное расстояние. Способность одного кинезинового мотора перемещать по микротрубочке карго на большие расстояния связана с тем, что каждая головка мотора примерно половину времени расходует на связывание с микротрубочкой, и активность двух головок скоординирована таким образом, что, по крайней мере, одна из них всегда находится в связанном состоянии. Существование моторов, у которых одна из двух головок всегда связана с микротрубочкой, характерно для индивидуально функционирующих или небольшой

группы моторов, например, транспортирующих везикулы. Работая по такому механизму, они способны транспортировать карго на большие расстояния.

Существуют и такие моторы, у которых одна головка не всегда связана с микротрубочкой, что позволяет им вместе с карго быстро терять контакт с ее поверхностью. Моторы, которые функционируют в больших группах, например присутствующие в жгутиках (см. 7.16 *Реснички и жгутики являются подвижными структурами*), гораздо меньше времени находятся в связанном с микротрубочкой состоянии, чем моторы, переносящие везикулы. Некоторые головки могут находиться в связанном состоянии и генерировать силу в структуре, содержащей динеины (в жгутиках). Моторы, завершившие свою функцию, быстро покидают микротрубочку, чтобы не мешать работать на ней другим активным моторам.

В клетке многие органеллы движутся в двух направлениях: вначале органелла движется в одном направлении вдоль микротрубочки, затем она поворачивается и движется в противоположном направлении. Эти органеллы связываются с динеинами и с представителями группы кинезинов. При этом возникает вопрос, что обеспечивает их продолжительное движение в одном направлении? Для объяснения двустороннего движения органелл предложены две модели, представленные на рис. 7.54. Моторы с противоположно направленной по-

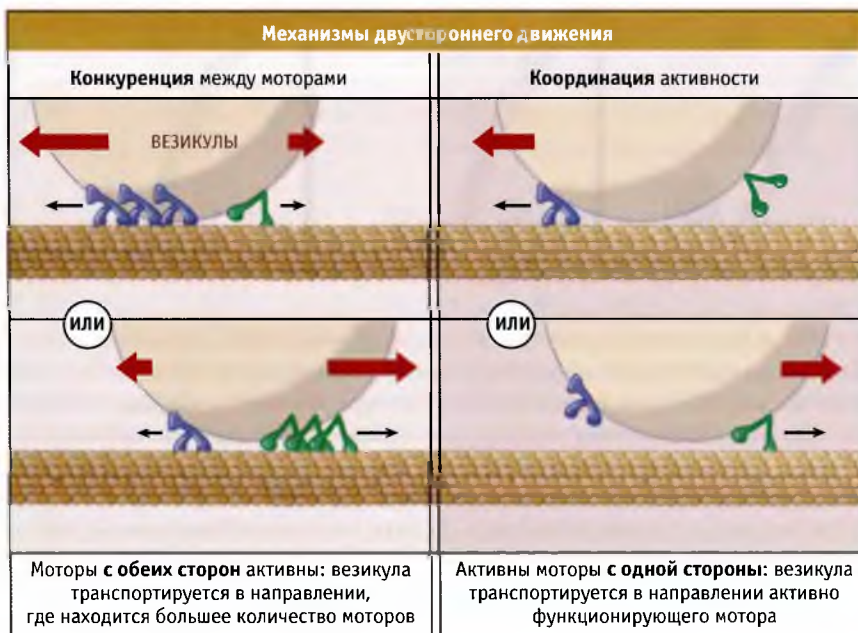


РИС. 7.54 Возможные механизмы двустороннего движения карго по микротрубочке. В каждом случае оба мотора, транспортирующие карго в плюс- и минус-направлениях, связаны с поверхностью везикулы. На левом рисунке активны оба типа моторов, и мотор, способный развивать большее усилие (вероятно из-за того, что присутствует в большем количестве копий), определяет направление движения везикулы. На правом рисунке деятельность моторов скоординирована таким образом, что в каждый момент времени активен мотор, перемещающий карго только в одном направлении. Имеющиеся данные позволяют считать, что клетки используют механизм, представленный на правом рисунке, однако неясно, каким образом скоординирована деятельность моторов

лярностью могут конкурировать между собой. Поскольку всегда активны оба типа моторов, то выигрывает тот, который способен генерировать более сильное усилие (поскольку присутствует в большем количестве). Наоборот, активность моторов может быть скоординирована таким образом, что один их набор выключен, а другой функционирует. Вероятно, в клетке работает второй механизм, однако неясно, каким образом активность моторов скоординирована на поверхности везикулы.

7.13 Каким образом карго связывается с соответствующим мотором

Основные положения

- Мотор связывается со специфическим карго посредством хвостового домена
- В регуляции активности мотора и его связывания с карго принимают участие адаптерные белки, связанные с мотором
- Двухсторонний транспорт органелл обеспечивается координацией функционирования мотора в плюс- и минус-направлениях

Клетке необходимо транспортировать множество разных грузов в различные отделы цитоплазмы. Специфичность достигается за счет соответствия между карго и мотором. Возникает вопрос, каким образом к каждому карго для доставки его в нужную точку присоединяется необходимый мотор. Кинезины, которые продвигаются в направлении плюс-конца, связывают везикулы, выходящие из аппарата Гольджи, и транспортируют их к плазматической мембране или к эндосоме. Моторы, осуществляющие транспорт к минус-концу, захватывают интернализованные везикулы с периферии клетки и доставляют их в центр. Связывание карго с соответствующим мотором происходит за счет

хвостового домена последнего. Для большого кинезинового семейства транспортных белков хвостовые домены различаются и обуславливают разнообразие моторов. По строению моторные домены гораздо более сходны друг с другом и не влияют на специфику карго. В этом смысле головной домен можно сравнить с двигателем, общим для всех транспортных средств, а хвостовой домен со специфическими прицепами, загруженными определенными видами грузов.

Вообще говоря, хвостовой домен мотора непосредственно не связывается с карго. Обычно к мембранному белку с одной стороны и хвосту мотора с другой присоединяется адаптерный белок. Этим обеспечивается связывание мотора с везикулой. Например, везикулы, выходящие из *транс*-сети Гольджи в эндосомы, содержат на своих мембранах рецептор манноза-6 фосфата. Цитоплазматический домен этого рецептора связывает адаптерный комплекс AP-1, и AP-1 присоединяется к хвостовому домену кинезина. AP-1 относится к числу распространенных адаптеров, поскольку он также связывает клатрин в области *транс*-сети Гольджи, в которой отщепляются везикулы. Таким образом, AP-1 связывает процесс образования везикул с загрузкой мотора, что гарантирует надлежащую подготовку вновь образованных везикул для транспортного процесса (подробнее об AP-1 см. 4.14 Адаптерные комплексы связывают клатрин и трансмембранные белки карго).

Связывание цитоплазматического динеина с мембранами также осуществляется с помощью адаптерных белков. К числу наиболее полно охарактеризованных адаптеров относится динактиновый комплекс. Он состоит из семи полипептидов и короткого филамента, состоящего из Arp 1, белка, близкого к актину. Согласно недавно предложенной модели, представленной на рис. 7.13, филамент Arp-1 связывает динеин с мембранными везикулами за счет ассоциации со спектрином на цитоплазматической поверхности мембраны. По харак-

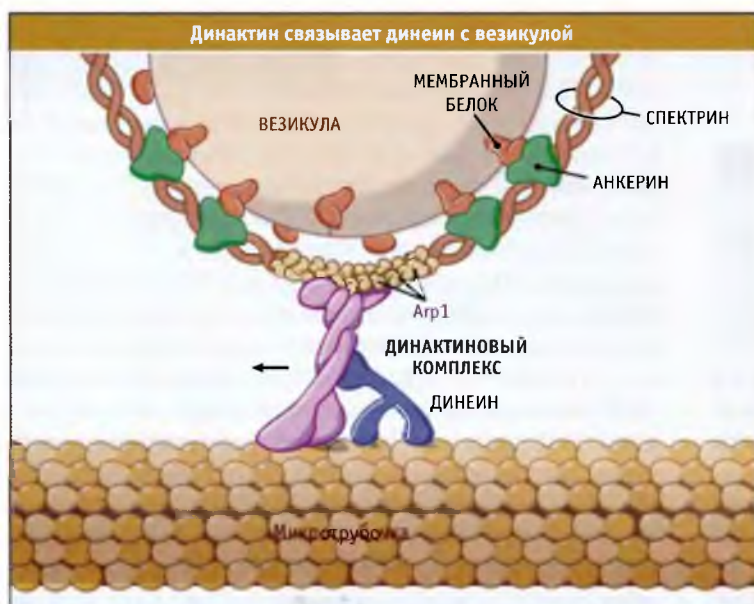


РИС. 7.13. Модель связывания цитоплазматического динеина с мембранными везикулами с участием динактинового комплекса (выделен пурпурным цветом). Считается, что Arp1 филамент динактинового комплекса связан со спектрином мембраны везикулы таким же образом, как актиновые филаменты взаимодействуют со спектрином других мембран. Другие компоненты динактинового комплекса связаны с динеином и микротрубочкой

терту эта ассоциация напоминает взаимодействие между спектрином и филаментами актина в сети, которую они образуют на многих мембранах, и объясняет, почему динактин включает актиноподобные филаменты. Наряду с присоединением динеина к мембране, динактин также помогает динеину оставаться связанным с микротрубочкой, что обеспечивает движение.

Белковые моторы транспортируют не только мембранные везикулы. Возможен транспорт некоторых иРНК и вирусов, хотя последние не принадлежат к числу обычных клеточных карго. Транспорт иРНК позволяет клетке ограничивать синтез некоторых белков специфическими сайтами, и обеспечивать доставку иРНК в отдельные участки крупных клеток. Например, у некоторых нейронов специфические иРНК направляются в аксоны или дендриты, где образуются белки, специфичные для этих высокоспециализированных клеточных доменов. Поскольку аксоны и дендриты обладают большими размерами, транспорт в них иРНК осуществляется с помощью молекулярных моторов. Движение иРНК за счет простой диффузии было бы слишком медленным и неспецифическим способом, не позволяющим клетке создавать и поддерживать существование столь протяженных специализированных структур. Аналогично мембранным везикулам, адаптерные белки используются для связывания иРНК с хвостовыми доменами моторов. Такие вирусы, как ВИЧ, вирус герпеса и аденовирус, попадают в клетку в виде белковых капсидов, внутри которых находится нуклеиновая кислота. Для репликации вирусная частица должна поступить в ядро и воспользоваться репликационной машиной клетки. Вирусы торопятся завершить репликацию, связываясь с динеином, как только они попали в клетку, поскольку это позволяет им транспортироваться от плазматической мембраны прямо в ядро.

7.14 Динамика микротрубочек и моторы совместно создают асимметричную организацию клетки

Основные положения

- Асимметрия клетки создается совместным функционированием динамики микротрубочек и моторов
- При обеспечении двигательной активности клетки и позиционировании веретена деления микротрубочки работают вместе с активным цитоскелетом

Положение внутриклеточных органелл и общая форма клетки в целом часто характеризуются четко выраженной асимметрией. Способность клетки к созданию двух различных участков, отличающихся друг от друга по расположению и ориентировке органелл и специфических участков цитоплазмы, является фундаментальным и крайне важным свойством. Хотя изолированные клетки могут существовать без этой способности, такие

клетки не обладают подвижностью и не могут образовывать специализированные клетки специфической формы, необходимые для создания и существования многоклеточного организма. Например, фибробласты и другие подвижные клетки с одного конца должны расширяться, а с другого — сокращаться, с тем чтобы передвигаться в организме и реагировать на повреждения и инфекции. Концы каждой клетки должны обладать различной активностью и функционировать скоординированным образом.

Асимметричная организация клетки обычно зависит от расположения микротрубочек, их динамики и движения по ним белковых моторов. В организации внутренней архитектуры клетки также участвуют актин и промежуточные филаменты, и все три системы филаментов связаны между собой и контролируют свойства друг друга. В настоящем разделе мы рассмотрим несколько примеров функционирования компонентов цитоскелета микротрубочек, в результате чего возникает клеточная асимметрия. Также будут рассмотрены случаи, иллюстрирующие совместное функционирование микротрубочек и актинового цитоскелета.

В процессе развития, при формировании головного мозга, каждая нервная клетка образует выросты, называемые аксонами, которые контактируют с нейронами-мишенями, образуя синапсы; при этом между нейронами возникает взаимодействие. На конце каждого аксона находится конус роста. Это чрезвычайно подвижная структура, богатая актином и микротрубочками, которая ползет по субстрату вперед (см. рис. 7.9). За счет конуса роста происходит удлинение аксона. Во время движения, в соответствии с получаемыми сигналами, конус роста периодически меняет направление. Прodelав серию поворотов, он обнаруживает мишень. После этого движение прекращается и образуется синапс.

Микротрубочки цитоскелета играют критическую роль в механизме поворотов при перемещении конуса роста. Последний представляет собой крупную уплощенную структуру, способную расплываться по поверхности, по которой происходит движение. В отсутствие внешних сигналов направления движения происходит нуклеация динамичных микротрубочек, расположенных позади конуса роста, причем они растут и сжимаются веерообразным образом. Когда конус роста встречает сигнал, ответная реакция генерируется только на небольшом участке его плазматической мембраны, который контактирует с сигналом. Как показано на рис. 7.56, при этом происходит интересный процесс. Микротрубочки в пределах этого участка начинают расти по направлению к источнику сигнала. Хотя MAP, обуславливающие этот рост, неизвестны, возможно, что локальная активация MAP сигналом способствует пребыванию микротрубочек в фазе роста в течение длительного времени и приводит к их накоплению в сайте, где возникает сигнал. На рис. 7.57 представлены кадры видеоизображения микротрубочек в двух конусах роста через несколько минут после того, как между ними возник контакт. После переориентации и элонгации микротрубочек плюс-направ-



Два конуса роста движутся навстречу друг другу. Области, помеченные синим цветом, очень тонкие и заполнены актином. Микротрубочки выходят из аксона в область, приблизительно в направлении оранжевых линий

На съемке видно движение активных филаментов от края мембраны внутрь клетки. Это движение является частью механизма, за счет которого конус роста продвигается вперед

Края двух конусов роста контактируют на небольшом участке, который помечен желтым цветом. При контакте между двумя клетками в каждой из них запускаются сигнальные пути

...которые вызывают переориентацию микротрубочек по отношению к точке контакта. Конус роста слева начинает быстро переориентироваться

В обоих конусах роста микротрубочки сфокусировались по направлению к точке контакта

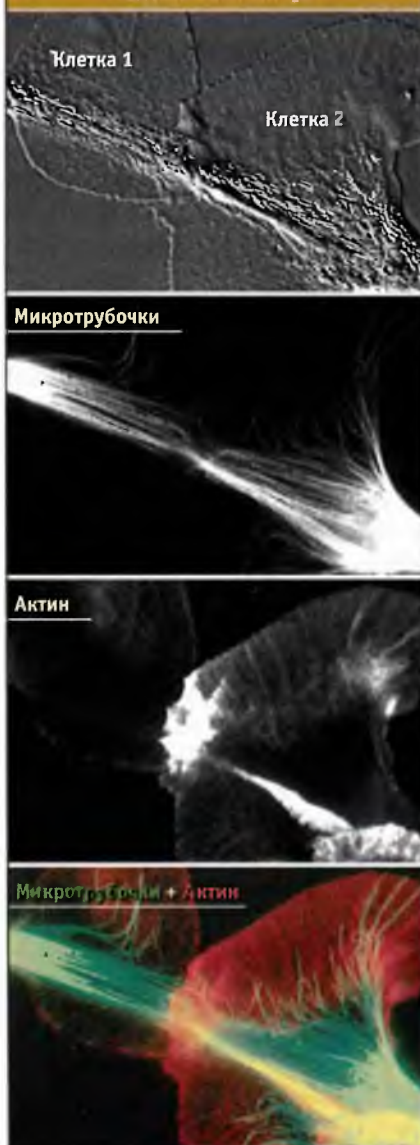
Рис. 7.56. Кадры видеосъемки, которые показывают конусы роста в культуре нейронов. Процессы, происходящие в конусах роста, когда они входят во взаимный контакт, очень близки к таковым *in vivo*, когда конус роста обнаруживает сигнал на другой клетке. Каждый конус быстро направляет микротрубочки в точки контакта. Фотография любезно предоставлена Полом Форшером, Иельский университет. Воспроизводится из *The Journal of Cell Biology*, 1993, vol. 121, pp. 1369–1383. © Rockefeller University Press

ленные кинезины транспортируют по ним везикулы на клеточную периферию. Это приводит к слиянию везикулы с плазматической мембраной и вызывает небольшое локальное расширение клетки. В результате в структуре конуса роста возникает локальная асимметрия. Затем, под действием актинового цитоскелета, мембрана смещается вперед, в направлении хода микротрубочек.

Еще один процесс создания асимметричной организации клетки, в котором участвуют микротрубочки и моторы, представляет собой позиционирование митотического веретена в эпителиальных клетках. При образовании новых клеток, необходимых для роста и восстановления эпителия, необходимо, чтобы делящиеся клетки слоя эпителия образовывали две дочерние клет-

ки одинаковой удлинённой формы и ориентированные таким же образом, как уже существующие (Рис. 7.58). Клетка всегда делится перпендикулярно по отношению к веретену, и поэтому для того, чтобы деление происходило вдоль длинной оси эпителиальной клетки, до деления хромосом веретено должно быть ориентировано соответствующим образом. Однако после своего образования веретено находится в случайной ориентации. Для того, чтобы приобрести правильную ориентацию, веретено вращается с помощью астральных микротрубочек (микротрубочки на полюсах веретена). Эти микротрубочки высокодинамичны и постоянно ищут периферию клетки. Цитоплазматический динеин прикреплен к местам на плазматической мембране наподобие пояса,

Фокусировка цитоскелета под действием стимула



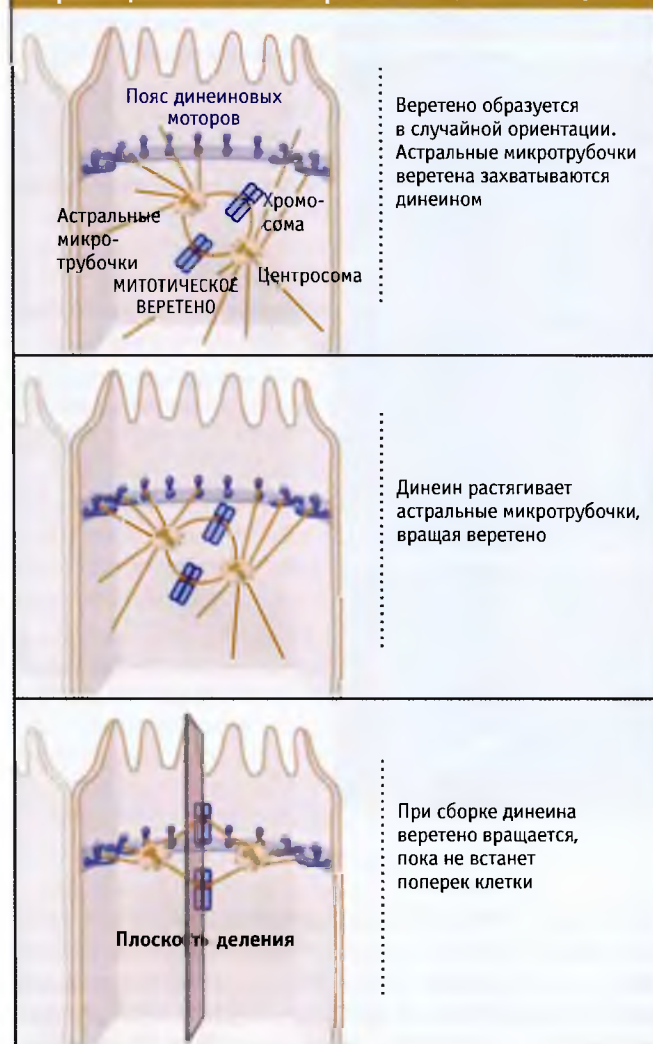
57 Актин и микротрубочки в двух конусах роста через несколько минут контакта. Отметим, что микротрубочки сфокусированы в точке контакта; также там наблюдается массивная центрированная полимеризация актина. Фотографии любезно предоставлены С. Н. Лин, Полом Форшером, Иельский университет. Воспроизведено из *The Journal of Cell Biology*, 1993, v. 121, pp. 1369–1383. © The Rockefeller University Press

который проходит по середине клетки. Астральные микротрубочки, которые на своем пути встречают этот пояс, связываются с комплексом динеин/динактин, который генерирует тянущее усилие, в результате чего направление веретена приобретает правильную ориентацию.

Наиболее наглядным примером, который иллюстрирует, каким образом возникает клеточная асимметрия, служит деление дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Эти дрожжи используются для выпечки хлеба и варки пива.

Рис. 7.59 иллюстрирует, что дрожжи делятся за счет процесса почкования, при котором небольшой участок поверхности клетки («материнской» клетки) образует вырост, напоминающий почку. В ходе клеточного цикла вырост расширяется и в конце концов становится дочерней клеткой. Примерно в то же время, когда начинается процесс почкования, дублируется единственный центр организации микротрубочек в материнской клетке — структура, называемая **полярным тельцем**, которая входит в ядерную мембрану. Образуются два полярных тельца, которые разделяются, и движутся к противо-

Ориентация митотического веретена в эпителиальных клетках



58 Представлена одна из многих клеток, находящихся в слое эпителия, клетки которого расположены слева направо. Расположение динеина в виде кольца вокруг клетки обеспечивает конечную ориентацию веретена, независимо от того, как он был ориентирован при образовании. Эта ориентация обеспечивает деление клетки сверху вниз, создавая две новых клетки в пласте. Динеин локализуется в месте плотного контакта, где примыкающие клетки в слое контактируют друг с другом



На трех верхних рисунках показаны клетки, находящиеся на последовательных стадиях клеточного цикла (слева направо). По мере прохождения цикла отпочковывающиеся участки увеличиваются в размере до тех пор, пока не достигнут размеров материнской клетки. На нижней фотографии представлена клеточная ДНК. На фотографиях в середине и внизу справа показано, что ДНК можно обнаружить, только когда дочерняя клетка достигнет размера материнской. Фотографии любезно предоставлены Роберт Скиббенс, Университет Лихай

положным концам ядра, как показано на рис. 7.60. При делении дрожжей их ядерная оболочка не разрушается, и веретено образуется внутри ядра. В образовании веретена участвуют микротрубочки, нуклеированные двумя полярными тельцами, которые также участвуют в образовании микротрубочек с внешней стороны ядра. Образованное веретено располагается случайным образом, и локализация почки не влияет на его ориентацию.

Все эти процессы происходят в материнской клетке. Для того чтобы обеспечить наследование хромосомного набора обеими клетками, веретено должно быть расположено вдоль оси между материнской клеткой и почкой и ориентировано так, чтобы находиться в пространстве между ними.

Ориентирование и передвижение веретена происходят с участием микротрубочек, которые из одного полярного тельца выходят в цитоплазму. Каким образом это происходит, показано на рис. 7.60. На одном из двух полярных тельц с микротрубочками связывается белок Kar9. От полярного тельца он транспортируется по микротрубочкам в направлении плюс-концов представителем семейства кинезинов (Kip2). Когда Kip2 достигает конца микротрубочки, Kar9 остается там, связываясь с белком +TIP (Bim1). В некоторые моменты времени Kar9 также связывается с высокопроцессивной формой миозина (который относится к семейству миозинов V, способных транспортироваться на большие дистанции вдоль актиновых филаментов). При этом формируется связь между кончиком цитоплазматической микротрубочки и актиновым филаментом. В клетках дрожжей ак-

тиновые филаменты представляют собой многонитчатые тяжи, которые через цитоплазму материнской клетки направляются в отпочковывающуюся область, где все тяжи сходятся в одной точке и соединяются с кортексом этой области. Все актиновые филаменты, составляющие такой пучок, имеют одинаковую полярность, так что он представляет собой полярную структуру, которая указывает направление от материнской клетки к будущей дочерней. Миозин продвигает концы микротрубочек вдоль актинового кабеля, приводя их в отпочковывающуюся область. Попав туда, микротрубочки присоединяются к моторам, закрепленным в слое кортекса, которые движутся к минус-концу (динеиновые и некоторые кинезиновые моторы). Моторы тянут микротрубочки и контролируют состояние их концов при деполимеризации. Таким образом, комбинируя активное протягивание и контролируемую разборку микротрубочек, веретено транспортируется по цитоплазме материнской клетки в будущую дочернюю клетку.

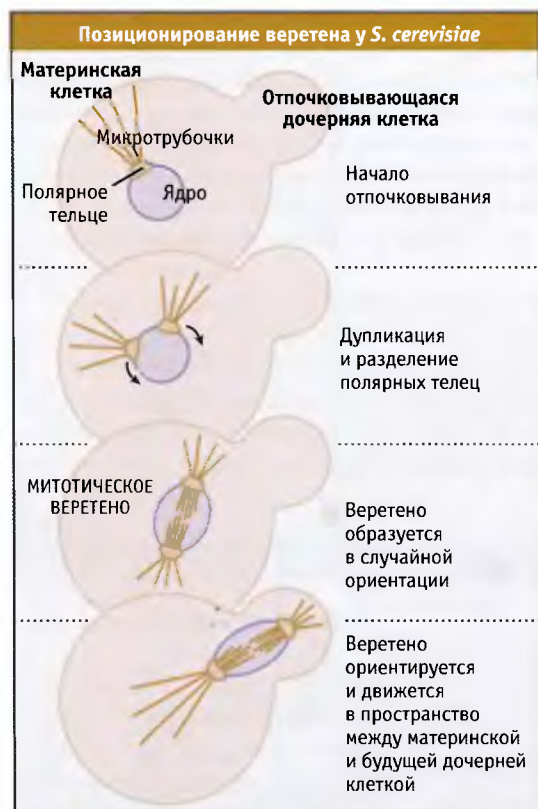


рис. 7.60. При делении клеток почкующихся дрожжей целостность ядер не нарушается. Полярное тело веретена, структура, находящаяся в ядерной оболочке, вызывает нуклеацию микротрубочек в цитоплазме и внутри ядра, где они образуют митотическое веретено. Веретено образуется в материнской клетке и должно позиционироваться в пространстве между материнской и будущей дочерней клетками. Правильное позиционирование веретена требует, чтобы оно сдвигалось по направлению к образующейся дочерней клетке и было ориентировано вдоль оси между дочерней и материнской клеткой

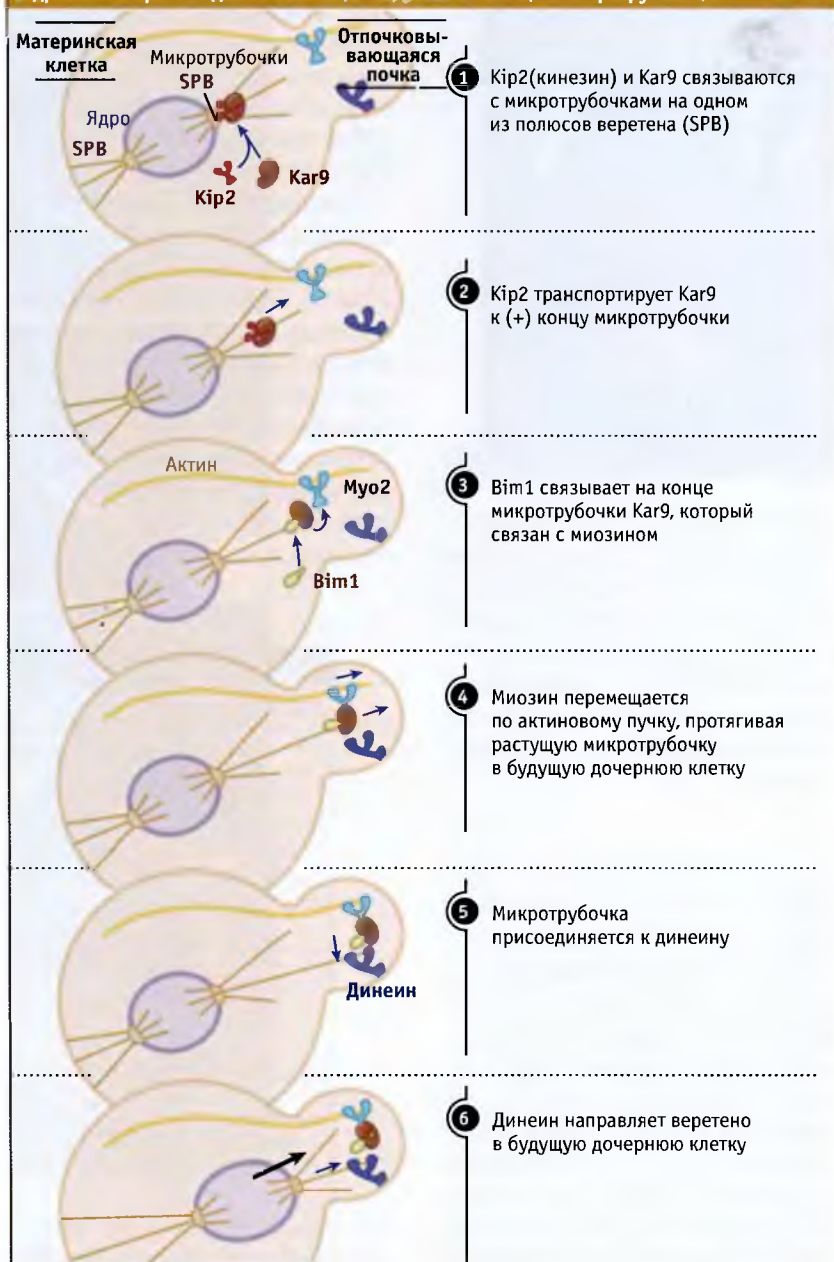


Рис. 7.61 Перемещение митотического веретена в отпочковывающуюся клетку является следствием совместного функционирования актина и микротрубочек цитоскелета. Поляризованные пучки актиновых филаментов направляются из материнской в будущую дочернюю клетку и служат для направления микротрубочек от одного из двух полюсов веретена в нужном направлении. Оказавшись в будущей дочерней клетке, микротрубочки захватываются динеином. Поскольку динеин присоединен к мембране, он тянет веретено в будущую дочернюю клетку. Этот механизм не мог бы реализоваться, если бы белки Kar9, Bim1 связывались с микротрубочками обоих полярных телц

Динамика микротрубочек играет основную роль в ориентировании и позиционировании веретена как в клетках дрожжей, так и эпителия. В обоих случаях существует одна общая черта, состоящая в том, что концы микротрубочек должны найти свое место в слое клеточного кортекса. Однако пути использования для этой цели ди-

намических свойств микротрубочек различаются коренным образом. У дрожжей микротрубочки гораздо более стабильны и не находят мишени по механизму поиска и захвата, который предполагает, чтобы микротрубочки постоянно росли и разбирались. У дрожжей, скорее, цитоплазматические микротрубочки приводят к мишеням.

Динамические свойства начинаются проявляться, когда конец микротрубочки транспортируется молекулой миозина вдоль актинового филамента. По мере продвижения конца микротрубочки к нему должны добавляться субъединицы, однако сам он не должен связываться с разорванными актиновыми филаментами. Это становится возможным благодаря белку Vim1. По-видимому, в клетках эукариот этот белок обеспечивает карго возможность находиться на конце растущей микротрубочки.

Если бы цитоплазматические микротрубочки от обоих полярных телец связывались с актином, то позиционирования веретена в клетках дрожжей, очевидно, не происходило бы. В этом случае веретено оставалось бы в материнской клетке, и ось его располагалась перпендикулярно оси между материнской клеткой и почкой. Такая ситуация предотвращается механизмом дупликации полярных телец. Подобно центриолям, старые и новые полярные тельца различаются после каждого раунда дупликации. Так же как и для centrosom, образующихся вокруг материнской и дочерней центриолей, состав старых и новых полярных телец различается. В дрожжах это используется для того, чтобы обеспечить присутствие белков, которые избирательно инактивируют Kar9 на новом полюсе веретена. В результате этот белок может связываться только с теми микротрубочками, которые выходят из первоначального, старого полюса. Таким образом, только микротрубочки из старого полюса проходят в будущую дочернюю клетку.

7.15 Взаимодействие между микротрубочками и актиновыми филаментами

Основные положения

- При движении и делении клеток микротрубочки и актиновые филаменты функционируют совместно
- Микротрубочки определяют, где и когда актин собирает или генерирует сократительные усилия. Микротрубочки оказывают влияние на актиновый цитоскелет, непосредственно с ним связываясь или посылая сигналы
- Оба компонента цитоскелета могут быть связаны линкерными белками, посредством которых микротрубочки присоединены к актиновым филаментам
- Динамика роста и укорочение микротрубочек могут активировать ряд G-белков; эти активированные G-белки контролируют сборку актина и сокращение клетки

Для выполнения многих динамических функций клетке необходимы совместные усилия различных элементов цитоскелета. Например, при перемещении клетки в поисках питательных веществ или при делении микротрубочки функционируют вместе с актиновыми филаментами (см. 7.14 *Динамика микротрубочек и моторы совместно создают асимметричную организацию клетки*). Промежуточные филаменты также взаимодействуют с этими компонентами цитоскелета, что

необходимо для поддержания целостности структуры клеток и тканей. В настоящем разделе мы рассмотрим несколько аспектов взаимодействия микротрубочек с актином при движении клеток и их делении.

Некоторые данные позволяют предполагать, что в клетке микротрубочки и актиновые филаменты взаимодействуют друг с другом. В течение почти 30 лет исследователям было известно, что деполимеризация микротрубочек при добавлении таких веществ, как колхицин, вызывает сжатие клетки. Сжатие достигается за счет изменений актинового цитоскелета и моторного белка миозина. Это говорит о том, что микротрубочки противостоят сжатию клетки или подавляют этот процесс. Клетки, у которых микротрубочки деполимеризованы, также теряют свою поляризованную форму. Обычно у клеток, распластывающихся по поверхности, наибольшее количество актиновых филаментов располагается спереди, где их полимеризация управляет движением. Когда в этих клетках микротрубочки деполимеризованы, актиновые филаменты более не проявляют преимущественной локализации на ведущем крае клетки. Эти экспериментальные наблюдения позволили предложить общую схему: микротрубочки играют управляющую роль, определяя, где должны собираться и сокращаться актиновые филаменты. Таким образом, актин служит источником силы, а микротрубочки организуют или контролируют точку ее приложения. Функционируя вместе, актин и микротрубочки генерируют усилия для выполнения специфических клеточных функций в нужном месте и в нужное время.

Каким образом актин и микротрубочки взаимодействуют друг с другом на молекулярном уровне? Один из путей заключается в существовании линкера или набора линкеров, которые связывают актиновые филаменты с микротрубочками (рис. 7.62). Роль линкеров выполняют несколько MAP, которые связыва-

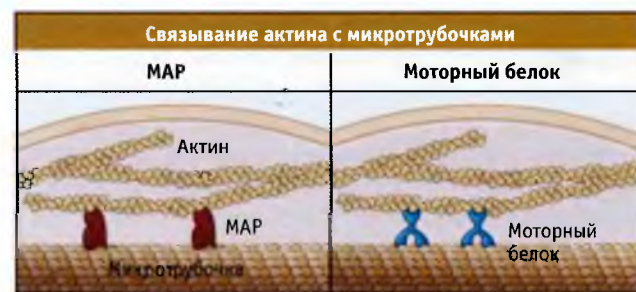


РИС. 7.62. К микротрубочкам и актиновым филаментам присоединяются несколько белков или белковых комплексов, которые связывают их между собой. Слева показан белок, непосредственно связанный с обоими типами филаментов и скрепляющий их между собой. Связь также может осуществляться за счет мотора, как это изображено справа. В этом случае домены мотора связаны с одним из двух типов филаментов, в то время как хвост или другие белки, связанные с хвостом, связываются с другим типом. При таком взаимодействии микротрубочки и актиновые филаменты движутся друг относительно друга

ют актиновые филаменты и микротрубочки, образуя между ними статические связи. Белок MAP2c, из группы MAP белков нейронов, является примером такого линкера, связывающего актин с микротрубочками. В растущих нейронах связывание актина с микротрубочками, вероятно, играет важную роль во время формирования нейроном длинных выростов. Связи между актином и микротрубочками могут также возникать с участием моторных белков. В этом случае они носят динамический характер, что позволяет одному компоненту перемещаться по отношению к другому. Такие связи приводят к прикреплению микротрубочек к клеточному кортексу, как это наблюдается при ориентации веретена в эпителиальных клетках или при его позиционировании у дрожжей (см. 7.14 *Динамика микротрубочек и моторы совместно создают асимметрическую организацию клетки*). В обоих случаях моторы микротрубочек связываются с актином цитоскелета и продвигаются по микротрубочкам с тем, чтобы при делении переместить веретено на нужное место.

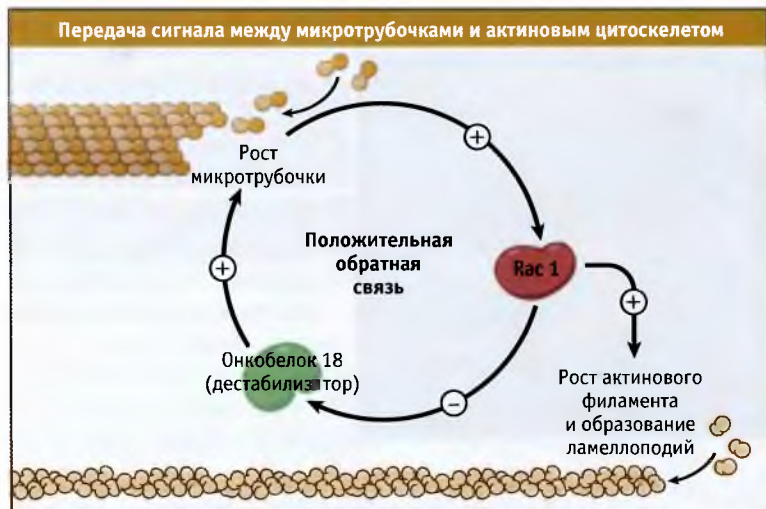
За счет связывания микротрубочек с актиновыми филаментами растущие микротрубочки могут направляться в специфические области клетки. В подвижных клетках динамические микротрубочки растут по направлению к фокальным контактам, т. е. к сайтам адгезии к внеклеточному матриксу (см. 8 *Актин*). Такие динамические микротрубочки направляются к маленьким фокальным контактам с помощью пучков актиновых филаментов, присоединенных к этим местам. Предполагается, что белок + TIR, связанный с концами микротрубочек, может связывать последних с пучками актиновых филаментов, направляя рост микротрубочек к фокальным контактам. Микротрубочки направляются к сайтам адгезии позади клетки и могут доставлять сигнал, вызывающий распад этих сайтов, селективно высвобождая заднюю часть клетки от контакта с субстратом. При этом клетка может сократиться и продвинуть тело вперед. Многократное повторение этих процессов, скоординированное с протрузией клетки спереди, позволяет ей двигаться. Таким образом, специфическое узнавание сайтов адгезии позади клетки и их элиминация представляют собой один из способов, посредством которого микротрубочки способствуют управлению движением клетки.

Актиновые филаменты и микротрубочки могут функционировать вместе и в отсутствие физического контакта. Сейчас известно, что два типа полимера способны обмениваться друг с другом сигналами, регулируемыми место и время их роста. Способность генерировать сигналы и обмениваться ими является очень важной; она позволяет микротрубочкам и актиновым филаментам координировать свою активность и регулировать время и место образования каждого полимера, его распад, или использование для генерации силы. Хотя микротрубочки и актиновые филаменты общаются между собой посредством сигналов, они также контролируются с помощью сигнальных путей, возни-

жающих в ответ на внутриклеточные или поступающие извне стимулы. Наряду с микротрубочками и актиновым компонентом цитоскелета, эти сигнальные системы на своем пути активируют различные сигнальные каскады и затрагивают многие мишени. В наибольшей степени изучены сигнальные каскады, регулирующие сборку и организацию актиновых филаментов. Организация в клетке актиновых филаментов в основном контролируется небольшим количеством белков, которые носят название G-белков. При активации эти белки вызывают образование филоподий (актиновые шипы, расположенные в передней части клетки) и ламеллоподий (тонкие лепестки цитоплазмы, заполненные актиновыми филаментами и также расположенные на ведущем крае клетки). Также G-белки участвуют в образовании сократительных актиновых пучков, например стресс-фибрилл, связанных с фокальными контактами (см. выше), которые позволяют клетке продвигаться по субстрату. Вообще говоря, активированный G-белок стимулирует (часто непрямым образом) белок, связывающийся с актином, который затем регулирует цитоскелет. Интересно, что сборка или разборка микротрубочек может выполнять регуляторную роль по отношению к этим G-белкам, включая или выключая их. Таким образом, динамика микротрубочек регулирует сборку или сокращение актина, не будучи непосредственно связанными с актиновыми филаментами.

Образование сигнальных связей между микротрубочками и актиновыми филаментами играет критическую роль для передвигающихся клеток. Движение клетки требует постоянной полимеризации актина на ведущем крае, что является причиной движения, и сокращения в хвостовой части, облегчающее движение клетки вперед. При полимеризации актина возникают ламеллоподии, и этот процесс происходит под действием одного из G-белков, Rac1. Что вызывает активацию Rac1 на ведущем крае клетки и почему она движется в том же направлении? Сейчас выяснено, что растущие микротрубочки могут активировать Rac1, хотя мы не представляем себе, каким образом они это делают. Активация белка Rac1 микротрубочками играет важную роль, поскольку демонстрирует, что динамическое состояние микротрубочек может активировать сигнальный каскад в определенной части клетки.

Сообщение между микротрубочками и белком Rac1 происходит не только в одном направлении; как показано на рис. 7.63, активированный белок также посылает сигнал микротрубочкам. Этот сигнал позволяет им поддерживать рост. Активированный Rac1 выключает функцию дестабилизирующего микротрубочки белка (онкобелка 18), что еще больше стимулирует рост микротрубочек. Таким образом, сообщение между Rac1 и микротрубочками создает положительную обратную связь, при которой растущие микротрубочки активируют Rac1, и активный белок стимулирует рост микротрубочек. Эта обратная связь поддерживает микротрубочки в состоянии роста в направлении передней части клетки и стимулирует



Динамическое состояние микротрубочек (рост или укорачивание) оказывает прямое влияние на динамику и организацию актиновых филаментов. В качестве промежуточного компонента обычно выступает небольшой G-белок. В изображенном на рисунке примере растущие микротрубочки активируют Rac1, представляющий собой небольшой G-белок, стимулирующий полимеризацию актина со структурой, необходимой для образования ламеллоподий. Активированный Rac1 выключает функцию белка, дестабилизирующего микротрубочки, онкобелка 18, и создает положительную обратную связь, которая помогает поддерживать рост микротрубочек и образование филоподий. Укорачивающиеся микротрубочки активируют еще один небольшой G-белок, который воздействует на другой тип актиновой структуры

там процесс полимеризации актина. По мере того как полимеризация распространяется за пределы этого участка, Rac1 стимулирует рост микротрубочки в новой области. Таким образом, вследствие существования обратной связи между микротрубочками и Rac1 клетка может поддерживать полярность и постоянно двигаться в том же направлении.

При деполимеризации микротрубочек также запускается сигнальный каскад. Деполимеризация активирует еще один G-белок, RhoA. Активный RhoA стимулирует стресс-фибриллы и сборку фокальных контактов и непрямым образом активирует миозин, который представляет собой мотор на основе актина. Эти изменения в актиновом цитоскелете вызывают сокращение клетки. Интересно, что активированный RhoA может также инициировать сигнальный каскад, который стабилизирует микротрубочки и превращает их в нединамическую форму. Ограничивает ли RhoA свою собственную активность, стабилизируя набор микротрубочек, неизвестно.

Предстоит еще многое выяснить относительно обмена сигналами между актином и микротрубочками цитоскелета. Исследуя эти взаимодействия и сигнальные белки, действующие как промежуточные звенья между двумя компонентами цитоскелета, мы больше узнаем о том, каким образом регулируется движение и деление клетки и как можно контролировать эти процессы при патологических состояниях организма.

7.16 Реснички и жгутики являются подвижными структурами

Основные положения

- Реснички и жгутики содержат высокоупорядоченную структуру, называемую аксонемой
- Аксонема состоит из девяти наружных дуплетов микротрубочек, окружающих пару центральных микротрубочек
- Радиальные спицы представляют собой комплекс из нескольких полипептидов, которые связывают каждый наружный дуплет с центром аксонемы
- С каждым внешним дуплетом связываются динеины, домены моторов которых распространяются на примыкающие внешние дуплеты
- Динеин сдвигает внешние дуплеты по отношению друг к другу; структурные связи между другими дуплетами переводят скольжение в наклон аксонемы
- Кинезины участвуют в сборке жгутиков, транспортируя белки аксонемы в отдаленный конец жгутика
- Неподвижные первичные реснички участвуют в сенсорных процессах

Наряду с транспортировкой карго в клетках, микротрубочки также участвуют в перемещении клеток в окружающей среде. Это перемещение осуществляется с помощью ресничек и жгутиков, длинных и тонких выростов, которые отходят как волоски на поверхности многих клеток (рис. 7.16). Каждая такая органелла состоит из длинного пучка микротрубочек, окруженного выростом

РИС. 7.64. Одноклеточная водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* в световом и флуоресцентном микроскопах. В верхней части клетки видны два больших жгутика. Во флуоресцентном микроскопе микротрубочки флуоресцируют красным; показывая, что жгутики состоят из микротрубочек. Клетки *Chlamydomonas* способны передвигаться в воде за счет биений жгутиков. Фотография слева любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай. Фотография справа предоставлена Наоми Моррисет и Сьюзен Датчер, медицинский факультет Вашингтонского университета

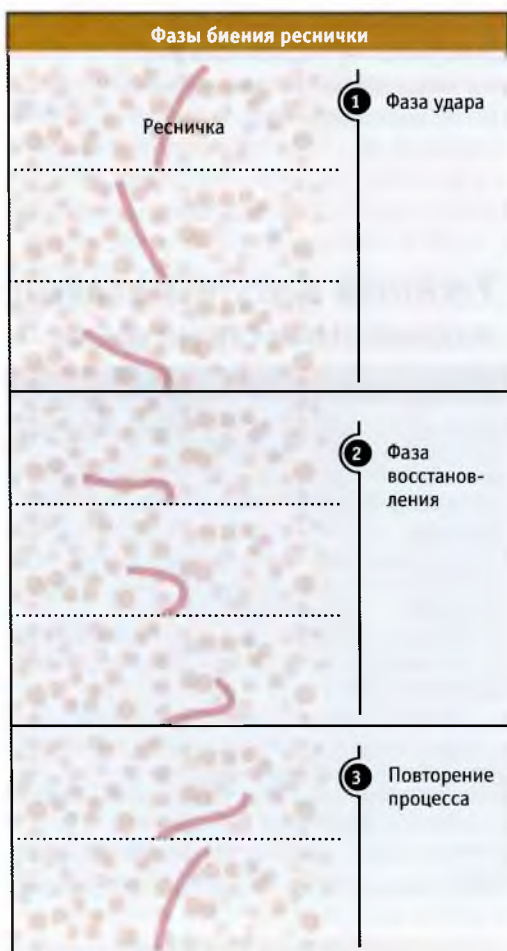


РИС. 7.65. Биение реснички подразделяется на две фазы. В момент удара ресничка полностью выпрямляется и проталкивает жидкость вдоль поверхности клетки. В следующей затем фазе восстановления ресничка сгибается и возвращается в исходное положение для следующего удара

том плазматической мембраны. Взаимодействие между микротрубочками вызывает изгиб структуры, который возможен в разных направлениях. В результате этих движений жидкость может продвигаться вдоль поверхности клеток, как показано на РИС. 7.64. Для группы неподвижных клеток, например эпителиальных, это позволяет жидкой среде и различным объектам перемещаться вдоль поверхности ткани. В случае изолированных, неприкрепленных клеток они сами движутся в жидкости (т. е. плавают). Реснички и жгутики присутствуют у многих одноклеточных организмов, таких как *Paramecium* и *Chlamydomonas* (зеленая водоросль), а также находятся на сперматозоидах у большинства эукариот. У млекопитающих реснички покрывают апикальные участки некоторых эпителиальных клеток и совершают синхронные движения. При этом возникают волны движения ресничек, которые проходят по поверхности ткани. В трахее это движение используется для удаления слизи и дебриса из дыхательных путей; в яйцевом оно обеспечивает транспортировку яйцеклетки из яичника в матку, а в мозгу создает циркуляцию cerebrospinalной жидкости.

Реснички и жгутики обладают одинаковой структурой и механизмом подвижности, однако в некоторых отношениях они различаются. Наиболее существенные различия касаются длины, их количества в клетке и характера движения. Реснички короче (10–15 мкм) и количество их на клетку достигает 100 или больше. Каждая ресничка генерирует усилие за счет наклона у основания (см. рис. 7.65). Внешняя часть реснички остается жесткой и перегиб у основания сдвигает ее в движение, напоминающее гребок весла в воде. После этого наступает восстановительный размах, при котором перегиб реснички распространяется от основания на конец, подготавливая ресничку к следующему циклу движения. На РИС. 7.66 представлено движение реснички. Для того

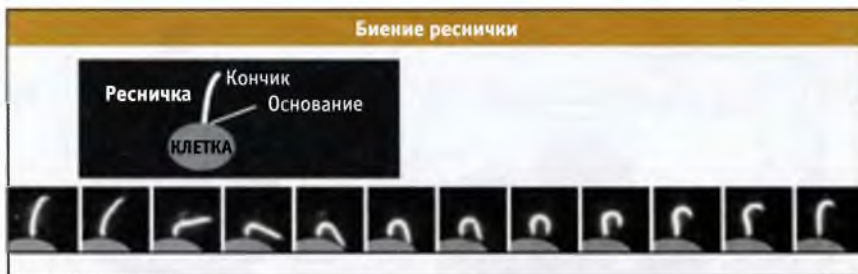


Рис. 7.66. Процесс биения реснички, наблюдаемый под микроскопом. Отмечается резкий перегиб реснички у основания, происходящий в фазе удара и ее постепенное разгибание при восстановлении. Кадры видеоизображения любезно предоставлены Д. Р. Митчеллом, Медицинский центр SUNY Upstate

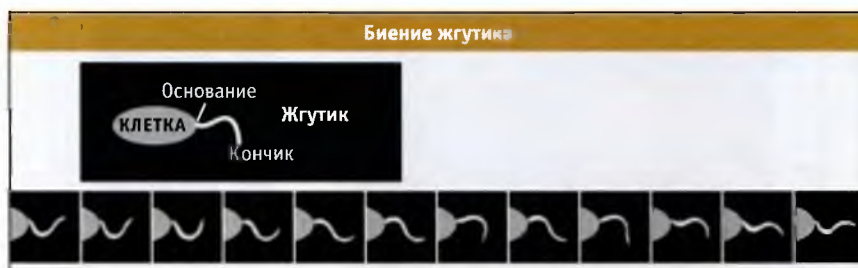


Рис. 7.67. Процесс биения жгутика под микроскопом. Кадры видеоизображения любезно предоставлены Д. Р. Митчеллом, Медицинский центр SUNY Upstate

чтобы проследить за отдельными стадиями движения, для регистрации использовали замедленную видеосъемку. Движения реснички столь интенсивны (много наклонов в секунду), что при съемке в обычном режиме она выглядит нечетко.

Жгутики обычно длиннее (10–200 мкм), чем реснички, и обычно клетка содержит только один или два жгутика. Они также генерируют силу при изгибе; при этом, как показано на Рис. 7.67, от основания к вершине жгутика распространяется S-образная волна. Для ресничек и жгутиков характерен общий механизм движения, в основе которого лежит изгибание структуры. Различные пути распространения изгиба вдоль органеллы обуславливают различные формы волн, генерируемых ресничками и жгутиками. Поскольку два типа органелл представляют собой вариации на одну и ту же тему, мы рассмотрим их общие свойства и будем пользоваться термином *жгутик* для описания структуры и подвижности обеих органелл, если специально не оговаривается, что речь идет о ресничках.

При отделении от клетки жгутики продолжают бие. Это говорит о том, что оно обеспечивается самой органеллой. После удаления плазматической мембраны изолированные жгутики также продолжают биться при условии, что у них сохранился запас АТФ. Эти данные свидетельствуют о том, что движения обеспечиваются белковым содержимым жгутика и энергией гидролиза АТФ.

Внутренний белковый компонент жгутика представляет собой упорядоченную структуру, состоящую по край-

ней мере из 250 различных полипептидов. Эта структура называется **аксонемой**. Структура аксонемы жгутиков одинакова для столь различных организмов, как одноклеточное простейшее *Chlamydomonas* и человек.

Строение аксонемы представлено на Рис. 7.68. Наиболее примечательным элементом структуры, особенно заметным на поперечном срезе, являются определенным образом организованные дуплеты микротрубочки, расположенные вдоль всей аксонемы. Девять необычных «двойных микротрубочек» расположены по кругу. Каждая пара состоит из одной обычной микротрубочки, содержащей 13 протофиламентов (т. н. А трубочка) и одной неполной микротрубочки (В трубочка). Эта микротрубочка состоит из 10–11 протофиламентов и связана со стенкой А трубочки (см. рис. 7.68). В центре кольца, образованного дуплетами микротрубочек, находятся две обычных микротрубочки, содержащие 13 протофиламентов («центральная пара»). Такое расположение микротрубочек в аксонеме сокращенно описывается как «9+2». Все микротрубочки обладают одинаковой полярностью, их плюс-концы направлены к кончику жгутика, а минус-концы — к его основанию. С микротрубочками связываются различные белки, оказывающие на них стабилизирующее действие.

В аксонеме микротрубочки связаны между собой множеством различного типа связей (см. рис. 7.68). Белки, которые формируют эти связи, необходимы для организации микротрубочек в единую согласованную систему, способную двигаться и координировать эти дви-

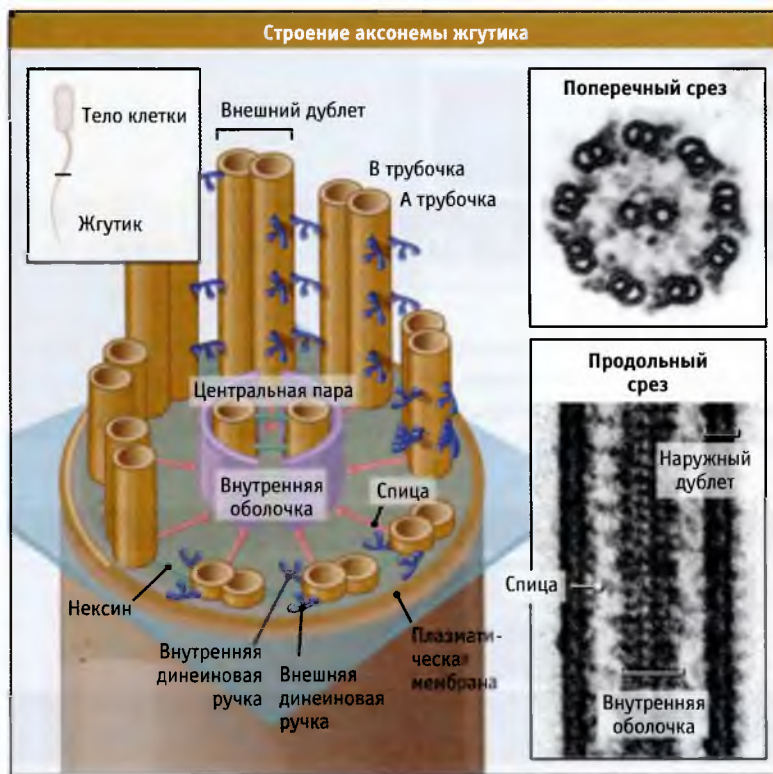


РИС. 7.68. Строение аксонемы. Показано упорядоченное расположение микротрубочек. Микротрубочки соединены между собой различными связями, согласованное действие которых обеспечивает биение реснички. Справа представлены электронные микрофотографии. На поперечном срезе видны внутренние и внешние динеиновые ручки, связывающие внешние дублеты микротрубочек. Также видна одна из спиц с головкой (внизу слева). Фотография любезно предоставлена Джералдом Раппом, медицинский факультет Университета Южного Иллинойса

жения для придания им волнового характера. Соседние дуплеты микротрубочек соединены между собой по периферии аксонемы белком, называемым нексином. Дуплеты микротрубочек также связаны с микротрубочками, расположенными в центре, с помощью полипептидных комплексов, которые образуют как бы спицы с видимыми головками. Эти структуры имеют сложное строение: спицы и их головки содержат 17 различных полипептидов. Головки расположены вокруг внутренней оболочки, структуры, окружающей две центральные микротрубочки. Усилие в аксонеме генерируется с помощью аксонемных динеинов (их также называют «ресничатыми» или «жгутиковыми» динеинами). Эти белки связывают между собой соседние дуплеты микротрубочек; хвостовой домен связывается с А трубочкой в одного дуплета, а головной домен с В трубочкой следующего дуплета. Различные связи, образованные нексином, спицами и динеинами, расположены через правильные промежутки по всей длине аксонемы, однако они характеризуются разной периодичностью. Поэтому все три компонента трудно наблюдать в электронном микроскопе на препаратах, представляющих собой поперечные срезы аксонем. Однако, когда удастся видеть все три структурных элемента, они напоминают колесо с массивными спицами и втулкой.

Структура и расположение динеинов в остальной части аксонемы представляются сложными. В аксонеме содержится более одной формы динеина, каждая из них достаточно велика и состоит из большого числа различных полипептидов по сравнению с динеином, содержащимся в цитоплазме. Различные формы содержат один, два или три моторных домена, и расположены в разных местах аксонемы. Смежные дуплеты микротрубочек связаны двумя наборами молекул динеина, которые называются внутренними и внешними ручками (см. рис. 7.68). Внешние ручки содержат только динеины с двумя или тремя головками, а белки с одной или двумя головками находятся во внутренних ручках.

Каким образом все эти связи обеспечивают подвижность жгутиков и задают соответствующий характер биения? Основной вопрос заключается в том, как функционируют динеины в этой структуре, поскольку они представляют собой моторы и с них должно начинаться движение. Для того чтобы выяснить роль динеина в обеспечении подвижности, необходимо отделить жгутики от клеток и удалить мембрану аксонемы. После этого аксонемы подвергают кратковременной обработке протеазой для того, чтобы разрушить нексиновые связи между внешними дуплетами микротрубочек. Если затем к препарату аксонем добавить АТФ, то микротрубочки

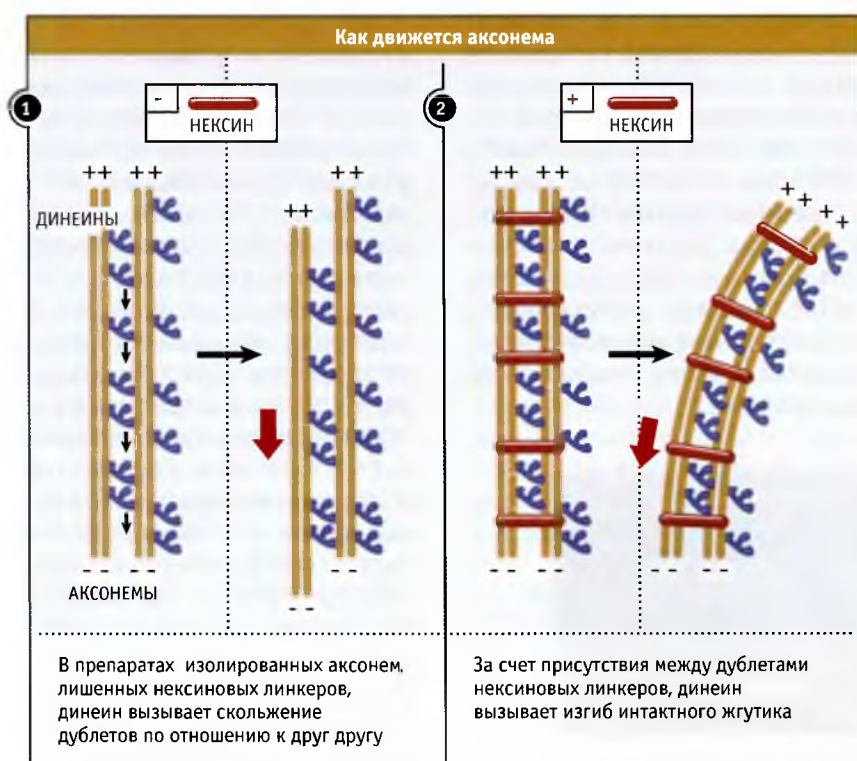


Рис. 7.69 На кадрах анимации представлены два внешних дуплета (выделены золотистым цветом), соединенные динеином. Первая часть анимации показывает, что происходит, когда из жгутиков выделяют дуплеты и селективно удаляют нексिनные линкеры. Вторая часть показывает, что происходит в intactном жгутике. Под действием динеина и в присутствии нексिनных линкеров между дуплетами происходит перегиб жгутика

сдвигаются по отношению к друг другу (рис. 7.69). Этот эффект вызывается динеинами, хвосты которых связаны с дублетом микротрубочек, генерирующих усилие в направлении от плюс- к минус-концу соседней пары. В intactной аксонеме динеин не может сдвигать внешние дуплеты, поскольку они связаны между собой с помощью нексина. Поэтому усилие, генерируемое динеином, приводит к сгибанию жгутика.

Реснички и жгутики генерируют биение за счет распространения сгибающегося движения по аксонеме. Сгибание начинается в основании реснички или жгутика и распространяется по направлению к дистальному концу. Сгибание происходит потому, что динеин активен только в пределах небольшого участка аксонемы. Для того чтобы обеспечить сгибание, динеины активируются последовательно как вдоль длины, так и по периферии аксонемы. Активность динеинов контролируется центральными микротрубочками и спицами; жгутики мутантных клеток, у которых эти структуры отсутствуют, не способны совершать биение. У некоторых организмов центральные микротрубочки быстро вращаются, и в это время они могут передавать сигналы на спицы, которые, в свою очередь, активируют динеин. В центральных микротрубочках и в спицах находится несколько киназ и фосфатаз. Предполагается, что при

вращении центральных трубочек запускается локальная система передачи сигнала, которая активирует динеины. Посредством быстрой локальной активации и инактивации специфических изоформ динеина аксонемы генерируют движения и регулируют силу и частоту биений.

В основании жгутика находится структура, которая называется **базальным тельцем**. Эти структуры обладают таким же строением, как и центриоли (см. 7.7). Для инициации сборки клетки используют центры организации микротрубочек). Каждое базальное тело представляет собой цилиндр, состоящий из 9 триплетов микротрубочек, каждая из которых состоит или из 13 (трубочка А) или из 11 протофиламентов (трубочки В и С). Трубочки А и В служат матрицами при сборке 9 наружных дуплетов микротрубочек аксонемы. Базальное тело остается связанным с основанием аксонемы и служит для прикрепления последней к телу клетки.

Как происходит сборка жгутика, можно выяснить, удалив его с поверхности клетки и проследив образование нового. Жгутик регенерирует менее чем за час и в ходе этого процесса функционирует (т. е. осуществляет биения). Рост нового жгутика происходит на плюс-концах микротрубочек аксонемы, расположенных в дистальных участках каждого жгутика. Сборка жгутика предполагает, что необходимые компоненты аксонемы

должны транспортироваться на концы структур и по мере роста собираться в аксономы. Транспорт осуществляется в больших белковых комплексах, которые движутся в направлении кончика жгутика по наружной поверхности аксономы, расположенной непосредственно под плазматической мембраной. Это движение называется **интрафлагеллярным транспортом (IFT)** и осуществляется с участием кинезина. Белковые комплексы также могут двигаться от вершины жгутика к его основанию (к минус-концам микротрубочек), однако функциональное значение этого направления транспорта неизвестно. IFT по направлению к телу клетки происходит за счет цитоплазматического динеина.



РИС. 7.70. Очень длинная первичная ресничка, отрастающая от клеточной поверхности. Внизу представлены клетки в поперечном сечении; мембраны показаны пунктиром. Вздутие на ресничке может представлять собой карго, которое транспортируется между аксонемой и окружающей мембраной. Фотография любезно предоставлена Сэмом Баусером, Центр Уодсворда

Хотя большинство ресничек представляют собой подвижные образования, существуют формы этих структур, которые не обладают подвижностью и играют в клетках особую роль. Первичные реснички представляют собой неподвижные органеллы, обнаруженные практически во всех клетках позвоночных, исключая клетки крови. В отличие от подвижных ресничек, у клеток обычно находится только одна неподвижная ресничка. На РИС. 7.70 представлен наиболее типичный пример. Аксонома первичной реснички не содержит центральных микротрубочек, и поэтому ее структура часто обозначается как «9+0». Снаружи большинство первичных ресничек выглядят как обычные реснички. Они начинаются на поверхности клеток и имеют вид простого короткого волоска. Однако, у некоторых высокодифференцированных типов клеток дистальный участок первичной реснички сильно вытянут и превратился в специальный домен, размеры которого сравнимы с размерами самой клетки. Это, например, имеет место в клетках палочек и колбочек, которые содержат фоторецепторы, участвующие в восприятии света сетчаткой глаза. В палочках кончики ресничек вытянуты и образуют большой домен, называемый наружным сегментом, который содержит стопки мембранных дисков, заполненные белковым фоторецептором, родопсином. На РИС. 7.71 представлен соответствующий пример. Основание первичной реснички соединяет наружный сегмент с остальной частью клетки, аксонома лишь немного вдается в область, где начинается наружный сегмент.

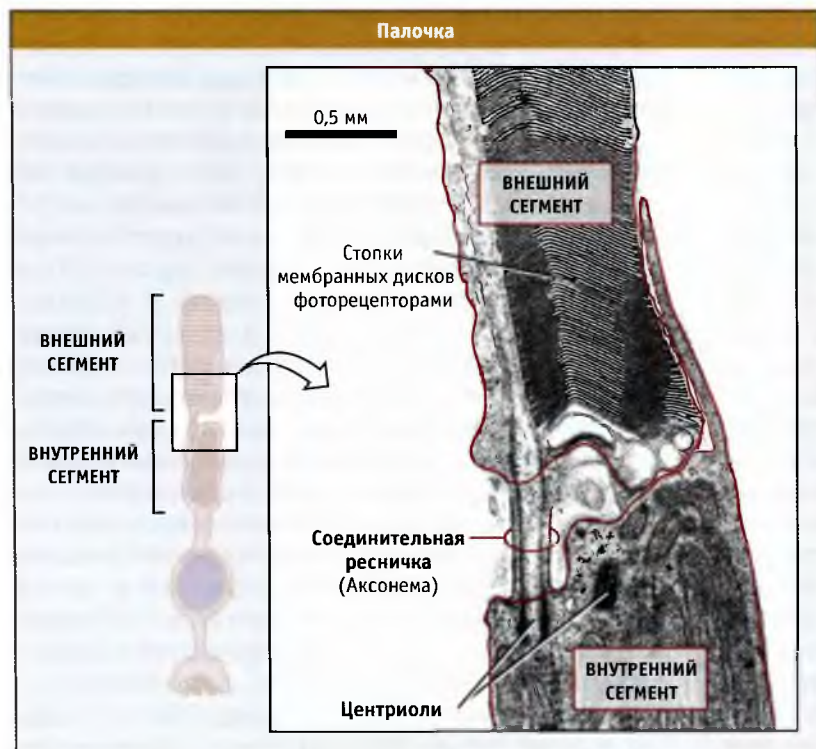


РИС. 7.71. Слева изображена зрительная палочка. Показаны внутренний и внешний сегменты и тонкая перемычка между ними. Справа представлена микрофотография области между двумя сегментами (выделенная на рисунке), сделанная в электронном микроскопе. На небольшом расстоянии, вблизи от места, где она выходит из внутреннего сегмента, перемычка выглядит как нормальная ресничка. Однако ее кончик погружен во внешний сегмент. Фотография воспроизведена из *Histology of the Human Eye*, Hogan, M.J., Alvarado, J.A., and Weddell, J.E. p. 425. © Elsevier

За счет транспорта IFT типа, мембранные везикулы, содержащие родопсин, перемещаются из тела клетки в наружный сегмент, и вероятно, это необходимо для его образования и функционирования.

Использование наружного сегмента палочки в качестве светового сенсора может иллюстрировать широкое распространение такой возможности среди первичных ресничек. Возможно, что подобная функция первичных ресничек только начинает исследоваться. В других типах клеток содержатся более примитивные первичные реснички, в которых могут быть локализованы различные типы рецепторов. Локализация рецепторов в первичных ресничках может превратить их в некое подобие антенн, которые могут улавливать изменения в окружении и передавать эту информацию в клетку.

Некоторые редкие болезни человека связаны с мутациями, в результате которых реснички и жгутики утрачивают подвижность. Больные, которым эти мутации передаются по наследству, обычно страдают хроническими респираторными инфекциями, поскольку неподвижные жгутики не способны выводить из дыхательных путей слизь, а также захваченные патогенные микроорганизмы и раздражители. Больные мужчины часто оказываются бесплодными, так как сперматозоиды у них лишены подвижности. К числу широко известных заболеваний, связанных с неподвижностью ресничек и жгутиков, относится синдром Картагенера. Наряду с респираторными инфекциями и бесплодием, у половины больных отмечается извращенное расположение внутренних органов, при котором изменяется нормальная левосторонняя их асимметрия. Предполагается, что на одном из этапов раннего развития, до момента закладки внутренних органов, в результате биения жгутиков, в эмбрионе создается циркуляция жидкой среды, и возникает градиент секретирующихся веществ, способствующих морфогенезу, что определяет левостороннюю асимметрию. В отсутствие морфогенного градиента органы занимают случайное положение слева и справа. У мышей с мутациями по флагеллярным динеинам или моторам ответственным за IFT, также отмечается извращенное расположение внутренних органов. Это говорит о том, что мутации, влияющие на подвижность жгутиков или на их образование, могут приводить к порокам развития.

7.17 Что дальше?

Динамическая нестабильность микротрубочек при их сборке и разборке была впервые описана в 1984 г., т. е. в том же году, когда был обнаружен первый кинезин. Два этих открытия совершили переворот в нашем понимании процессов сборки цитоскелета и генерации движения белковыми моторами. Быстрый рост наших знаний в этом направлении продолжается, и несколько последних открытий позволили расширить наши

знания о том, как функционируют микротрубочки в различных организмах и в реализации различных клеточных функций.

В результате экспериментальных исследований, выполненных за последние десять лет, было идентифицировано большое количество белков, связанных с микротрубочками, регулирующими их сборку, а также участвующих в генерации усилий и в связывании микротрубочек с другими компонентами клетки. Несмотря на то что уже известно очень много белков, способных взаимодействовать с микротрубочками, их реальное количество может быть еще больше. Недавно для идентификации всех белков центросом и кинетохора клеток дрожжей были использованы методы протеомики. Многие из обнаруженных белков способны взаимодействовать с микротрубочками цитоскелета. Следующий логический шаг заключается в установлении их функций. Когда мы установим, каким образом индивидуальные белки взаимодействуют с микротрубочками, будет чрезвычайно важно выяснить, каким образом эти белки участвуют в «совместной работе» по обеспечению различных клеточных функций. В особенности знание взаимоотношений между MAP и моторами поможет понять, каким образом клетка делит хромосомы при митозе, доставляет везикулы в места назначения или изменяет свою форму.

Многие MAP и, вероятно, некоторые моторы, по-видимому, функционируют только в пределах специфических компартментах. Проявляют ли они активность в определенном месте только потому, что они там локализованы? Если так, то каким образом они туда попадают? Или же MAP и моторы отрегулированы таким образом, что включаются и выключаются в определенных частях клетки? Где находится сигнал к включению и выключению и где устанавливается граница, которая удерживает внутренний сигнал в пределах небольшого определенного участка клетки?

Белки цитоскелета были идентифицированы в клетках эукариот, и считалось что они уникальны для этих клеток. Сейчас мы знаем, что у прокариот также есть свои полимерные компоненты цитоскелета: FtsZ (гомолог тубулина) и MreB (гомолог актина). Субъединицы FtsZ напоминают мономеры тубулина: α - или β -тубулин. Эти мономеры собраны в филаменты, которые похожи на протофиламенты микротрубочек, они даже способны связывать и гидролизовать ГТФ, а также постоянно собираются и разбираются в клетках бактерий. Полимеры FtsZ связаны с бактериальной мембраной, за счет сжатия которой в центре делящейся клетки, они помогают сформировать дочернюю клетку. Пока остается открытым вопрос, каким образом функционирует FtsZ (и как делится бактерия). Сравнительные исследования FtsZ и тубулинов позволяют понять, каким образом функционирует каждый белок и что вызывает полимеризацию тубулина в микротрубочку, а FtsZ в филамент, напоминающий протофиламент. Подобные сравнительные исследования также могут помочь понять, когда впервые в клетке-

предшественнике возник цитоскелет и таким образом он сформировался в клетках про- и эукариот.

Еще один недостаточно исследованный вопрос заключается в том, каким образом физические усилия влияют на динамику сборки микротрубочек. Физические усилия могут возникать при продвижении моторов по микротрубочкам или при наличии препятствий на пути полимеризации, таких как, например, плазматическая мембрана. Когда микротрубочка достигает плазматической мембраны, она часто изгибается и принимает ее контуры. Иногда микротрубочка не изгибается, а сжимается, и даже может разорваться. Мембраны и другие физические препятствия также могут ингибировать процесс добавления субъединиц тубулина, блокируя сборку и приводя к катастрофе. Что же определяет поведение микротрубочки, когда она встречает физический барьер, например плазматическую мембрану? Микротрубочка может изогнуться, сжаться, разорваться или начать укорачиваться. Меняется ли динамика микротрубочки, когда по ней перемещается мотор? Каким образом совместно действуют MAP и физические усилия, регулируя сборку и организацию микротрубочек?

Многое еще остается выяснить в отношении совместного функционирования в клетке микротрубочек и актина. Взаимодействие между этими двумя компонентами цитоскелета играет важную роль в подвижности клеток и их поляризации. Микротрубочки и актин способны взаимодействовать, связываясь между собой с помощью дополнительных белков. Они также взаимодействуют непрямым образом, посылая сигналы при активации киназ или посредством других сигнальных молекул, а, возможно, также за счет физических усилий. Непрямое взаимодействие между актиновыми филаментами и микротрубочками может генерировать положительную обратную связь, при которой полимеризация одного филамента служит сигналом для полимеризации другого. В настоящий момент исследуется, каким образом генерируется этот механизм и как он функционирует в таких процессах, как направленное перемещение клеток.

В настоящее время мы выясняем, какие мутации в генах, кодирующих белки моторов, связанных с микротрубочками и MAP, отвечают за нарушения нейроморфогенеза и контроля клеточного роста. Например, мутация в одном из белков семейства динактинового комплекса связана с редким семейным дефектом двигательных нейронов. Одним из важнейших остается вопрос механизма нарушения процессов внутриклеточного транспорта и организации цитоскелета под влиянием мутантных форм MAP и моторов. В ближайшие годы, вероятно, будет идентифицировано много болезней человека, связанных с мутациями в белках микротрубочного цитоскелета. Это во многом будет способствовать нашему пониманию того, как изменения в этих компонентах цитоскелета влияют на физиологию клеток и общее состояние здоровья.

Наряду с ролью, которую играют микротрубочки в патогенезе болезней, эти элементы цитоскелета могут

представлять собой мишени для новых лекарственных препаратов. В поисках низкомолекулярных соединений, способных вмешиваться в митоз, был обнаружен монастрол, соединение, блокирующее двигательную активность специфического кинезина, функции которого ограничиваются митотическим веретеном. Такие вещества, блокирующие митоз, могут оказаться полезными в лечении рака. Монастрол и близкие к нему соединения, связывающие белки, отличные от тубулина, могут обладать меньшей токсичностью и проявлять меньше побочных эффектов по сравнению с веществами, которые связываются с тубулином, и используются в настоящее время (см. 7.1 Введение). Разрабатываются также другие препараты, которые могут связываться с тубулинами только из ограниченного числа организмов. Хотя для тубулинов эукариот характерна достаточно консервативная структура, оказалось возможным выделить небольшие молекулы, обладающие специфическим сродством к тубулинам грибов или патогенных паразитов, например таких, как переносчики малярии.

7.18 Резюме

Микротрубочки представляют собой динамичные поляризованные полимеры, участвующие в клеточной организации, а также обеспечивающие их подвижность и полярность. Центросомы — центры организации микротрубочек в клетках животных — нуклеируют микротрубочки и закореваяют их минус-концы. Таким образом, положение центросомы определяет характер конструкции, которая создается в клетке с участием микротрубочек. Обычно плюс-концы микротрубочек локализованы ближе к плазматической мембране, а минус-концы — ближе к клеточному центру. Быстро протекающие процессы сборки и разборки микротрубочек за счет динамической нестабильности позволяют им адаптироваться к новым требованиям и быстро перестраиваться с образованием новой конструкции.

Основная функция микротрубочек состоит в том, что они служат поляризованными транспортными путями для молекулярных моторов, кинезина и динеина. Эти моторы присоединяются к карго, которое может включать мембранные везикулы, органеллы и хромосомы, и транспортируют его в направлении плюс- или минус-концов микротрубочек. Необходимая транспортная информация для перемещения в клетке карго в нужном направлении обеспечивается за счет полярности микротрубочек.

В специализированных клетках микротрубочки используются в качестве основных структурных белков ресничек и жгутиков. Основу аксонемы образуют девять дуплетов и две центральные микротрубочки. Дуплеты и центральные микротрубочки связываются между собой

с помощью дополнительных белков. Аксонемные динеины обеспечивают подвижность ресничек и жгутиков за счет скольжения внешних дуплетов микротрубочек по отношению друг к другу. При скольжении сшитой конструкции аксонемы возникают усилия, вызывающие ее изгиб. Быстрое включение и выключение динеинов аксонемы позволяют изгибу распространяться к вершине реснички или жгутика.

7.19 Приложение: Что бы происходило, если бы тубулин не гидролизует ГТФ?

Основные положения

- Если бы микротрубочки были равновесными полимерами, они бы деполимеризовались крайне медленно и не могли бы легко перестраиваться
- При сборке тубулиновые димеры гидролизуют ГТФ; это делает микротрубочки неравновесным полимером, способным к быстрой деполимеризации

Микротрубочки не являются равновесными полимерами, поскольку после полимеризации тубулиновые субъединицы гидролизуют ГТФ. Для сборки микротрубочек гидролиз ГТФ не требуется; наоборот, он облегчает их разборку.

Представим себе, насколько было бы трудно для клетки разобрать микротрубочки, если бы они представляли собой равновесные полимеры. В этом случае присоединение и диссоциация субъединиц на концах микротрубочек представляли бы собой простой равновесный процесс. Напомним, что скорость полимеризации микротрубочки описывает уравнение 7.1:

$$dP/dt = k_{on} [\text{tubulin}] - k_{off}$$

В равновесии скорость образования полимера равняется нулю, и как следует из уравнения 7.2:

$$[\text{tubulin}] = C_c = k_{off}/k_{on}$$

Микротрубочка может расти или терять субъединицы (т. е. удлиняться или укорачиваться) лишь в том случае, если меняется концентрация свободных субъединиц. Особенно показательно рассмотреть, что необходимо для деполимеризации микротрубочек, так как это как раз нужно для внутриклеточной перестройки. Максимальная скорость разборки наблюдалась бы при снижении до нуля концентрации тубулиновых субъединиц (см. уравнение 7.1 выше). Можно рассчитать, сколько времени заняла бы деполимеризация микротрубочки, считая, что отщепляется 15 димеров в с (имеется в виду отщепление ГТФ-тубулина), а 1624 димера тубулина составляют один микрон длины мик-

ротрубочки. С учетом этих величин, для деполимеризации микротрубочки длиной 100 мкм (как в интерфазной клетке) необходимо было бы три часа. Однако при подготовке к митозу клетки полностью деполимеризуют интерфазные микротрубочки в течение нескольких минут. Если бы отщепление происходило быстрее, то и разборка проходила бы быстро, но вместе с тем было бы труднее сразу получить готовые микротрубочки, поскольку более высокая скорость отщепления требует и более высокой критической концентрации субъединиц (см. уравнение 7.2 выше). Для того чтобы гипотетическая равновесная деполимеризация микротрубочек проходила с такой же скоростью, как в клетке, скорость отщепления в уравнении 7.1 должна быть 540 димеров в с. При такой высокой скорости критическая концентрация (уравнение 7.2) должна существенно увеличиться. Используя для скорости отщепления приведенные выше значения, критическая концентрация увеличится примерно в 36 раз, до 250 мкМ. Таким образом, она в 10 раз превысит внутриклеточную концентрацию тубулина, и приблизится к внутриклеточной концентрации АТФ (примерно 1 мМ). Получается, что клетка ничего не будет содержать, кроме тубулина!

Таким образом, если бы микротрубочки были равновесными полимерами, они могли бы находиться в клетке, но существовали бы большие трудности с их разборкой при перестройке. Поскольку разборка требует изменения состояния равновесия между микротрубочками и свободными тубулиновыми субъединицами, единственный способ, посредством которого клетка могла бы разобрать микротрубочки, заключался бы в разрушении большей части тубулина! В результате этого возникли бы большие трудности в адаптации формы клетки к изменению окружения. Клетка стала бы инертной и неспособной к быстрой адаптации.

Этих трудностей удастся избежать, поскольку после сборки тубулин гидролизует ГТФ, что превращает микротрубочки в неравновесные полимеры. В отличие от равновесного полимера, неравновесная микротрубочка способна к быстрой сборке и разборке, которые происходят при одной и той же концентрации тубулина. Это связано с тем, что процессы присоединения и отщепления субъединиц на конце микротрубочки уже не представляют собой одну обратимую реакцию, как это имеет место при простом равновесном связывании. В данном случае присоединяется одна форма (ГТФ-тубулин), а отщепляется другая (ГДФ-тубулин). Высвобождение энергии, происходящее между двумя реакциями при гидролизе ГТФ, означает, что константы скорости процессов присоединения и диссоциации не зависят друг от друга. Иными словами, каждый процесс может выполнять ту функцию, которая в данный момент удобна для клетки. В ходе эволюции константа скорости процесса отщепления субъединиц стала очень высокой. Таким образом, клетка может быстро разрушать трубочки, не меняя концентрации тубулина, что способствует ее быстрой перестройке и адаптивности.

Приложение: Метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания

Основные положения

- С помощью высокоинтенсивного лазерного излучения можно полностью удалить флуоресценцию зонда в белках или липидах
- Восстановление флуоресценции в обесцвеченной области происходит по мере заполнения ее мечеными белками или липидами. Они встраиваются на место обесцвеченных метаболитов
- Восстановление в микротрубочках участков после фотообесцвечивания требует их разборки и новой полимеризации, включающей флуоресцирующие тубулиновые димеры

Метод восстановления флуоресценции после обесцвечивания (FRAP) используется для измерения скорости, с которой конкретная молекула или структура обменивается с другими такими же молекулами и структурами, находящимися в небольшой области клетки. В случае отдельных молекул (обычно липидов или белков, не входящих в крупные структуры) FRAP позволяет выяснить, насколько быстро диффундируют молекулы и какая их часть обладает подвижностью. Для белков, которые служат компо-

нентами крупных неподвижных структур (например, филаментов цитоскелета), можно определить, как часто эти структуры диссоциируют и собираются повторно.

Для того чтобы воспользоваться методом FRAP, вначале в клетку необходимо ввести белок или липид, содержащий флуоресцентную метку. За клеткой наблюдают во флуоресцентном микроскопе и выжигают флуоресценцию в интересующей области при облучении ее лазерным пучком. (Удаление флуоресценции зонда высокоинтенсивным лазерным излучением называется обесцвечивание, отсюда и термин — *фотообесцвечивание*.) При этом пропадает только флуоресценция зонда, белок или липид сохраняют функциональную активность (так же как и структура, частью которой они являются), однако становятся невидимыми во флуоресцентном микроскопе. Если молекула с обесцвеченной флуоресцентной меткой способна к диффузии или к сборке в обесцвеченной зоне, то флуоресценция восстанавливается.

При изучении микротрубочек в клетку вводят тубулины, содержащие флуоресцентный зонд, и в продолжение определенного времени дают им возможность равномерно включиться в состав всех микротрубочек. Зонд представляет собой либо небольшую флуоресцирующую молекулу, ковалентно связанную с очищенным тубулином, либо фьюжн-белок, состоящий из α -тубулина и зеленого флуоресцирующего белка. Как видно на , после удаления флуоресценции в определенной области ее вос-

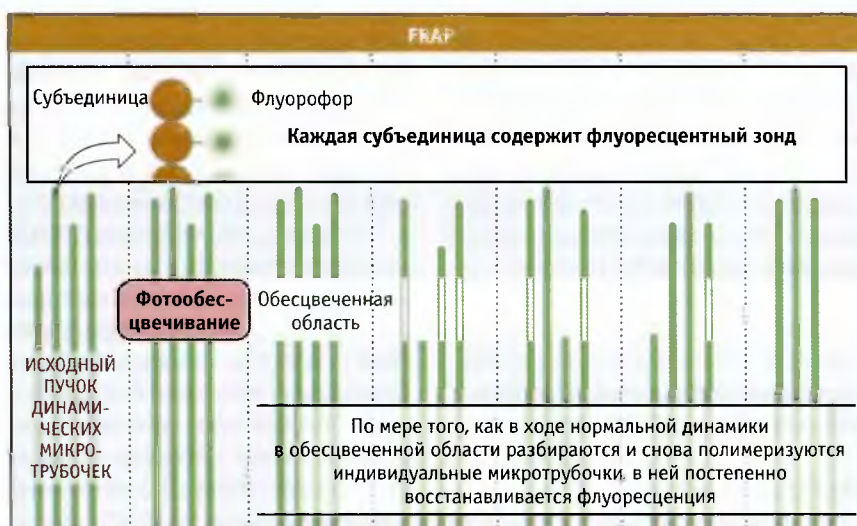


РИС. 72 Зелеными линиями представлены отдельные микротрубочки, состоящие из субъединиц, которые содержат флуоресцентный зонд. Перед началом эксперимента в небольшой области производят обесцвечивание флуоресцентного зонда, освещая ее высокоинтенсивным излучением. Если микротрубочки не проявляют динамических свойств, область неопределенно долго остается обесцвеченной. При проявлении ими динамических свойств, как показано на рисунке, в обесцвеченной области наблюдается постепенное восстановление флуоресценции. Это происходит по мере того, как обесцвеченные микротрубочки деполимеризуются и замещаются новыми, которые образуются при полимеризации субъединиц, содержащих флуоресцентный зонд. Поскольку количество обесцвеченных субъединиц в клетке невелико по сравнению с общим их пулом, вновь образованные микротрубочки флуоресцируют равномерно по всей длине. Таким образом, скорость восстановления флуоресценции в выбранной области отражает степень проявления микротрубочками динамических свойств

становление требует деполимеризации микротрубочек и сборки новых, которые включают тубулин с интактным флуоресцирующим зондом. Таким образом, скорость восстановления флуоресценции пропорциональна скорости оборота субъединиц микротрубочек.

7.21 Приложение: Синтез и модификация тубулина

Основные положения

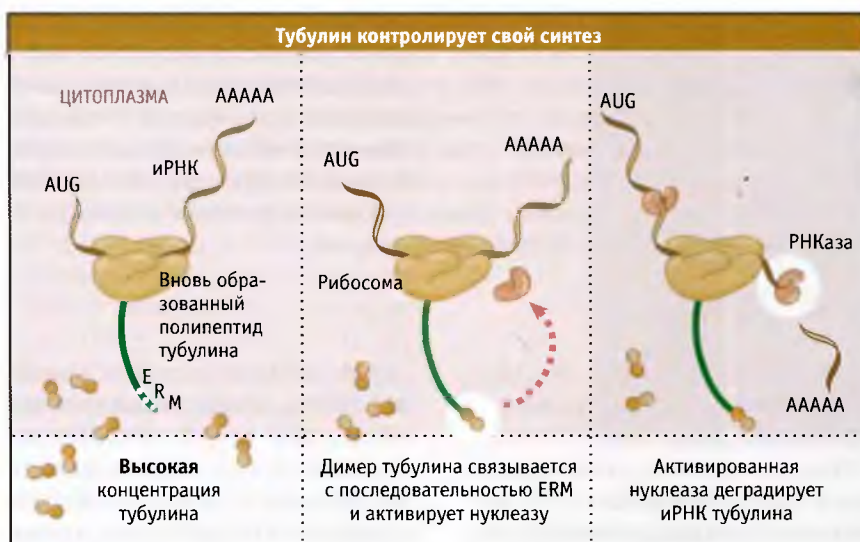
- Синтез новых молекул тубулина регулируется концентрацией димеров в цитоплазме
- Для правильного скручивания и сборки в гетеродимер, α - и β -тубулинам необходимы цитозольные шаперонины и дополнительные кофакторы
- Тубулины подвергаются различным посттрансляционным модификациям
- Некоторые модификации могут происходить только на полимерных молекулах. Они связаны со стабильной субпопуляцией микротрубочек
- У некоторых организмов присутствие в микротрубочке модифицированных тубулинов ускоряет связывание белковых моторов и представляет собой дополнительный механизм регуляции внутриклеточного транспорта везикул

Синтез α - и β -тубулинов регулируется по механизму обратной связи, который зависит от количества доступного в клетке тубулина (рис. 7.74). В момент трансляции полипептидная цепь тубулина, сходящая с рибосомы, может связываться димером тубулина, который активирует специальную РНКазу, разрушающую иРНК. Таким образом, в клетке с повышенным содержанием

тубулиновых димеров соответствующая иРНК оказывается менее устойчивой и образуется меньше новых молекул тубулина. Соответственно, если в клетке концентрация тубулина становится ниже уровня нормы, образуется больше молекул стабильной тубулиновой иРНК и синтезируется больше тубулина. Контролируя устойчивость тубулиновой иРНК с помощью тубулина, клетка способна поддерживать пул димеров тубулина в пределах концентраций, позволяющих микротрубочкам нормально функционировать.

Самостоятельно α - и β -тубулин не могут приобрести правильной структуры высшего порядка. Для этого необходимы несколько дополнительных белков, часть которых специфична для тубулина. После трансляции мономеры тубулина приобретают надлежащую структуру, присоединяя белок ССТ, шаперонин, который содержится в цитозоле. Этот процесс происходит с участием АТФ. Затем в сборке субъединиц в гетеродимеры участвуют другие белки, образующие большой комплекс (кофакторы А-Е) (рис. 7.74). На некоторых этапах процесса сборки каждая субъединица связывается с молекулой ГТФ. Для высвобождения готового димера из комплекса с кофактором необходимо, чтобы β -субъединица оказалась способной гидролизовать присоединенный к ней ГТФ, однако нуклеотид, связанный с α -субъединицей, при этом остается негидролизированным. Когда готовый димер тубулина высвободился, β -субъединица быстро обменивает ГТФ на ГДФ, и димер может собираться в микротрубочки.

Субъединицы тубулина служат мишенями для различных посттрансляционных ковалентных модификаций, таких как фосфорилирование обеих форм тубулина, удаление терминального тирозинового остатка



Взаимодействие между тубулиновым димером и короткой последовательностью на конце тубулинового полипептида ведет к деградации тубулиновой иРНК и к снижению его синтеза. Этот механизм отрицательной обратной связи поддерживает концентрацию тубулина в цитоплазме в очень узких пределах. На этом рисунке показаны только тубулин и нуклеаза, однако в процессе также могут участвовать и другие компоненты

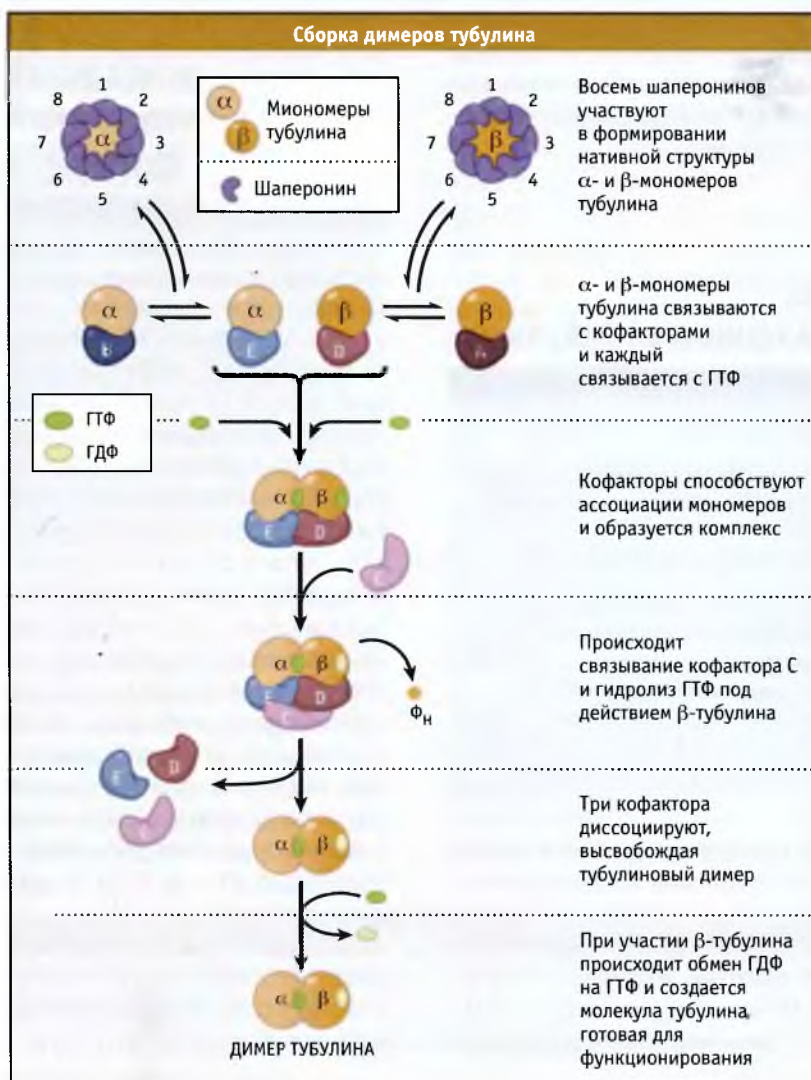


РИС. 7.74. Необходимые этапы сборки гетеродимера тубулина. Две тубулиновые субъединицы скручиваются отдельно, а затем вступают в контакт при участии кофакторов, некоторые из которых специфичны для тубулина. Могут потребоваться кофакторы А, В, D и Е, поскольку скрученная конформация субъединиц тубулина нестабильна до тех пор, пока они не являются частью тубулиновых димеров. Наоборот, может возникнуть необходимость немного изменить структуру субъединиц α и β с тем, чтобы они лучше подходили друг к другу. Для диссоциации кофакторов, после завершения процесса сборки, необходим кофактор С и источник энергии, в виде ГТФ, который гидролизует под действием β -тубулина

и ацетилирование специфических остатков лизина в α -тубулине, а также добавление остатков глутамата и глицина к обеим субъединицам. Давно было показано, что некоторые модификации, например ацетилирование и удаление тирозина, всегда происходят на более стабильных микротрубочках. Повышенные количества модифицированных тубулинов обнаружены в головном мозгу и в аксонах микротрубочек ресничек и жгутиков. Другие типы клеток содержат разные количества модифицированных тубулинов. В большинстве случаев, пока остается неясным, каким образом модификации определяют функции микротрубочек.

Модифицированные субъединицы тубулина представляют собой удобные маркеры стабильности микротрубочек, однако сами по себе посттрансляционные модификации не делают их более стабильными. В настоящее время неизвестно, каким образом определенная часть микротрубочек становится более стабильной, однако вероятно, что это происходит за счет связывания специфических MAP с их концами или стенками. Когда микротрубочка стабилизировалась, происходят описанные выше модификации составляющих ее субъединиц тубулина. В некоторых клетках стабильные микротрубочки преимущественно связаны белковыми молекулами, которые ускоряют движение по ним везикул.

Приложение: Методы изучения подвижности моторных белков микротрубочек

Основные положения

- Моторные белки сохраняют активность в клеточных экстрактах. Это позволяет выделять их в очищенном виде
- Моторные белки прикрепляются к стеклу и обеспечивают скольжение микротрубочек по поверхности
- Бусины — шарики, покрытые моторными белками, способны транспортироваться по микротрубочкам
- Используя микротрубочки с обозначенной полярностью, можно определить, в каком направлении движется по ним мотор

Открытие и выделение моторных белков микротрубочек были связаны с разработкой новых методов, которые позволили исследователям изучать их подвижность в экстрактах клеток *in vitro* или используя очищенные препараты белковых моторов. К открытию кинезина привели наблюдения над движущимися везикулами в грубом экстракте клеток — по существу неразбавленной цитоплазме — приготовленном из одного гигантского аксона кальмара. Аксон представляет собой перспективный объект для поиска таких молекулярных моторов, поскольку по его микротрубочкам осуществляется интенсивное движение везикул (см. рис. 7.1). Гигантский аксон отделяли от тела кальмара, и из него выдавливали цитоплазму (или аксоплазму, как ее предпочитают называть нейробиологи), которую для наблюдения движения помещали на предметное стекло. Путем фракционирования аксоплазмы и исследования подвижности каждой фракции Рон Вейл с соотр. выделили первый кинезиновый мотор.

В отличие от традиционных биохимических исследований, которые выполняются в пробирках, подвижность исследуется под микроскопом, что позволяет проследить за движением, которое обеспечивается мотором. Каким образом под микроскопом можно наблюдать активность мотора? Чтобы обнаружить движение, необходимо следить за объектом во времени. При этом белки должны быть нативными. При применении электронной микроскопии это исключается. Последняя требует жесткой химической обработки образцов, которая инактивирует белки. Световая микроскопия не обладает столь высоким разрешением как электронная, но обладает тем преимуществом, что обычно требует менее жесткой обработки образцов или вообще ее не требует. Поэтому ее можно использовать для изучения процессов требующих активных белков и которые продолжаются несколько минут или дольше. Однако микротрубочки слишком малы, чтобы связанную с ними подвижность можно было наблюдать с помощью обычного светового микроскопа. Проблема решается при визуализации микротрубочек одним из двух способов. Один способ состоит в использовании дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии (DIC) (являющейся разновидностью световой микроскопии) и в улучшении видимости с помощью видео и компьютерных методов. На рис. 7.76 показана микротрубочка, которая наблюдалась с применением метода

Изображение микротрубочки, полученное с помощью DIC-микроскопии



рис. 7.75. Изображение микротрубочки, полученное с помощью DIC-микроскопии с последующим компьютерным усилением. Изображение выглядит зернистым, однако отчетливо видно положение микротрубочки и ее длина. С помощью этого метода можно измерять длину микротрубочек, наблюдать подвижность и транспортные процессы с их участием. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай

DIC. Другой способ состоит в предварительной сборке микротрубочек из димеров тубулина, меченных флуоресцентным зондом, и дальнейшем наблюдении за ними с помощью флуоресцентного микроскопа.

Интересно, что для исследования подвижности белковых моторов карго не требуется. Это объясняется тем, что, в отличие от микротрубочек, белковые моторы свя-

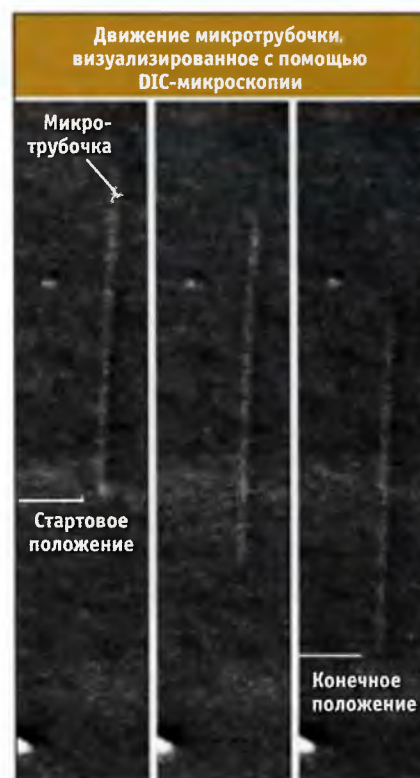


рис. 7.76. Серия видеок кадров, показывающих микротрубочку, которая перемещается по поверхности стекла. Изображение получено в эксперименте *in vitro*. Микротрубочки визуализированы методом дифференциальной интерференционной микроскопии (DIC) с последующей обработкой изображения. Транспорт микротрубочек происходит за счет генерации усилий белковыми моторами, связанными с поверхностью стекла. Фотография любезно предоставлена Линн Кассимери, Университет Лихай

зываются со стеклянными поверхностями (предметное и покрывное стекло микроскопа). При связывании со стеклом только моторов, их активность позволяет микротрубочкам перемещаться по поверхности. Соответствующие примеры представлены на РИС. 7.76 и 7.77.

Тест перемещения микротрубочек был использован для исследования биохимических фракций, которые получались при очистке первого кинезина. Этот тест обычно применяется для исследования моторных белков микротрубочек. В одной из его модификаций используют стеклянные или латексные бусинки, покрытые белковыми моторами, и наблюдают их движение по микротрубочкам. Такая «бусиновая проба» несколько более сложна, поскольку за бусинками и микротрубочками необходимо наблюдать с помощью светового микроскопа. Во всех случаях микротрубочки вначале стабилизируют, путем их связывания с паклитакселем (см. 7.1 Введение).



РИС. 7.78. Одиночная микротрубочка, сформировавшаяся из небольшого предшественника, на плюс-конце которого содержится значительно большее количество тубулиновых субъединиц с флуоресцирующим зондом. Хорошо заметна разница по длине между плюс- и минус-концами. Такие микротрубочки позволяют легко определять направление движения моторов. Фотография любезно предоставлена Аршадом Десаи, Людвиговский институт раковых исследований



РИС. 7.77. Два видеокadra, показывающие перемещение двух микротрубочек по поверхности стекла. Микротрубочки собраны из очищенного тубулина, к которому добавлено немного тубулина, содержащего флуоресцентный зонд. Кинезин прикрепляется к стеклу потому, что положительный заряд его хвостового домена взаимодействует с отрицательно заряженной поверхностью стекла. Красной и желтой стрелками отмечено положение двух микротрубочек; направление их движения обозначено пунктирными линиями. Воспроизведено с разрешения Milligan, R. 2000. *Science*, 288: 88–95. © AAAS. Видеокadры любезно предоставлены Ронем Миллигэн, Исследовательский институт Скриппса, Роналдом Вейлом, Медицинский институт Г. Хьюза и Грэмом Джонсоном, fivth.com

Характерная особенность белковых моторов состоит в том, что они способны перемещаться вдоль микротрубочки только в одном направлении. Для того чтобы определить, движется ли мотор по направлению к плюс- или минус-концу, необходимо высунуть, каким образом определяется полярность микротрубочки. Один из способов, позволяющих определить полярность, вначале включает сборку радиальных структур микротрубочек на изолированных центросомах, а затем их фиксацию на предметном стекле. Затем на это стекло наносят бусинки и наблюдают их движение. При этом бусинки, покрытые белковым мотором, которые движутся к центру структуры, движутся к минус-концу, а те, которые движутся от центра, движутся к плюс-концу. Еще один способ поместить полярность микротрубочек основан на более быстрой полимеризации плюс-конца. Для выполнения теста вначале формируют короткие микротрубочки с очень высоким процентом субъединиц, содержащих флуоресцирующий зонд. Эти ярко светящиеся микротрубочки затем используются как центры нуклеации более длинных микротрубочек в растворе, содержащем гораздо более низкий процент флуоресцирующего тубулина. Молекулы тубулина добавляются к обоим концам трубочек-центров нуклеации, но гораздо быстрее к плюс-концу. В результате образуется набор микротрубочек с одним коротким и очень ярким участком в середине, и более тусклыми, но видимыми участками на концах (РИС. 7.78). Участок с плюс-конца гораздо длиннее, чем с минус-конца, что сразу же позволяет определить полярность микротрубочки. Эти флуоресцирующие микротрубочки с обозначенной полярностью можно использовать для определения подвижности с целью определить направление движения. При расшифровке результатов эксперимента важно помнить, что белковые моторы зафиксированы. При движении мотора в направлении плюс-конца микротрубочка будет продвигаться вперед своим минус-концом. Почти все методы определения подвижности представляют собой варианты этих тестов. Характер поставленных задач, детали экспериментальных приспособлений и разрешение системы детекции могут различаться, но основной принцип остается тем же самым.

Список литературы

7.1 Введение

Обзор

- Jordan, M. A., and Wilson, L., 1998. Microtubules and actin filaments: Dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 10 p. 123–130.
- Kries, T., and Vale, R., eds., 1998. Guidebook to Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford University Press.

7.2 Общие функции микротрубочек

Обзор

- Gard, D. L., Cha, B. J., and Schroeder, M. M., 1995. Confocal immunofluorescence microscopy of microtubules, microtubule-associated proteins, and microtubule-organizing centers during amphibian oogenesis and early development. *Curr. Top. Dev. Biol.* v. 31 p. 383–431.
- Howard, J., and Hyman, A. A., 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* v. 422 p. 753–758.

7.3 Микротрубочки представляют собой поляризованные полимеры α - и β -тубулина

Обзор

- Nogales, E., 2001. Structural insight into microtubule function. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v. 30 p. 397–420.

Исследование

- Song, Y. H., and Mandelkow, E., 1995. The anatomy of flagellar microtubules: Polarity, seam, junctions, and lattice. *J. Cell Biol.* v. 128 p. 81–94.

7.4 Очищенные субъединицы тубулина собираются в микротрубочки

Обзор

- Desai, A., and Mitchison, T. J., 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 83–117.
- Job, D., Valiron, O., and Oakley, B., 2003. Microtubule nucleation. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 15 p. 111–117.
- Mitchison, T. J., 1992. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. Cell* v. 3 p. 1309–1315.

7.6 Кэп ГТФ-тубулиновых субъединиц регулирует переходы динамической нестабильности

Обзор

- Desai, A., and Mitchison, T. J., 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 13 p. 83–117.
- Howard, J., and Hyman, A. A., 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* v. 422 p. 753–758.
- Mitchison, T. J., 1992. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. Cell* v. 3 p. 1309–1315.

Исследование

- Arnal, I., Karsenti, E., and Hyman, A. A., 2000. Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* v. 149 p. 767–774.

7.7 Для инициации сборки клетки используют центры организации микротрубочек

Обзор

- Bornens, M., 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 25–34.

Исследование

- Dicthenberg, J. B., Zimmerman, W., Sparks, C. A., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F. S., and Doxsey, S. J., 1998. Pericentrin and gamma-tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell Biol.* v. 141 p. 163–174.
- Moritz, M., Braunfeld, M. B., Sedat, J. W., Alberts, B., and Agard, D. A., 1995. Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* v. 378 p. 638–640.

7.8 Динамика микротрубочек в клетках

Обзор

- Bornens, M., 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 25–34.

Исследование

- Komarova, Y. A., Vorobjev, I. A., and Borisy, G. G., 2002. Life cycle of MTs: Persistent growth in the cell interior, asymmetric transition frequencies and effects of the cell boundary. *J. Cell Sci.* v. 115 p. 3527–3539.
- Rusan, N. M., Fagerstrom, C. J., Yvon, A. M., and Wadsworth, P., 2001. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol. Biol. Cell* v. 12 p. 971–980.

7.9 Зачем в клетках присутствуют динамичные микротрубочки?

Исследование

- Holy, T. E., Dogterom, M., Yurke, B., and Leibler, S., 1997. Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 94 p. 6228–6231.

7.10 Для регуляции стабильности микротрубочек клетки используют несколько групп белков

Обзор

- Cassimeris, L., 1999. Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 11 p. 134–141.
- Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q., 1999. Neurodegenerative tauopathies: human disease and transgenic mouse models. *Neuron* v. 24 p. 507–510.

Исследование

- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T. J., and Walczak, C. E., 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* v. 96 p. 69–78.
- Gundersen, G. G., and Bretscher, A., 2003. Cell biology. Microtubule asymmetry. *Science* v. 300 p. 2040–2041.
- Heald, R., 2000. A dynamic duo of microtubule modulators. *Nat. Cell Biol.* v. 2 p. E11–E12.
- McNally, F. J., 2001. Cytoskeleton: CLASPing the end to the edge. *Curr. Biol.* v. 11 p. R477–R480.

7.11 Общие представления о моторных белках микротрубочек

Обзор

- Gibbons, I. R., 1995. Dynein family of motor proteins: present status and future questions. *Cell Motil. Cytoskeleton* v. 32 p. 136–144.

7.12 Как работают моторные белки

Обзор

- Gibbons, I. R., 1995. Dynein family of motor proteins: present status and future questions. *Cell Motil. Cytoskeleton* v. 32 p. 136–144.
- Vale, R. D., and Milligan, R. A., 2000. The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* v. 288 p. 88–95.
- Woehlke, G., and Schliwa, M., 2000. Walking on two heads: The many talents of kinesin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* v. 1 p. 50–58.

Исследование

- Burgess, S. A., Walker, M. L., Sakakibara, H., Knight, P. J., and Oiwa, K., 2003. Dynein structure and power stroke. *Nature* v. 421 p. 715–718.
- Gross, S. P., Welte, M. A., Block, S. M., and Wieschaus, E. F., 2002. Coordination of opposite-polarity microtubule motors. *J. Cell Biol.* v. 156 p. 715–724.
- Vallee, R. B. and Høök, P., 2003. Molecular motors: A magnificent machine. *Nature* v. 421 p. 701–702.

7.13 Каким образом карго связывается с соответствующим мотором

Обзор

- Goldstein, L. S., 2001. Kinesin molecular motors: transport pathways, receptors, and human disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 98 p. 6999–7003.
- Holleran, E. A., Karki, S., and Holzbaur, E. L., 1998. The role of the dynactin complex in intracellular motility. *Int. Rev. Cytol.* v. 182 p. 69–109.
- Kamal, A., and Goldstein, L. S., 2002. Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 14 p. 63–68.
- Vale, R. D., 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* v. 112 p. 467–480.

7.15 Взаимодействие между микротрубочками и актиновыми филаментами

Обзор

- Rodriguez, O. C., Schaefer, A. W., Mandato, C. A., Forscher, P., Bement, W. M., and Waterman-Storer, C. M., 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat. Cell Biol.* v. 5 p. 599–609.

Исследование

- Bayless, K. J., and Davis, G. E., 2004. Microtubule depolymerization rapidly collapses capillary tube networks in vitro and angiogenic vessels in vivo through the small GTPase Rho. *J. Biol. Chem.* v. 279 p. 11686–11695.

7.16 Реснички и жгутики являются подвижными структурами

Обзор

- Cole, D. G., 2003. The intraflagellar transport machinery of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic* v. 4 p. 435–442.

Ibañez-Tallon, I., Heintz, N., and Omran, H., 2003. To beat or not to beat: Roles of cilia in development and disease. *Hum. Mol. Genet.* v. 12 Spec No 1 p. R27–R35.

Pazour, G. J., and Witman, G. B., 2003. The vertebrate primary cilium is a sensory organelle. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 15 p. 105–110.

Porter, M. E., and Sale, W. S., 2000. The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *J. Cell Biol.* v. 151 p. F37–F42.

7.17 Что дальше?

Обзор

- Addinall, S. G., and Holland, B., 2002. The tubulin ancestor, FtsZ, draughtsman, designer and driving force for bacterial cytokinesis. *J. Mol. Biol.* v. 318 p. 219–236.
- Hirokawa, N., and Takemura, R., 2003. Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem. Sci.* v. 28 p. 558–565.
- Kirschner, M., and Mitchison, T., 1986. Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell* v. 45 p. 329–342.

Исследование

- Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L., and Mitchison, T. J., 1999. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* v. 286 p. 971–974.
- Puls, I., Jonnakuty C., LaMonte, B. H., Holzbaur, E. L., Tokito, M., Mann, E., Floeter, M. K., Bidus, K., Drayna, D., Oh, S. J., Brown, R. H., Ludlow, C. L., and Fischbeck, K. H., 2003. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat. Genet.* v. 33 p. 455–456.
- Zhao, C., et al., 2001. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* v. 105 p. 587–597.

7.21 Приложение: Синтез и модификация тубулина

Обзор

- Cleveland, D. W., 1988. Autoregulated instability of tubulin mRNAs: A novel eukaryotic regulatory mechanism. *Trends Biochem. Sci.* v. 13 p. 339–343.
- Ludueña, R. F., 1998. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* v. 178 p. 207–275.
- Rosenbaum, J., 2000. Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr. Biol.* v. 10 p. R801–R803.
- Szymanski, D., 2002. Tubulin folding cofactors: half a dozen for a dimer. *Curr. Biol.* v. 12 p. R767–R769.

7.22 Приложение: Методы изучения подвижности моторных белков микротрубочек

Исследование

- Vale, R. D., Reese, T. S., and Sheetz, M. P. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* v. 42 p. 39–50.

Актин

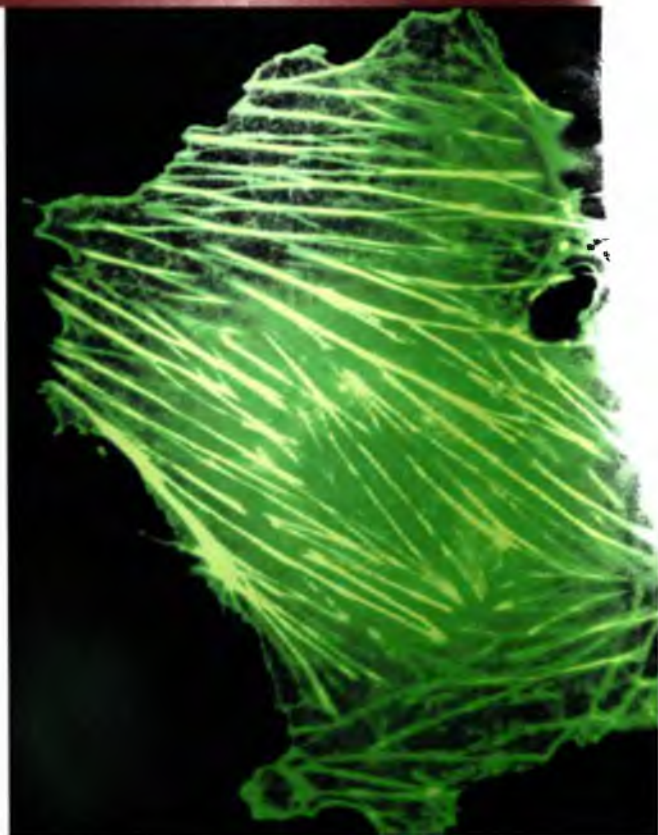
Энрике М. Де Ла Круз

Факультет молекулярной биофизики и биохимии,
Йельский университет, Нью-Хейвен, КТ

Е. Майкл Остап

Медицинский факультет Пенсильванского университета,
Институт изучения мышечной деятельности, Факультет
физиологии, Филадельфия, ПА

Микрофотография эпителиальной клетки. Актиновые филаменты содержат фаллоидин, флуоресцирующий зеленым цветом. Ярко светящиеся линейные структуры представляют собой сократимые элементы, содержащие миозин, которые называются стресс-фибриллами. Фотография любезно предоставлена Наньюн Таном и Е. Майклом Остап, Пенсильванский университет



КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛАВЫ

- 8.1** Введение
 - 8.2** Актин является широко распространенным белком цитоскелета
 - 8.3** Мономерный актин связывает АТФ и АДФ
 - 8.4** Актиновые филаменты представляют собой структурно поляризованные полимеры
 - 8.5** Полимеризация актина представляет собой многоступенчатый и динамичный процесс
 - 8.6** Актиновые субъединицы гидролизуют АТФ после полимеризации
 - 8.7** Белки, связывающиеся с актином, регулируют его полимеризацию и организацию филаментов
 - 8.8** Белки, связывающиеся с актиновыми мономерами, влияют на их полимеризацию
 - 8.9** Полимеризация актина в клетке контролируется белками нуклеации
 - 8.10** Длина актиновых филаментов регулируется кэпирующими белками
 - 8.11** Динамика актиновых филаментов регулируется с помощью разрезающих и деполимеризующих белков
 - 8.12** Сшивающие белки организуют актиновые филаменты в пучки и ортогональные сети
 - 8.13** Подвижность клеток обеспечивается совместным функционированием актина и взаимодействующих с ним белков
 - 8.14** Полимеризация актина регулируется малыми G-белками
 - 8.15** Миозины представляют собой молекулярные моторы, связанные с актином, которые играют существенную роль во многих клеточных процессах
 - 8.16** Миозины содержат три структурных домена
 - 8.17** Гидролиз АТФ под действием миозина представляет собой многоступенчатый процесс
 - 8.18** Кинетические свойства миозиновых моторов приспособлены к выполнению их внутриклеточной роли
 - 8.19** Миозин перемещается на нанометровые расстояния и генерирует усилия в несколько пиконьютонов
 - 8.20** Внутриклеточные функции и локализация миозинов регулируются различными путями
 - 8.21** Миозин II участвует в мышечном сокращении
 - 8.22** Что дальше?
 - 8.23** Резюме
 - 8.24** Приложение: Две модели, описывающие генерацию силы при сборке полимера
- Список литературы

- Подвижность является фундаментальным и необходимым свойством всех эукариотических клеток
- Актиновые филаменты образуют много различных клеточных структур
- Белки, связанные с актиновым цитоскелетом, способны развивать усилия, обеспечивающие подвижность клеток
- Актиновый цитоскелет представляет собой динамическую структуру и перестраивается в ответ на сигналы, поступающие из клетки или из окружающей среды
- При полимеризации актина генерируются усилия, которые вызывают удлинение клеточных выростов и обеспечивают подвижность некоторых органелл

Внутренний **цитоскелет**, состоящий из микротрубочек, **актиновых** филаментов (также называемых микрофиламентами) и промежуточных филаментов, обеспечивает клетке механическую прочность и помогает ей поддерживать определенную форму. Наряду с этим, цитоскелет представляет собой опорную структуру, позволяющую клетке осуществлять контроль за передвижением, изменением формы и перестройкой внутренних элементов. Движения, которые совершаются при участии цитоскелета, обеспечивают **клеточную подвижность**. Для осуществления многих клеточных функций необходимо согласованное действие двух или трех структур цитоскелета, состоящих из филаментов (см. 7.15 *Взаимодействие между микротрубочками и актиновыми филаментами*). Однако актиновые филаменты играют ведущую роль в реализации многих клеточных функций, например в цитокинезе, фагоцитозе и мышечном сокращении.

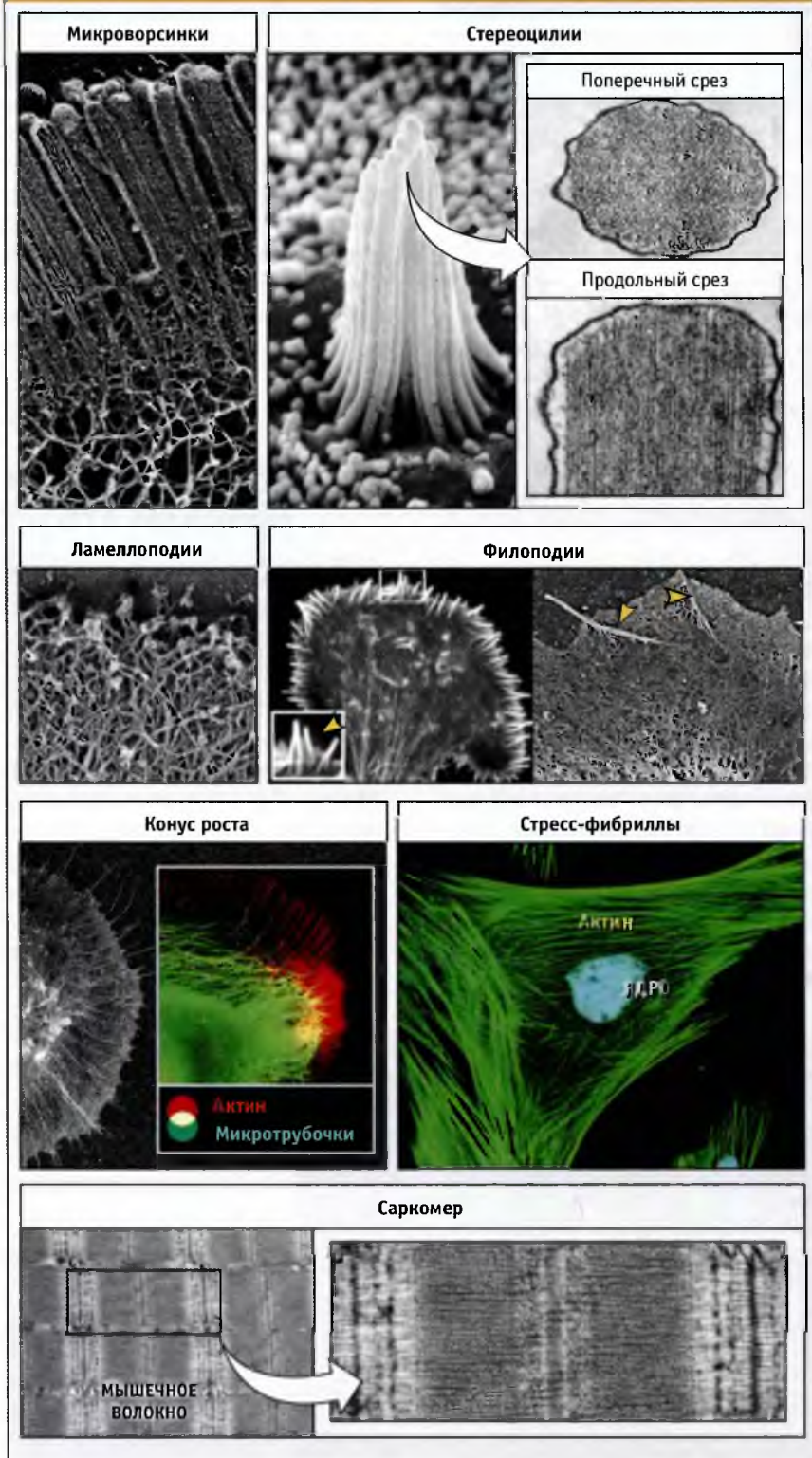
Белок актин полимеризуется с образованием длинных фибриллярных филаментов, диаметр которых достигает ~ 8 нм. Эти филаменты могут сшиваться другими белками, образуя разнообразные клеточные структуры. На рис. 8.1 представлены некоторые структуры, основным компонентом которых служит актиновый цитоскелет. К их числу относятся кишечные микроворсинки, стереоцилии сенсорного эпителия, стресс-фибриллы прикрепленных клеток, конус роста нейронов, выросты (ламеллоподии и филоподии) на границе подвижных клеток, и тонкие филаменты клеток мышц. Почти все структуры, построенные на основе актина, являются динамичными и способны к перестройке в ответ на внутренние или внешние сигналы.

Актиновый цитоскелет генерирует силу и осуществляет движение клеток двумя путями: за счет полимеризации актиновых мономеров в филаменты и взаимодействия с миозиновыми моторами. Последние связываются с актиновыми филаментами латерально и генерируют усилия и движение за счет энергии гидролиза АТФ. При этом движение может совершаться по отношению к актиновому филаменту, как, например, при мышечном сокращении и транспорте везикул. Например, сила, которая генерируется за счет полимеризации актина, используется для выталкивания вперед плазматической

мембраны при движении клетки. Во многих процессах, например при мышечном сокращении, актин и миозин функционируют совместно.

В настоящей главе мы рассмотрим механизм подвижности клеток эукариот, связанный с актомиозиновым комплексом. Многие закономерности подвижности клеток удалось выяснить при проведении биохимических экспериментов с использованием очищенных белков и клеточных компонентов. На основании этих экспериментов можно смоделировать более сложные движения клеток. Поэтому в первую очередь мы охарактеризуем молекулярные свойства актинового цитоскелета (строение, сборку и разборку филаментов и белков, регулирующих динамику актина в клетке). Затем мы обсудим актин и связанные с ним белки в связи с их функционированием в клетке. Актиновый цитоскелет играет критическую роль почти в каждом клеточном процессе; в настоящей главе мы рассмотрим двигательную активность, связанную со сборкой актиновых филаментов, а также с сокращением актомиозинового комплекса, и вопросы транспорта с его участием. Мы также приводим ссылки на другие главы, в которых обсуждается значимость актинового цитоскелета в жизнедеятельности клетки и его динамика.

РИС. 8.1. Актиновые филаменты образуют кишечные микроворсинки, стереоцилии внутреннего уха, ламеллоподии, филоподии, конус роста нейронов, стресс-фибриллы и саркомеры. Фотографии микроворсинок получены в электронном микроскопе и воспроизведены из *The Journal of Cell Biology*, 1982, vol. 94, pp. 425–443. © The Rockefeller University Press. Фотографии стереоцилий, сделанные в сканирующем и трансмиссионном электронном микроскопе, любезно предоставлены James A. Hudspeth, Университет Рокфеллера. Воспроизведено из Hudspeth, A. J. and Jackobs, R. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76: 1506–1509. © 1979 National Academy of Sciences USA (слева). Воспроизведено из *The Journal of Cell Biology*, 1980. Vol. 86. pp. 244–259. © Rockefeller University Press (вверху и справа). Фотография ламеллоподий любезно предоставлена Татьяной М. Свиткиной, Пенсильванский университет. Воспроизведено из Motta, P.M. *Recent Advances in Microscopy of Cells, Tissues and Organs*. © 1997 by Antonio Delfino Editore-Roma. Фотография филоподий воспроизведена из *Cell*, vol. 118, Gertler, B., et al. *Lamellipodial Versus Filopodial...* pp. 363–373. © 2004 с разрешения Elsevier. Фотография любезно предоставлена Татьяной М. Свиткиной, Пенсильванский университет. Фотография конуса роста нейрона, содержащего флуоресцентный зонд, воспроизведена из *The Journal of Cell Biology*, 2002, vol. 158, pp. 139–152. © The Rockefeller University Press. Фотография любезно предоставлена Эндрю Шефером и Полом Форшером, Иельский университет. Фотография клетки со стресс-фибриллами, содержащими флуоресцентный зонд, любезно предоставлена Майклом В. Дэвидсоном и Исследовательским фондом Университета штата Флорида. Электронная микрофотография саркомера любезно предоставлена Кларой Франзини-Армстронг, Медицинский факультет Пенсильванского университета



8.2 Актин является широко распространенным белком цитоскелета

Основные положения

- Актин является необходимым широко распространенным белком, присутствующим во всех эукариотических клетках
- Актин существует в виде мономера, который называется G-актин, и в виде линейного полимера, называемого F-актином

Актин относится к чрезвычайно распространенным белкам, которые присутствуют во всех клетках эукариот. Он характеризуется консервативной структурой; актиновые последовательности у разных видов организмов проявляют 90% идентичность. Высокая степень структурной гомологии актина обнаруживается также среди прокариот (см. 16.6 *Клеточная стенка бактерий содержит сетчатую структуру пептидогликана*). В клетках мышц на долю актина приходится до 20% общего белка, а во многих клетках концентрация его в цитозоле составляет более 100 мкМ.

Многие организмы обладают множественными актиновыми генами, кодирующими различные изоформы актина (например, у человека известно шесть актиновых генов). У позвоночных существует три формы актина: α , β , и γ . Эти изоформы имеют близкий аминокислотный состав, но обладают различными функциями. Изоформа α экспрессируется, главным образом, в клетках мышц и является частью сократительных структур. Изоформы β и γ экспрессируются в основном в клетках, отличных от мышечных.

Актин существует в мономерной форме (называемой глобулярный, т. е. **G-актин**) и в форме линейного полимера (филаментарный или **F-актин**). Мономеры и филаменты находятся в обратимом химическом равновесии, поскольку индивидуальный актиновый мономер может связаться с концом филамента или отщепиться от него. В

клетке полимеризация актина тонко регулируется многими белками, которые в основном взаимодействуют с его мономерами или филаментами. Эти регуляторные белки, способные связывать актин, контролируют переход между его мономерной и филаментарной формой (см. 8.7 *Белки, связывающиеся с актином, регулируют его полимеризацию и организацию филаментов*).

Известно несколько актиноподобных белков (Agrps), которые по структуре близки к актину. К этим белкам относится Agr1, представляющий собой часть белкового комплекса, который связывает белок мотора микротрубочек, динеин, с мембраной (см. 7.13 *Каким образом карго связывается с соответствующим мотором*). Позже в этой главе мы рассмотрим роль белкового комплекса, состоящего из Agr2 и Agr3, в регуляции полимеризации актина (см. 8.9 *Полимеризация актина в клетке контролируется белками нуклеации*).

8.3 Мономерный актин связывает АТФ и АДФ

Основные положения

- Мономерный актин представляет собой молекулу размером 43 кДа, состоящую из четырех субдоменов
- Обратимое связывание двухвалентного катиона и нуклеотида происходит в кармане мономерного актина

Мономерный актин представляет собой белок размером 43 кДа, с которым связан нуклеотид и двухвалентный катион. По форме он напоминает две доли, которые разделены большим углублением (карманом). Кристаллическая структура актина представлена на рис. 8.2. Каждая доля состоит из двух субдоменов. Четыре субдомена обозначаются номерами с 1 по 4. Две

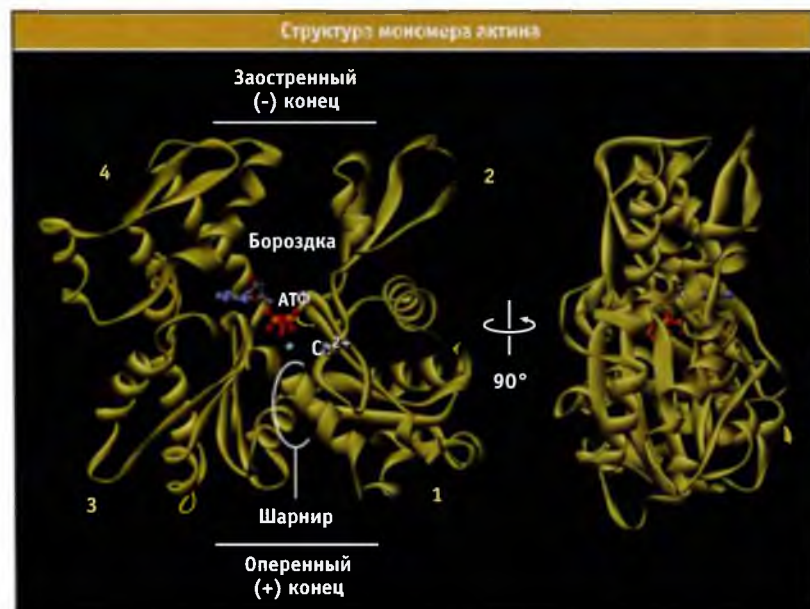
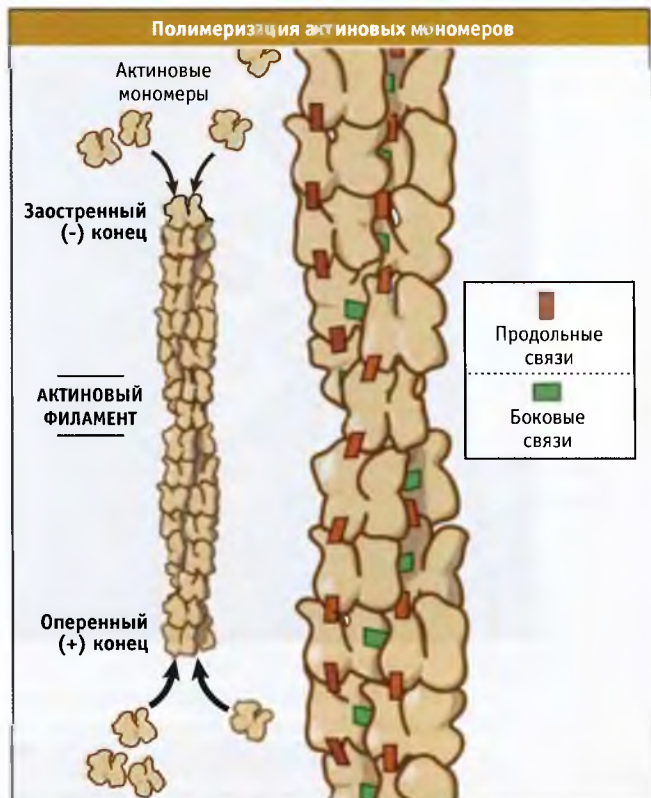


Рис. 8.2 Кристаллическая структура белкового каркаса мономера актина. Субдомены обозначены номерами с 1 по 4. Изображение построено по данным Protein Data Bank file 1ATN (Kabsch W., Mannherz H. G., Suck, D., Pai, E. F., Holmes, K. C. Atomic Structure of the Actin: DNase I Complex, *Nature* 347: 37–44 (1990))

доли соединяются двумя цепями между доменами 1 и 3. Они служат стержнем, позволяющим им двигаться друг относительно друга.

Нуклеотид (АТФ или АДФ) и двухвалентный катион (кальция или магния) связываются с центральной частью мономерного актина, глубоко проникая в углубление между 2 и 4 субдоменами. Как считают, при связывании нуклеотидов заполняется щель между двумя долями. Связывание обратимо, и связанный нуклеотид обменивается со свободными нуклеотидами, которые находятся в растворе. Поскольку актин связывает АТФ более прочно, чем АДФ, и концентрация Mg^{2+} в цитозоле гораздо выше, чем Ca^{2+} , АТФ присутствует в большей концентрации, и в клетке, в мономерном актине, сайт связывания нуклеотидов занят $MgATP$.



Актиновые момеры собираются «голова к хвосту», образуя двунитевые поляризованные филаменты

8.4 Актиновые филаменты представляют собой структурно поляризованные полимеры

Основные положения

- В присутствии физиологических концентраций моновалентных и двухвалентных катионов мономерный актин полимеризуется, образуя филаменты
- Актиновые филаменты структурно поляризованы и два их конца неидентичны

В присутствии моновалентных и двухвалентных катионов во внутриклеточной концентрации, мономерный актин полимеризуется с образованием филаментов, диаметр которых составляет ~8 нм. Полимеризация носит обратимый характер, и момеры постоянно добавляются к концу филамента и отщепляются от него. Процесс сборки и разборки обуславливает подвижность клеток, в основе которой лежит процесс полимеризации актина.

Как показано на рис. 8.3 и 8.4, момеры полимеризуются, ориентируясь «голова к хвосту», и, таким образом, все субъединицы в филаменте имеют оди-

наковую ориентацию. Актиновый филамент напоминает двойную нитку бус, закрученную вправо, как показано на рис. 8.3 и 8.4. Это было обнаружено с помощью электронной микроскопии. Поскольку структура мономеров полярна (см. рис. 8.2), филамент также полярен, т. е. два его конца различны. Они называются **оперенный и заостренный** концы. Полярность филамента играет роль в двухстороннем транспорте и в поляризации клеток.

Конец актинового филамента, который заканчивается субдоменами 1 и 3, представляет собой оперенный конец, а заканчивающийся субдоменами 2

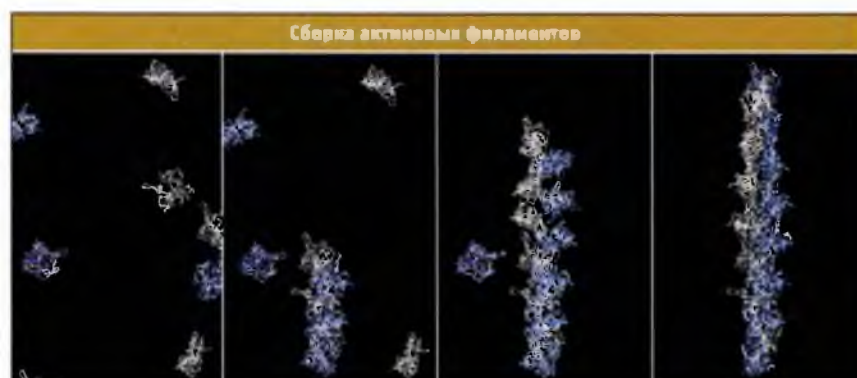


рис. 8.4. Кадры анимации, иллюстрирующие последовательную сборку актиновых мономеров в актиновый филамент. Фотографии любезно предоставлены Кеннет К. Холмс, Институт медицинских исследований им. Макса Планка

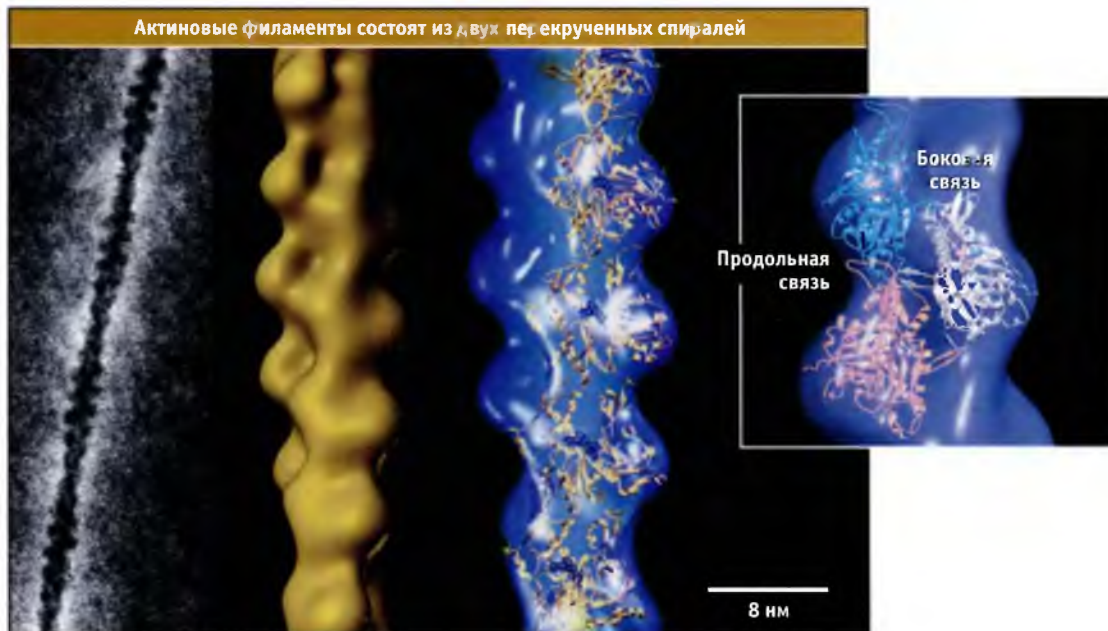


РИС. 8.5. (Слева) Фотография актинового филамента, сделанная с помощью электронного микроскопа. (В середине) Модель актинового филамента, построенная на основании трехмерной реконструкции электронных микрофотографий. (Справа) Атомные структуры актиновых мономеров расположены на фоне трехмерной модели и иллюстрируют размещение субъединиц в одной цепи актинового филамента. Фотография любезно предоставлена Уэли Эби, Базельский университет

и 4 — заостренный (см. рис. 8.3). Эти названия происходят от внешнего вида актиновых филаментов, связанных с миозином. Поскольку актиновые филаменты спирализованы и поляризованы, в электронном микроскопе миозиновые белки напоминают оперение стрелы (см. рис. 8.9). Оперенные и заостренные актиновые филаменты также обозначают как плюс (+) и минус (–) концы соответственно, что согласуется с номенклатурой, принятой для обозначения соответствующих концов микротрубочек (см. 7.3 Микротрубочки представляют собой поляризованные полимеры α - и β -тубулина).

Каждая актиновая субъединица в составе филамента контактирует с четырьмя соседними субъединицами: одна с каждой стороны той же цепи (продольные контакты) и две на противоположной цепи (латеральные контакты) (см. рис. 8.3). Эти контакты делают актиновые филаменты очень прочными. Они устойчивы к температурным изменениям и могут расти, достигая длины порядка тысяч субъединиц. Филаменты прочны, но ломаются при резком изгибе. Хотя короткие филаменты (< 5 мкм) не изогнуты, длинные (> 15 мкм) часто искривлены.

8.5 Полимеризация актина представляет собой многоступенчатый и динамичный процесс

Основные положения

- Полимеризация актина *de novo* представляет собой многоступенчатый процесс, включающий инициацию и элонгацию
- Скорость полимеризации мономера на двух концах филамента различается
- Оперенный конец актинового филамента растет быстрее

Клетки движутся, выдвигая вперед передний край и подтягивая хвостовой отдел. Передние выросты могут представлять собой ламеллоподии или филоподии. Ламеллоподии представляют собой тонкие плоские выросты, окруженные мембраной, содержащие разветвленную сеть актиновых филаментов (см. рис. 8.1). Напротив, филоподии выглядят как щупальцы, окруженные мембраной и содержащие пучки актиновых филаментов, расположенных параллельно друг другу

(см. рис. 8.1). Рост филоподии и ламеллоподии происходит за счет полимеризации актина. Этот процесс мы обсудим здесь подробно.

Полимеризация мономеров актина при образовании филаментов представляет собой многоступенчатый процесс. Его можно изучать *in vitro*, используя очищенный мономерный актин в растворе с низкой ионной силой. Полимеризация инициируется увеличением концентрации соли до физиологического уровня. Процесс спонтанной полимеризации *in vitro* можно подразделить на три фазы — **нуклеация**, **элонгация**, и **равновесное состояние** (рис. 8.5).

В фазе нуклеации образуется актиновый олигомер, по свойствам близкий к филаменту. Этот олигомер служит ядром (нуклеусом) для последующей полимеризации актина. Нуклеус представляет собой тример, который является наименьшей единицей, контактирующей с филаментом в продольном и латеральном направлениях (рис. 8.5). Таким образом, нуклеация происходит в два этапа: образование димера из двух мономеров с последующим присоединением третьей субъединицы. При этом полу-

чается тример. Актиновые димеры и тримеры неустойчивы ($K_d \sim 100 \text{ мкМ}^{-1} \text{ мМ}$) и существуют в очень низких концентрациях. Таким образом, в результате нуклеации при спонтанной полимеризации возникает лаг-период. Лаг-период может отсутствовать, если уже готовы ядра, из которых могут образоваться мономеры (например, если присутствуют преформированные филаменты). В клетке сборка филаментов инициируется белками, связывающимися с актином (см. 8.9 Полимеризация актина в клетке контролируется белками нуклеации).

В фазе элонгации происходит быстрый рост филаментов в продольном направлении (см. рис. 8.6). Актиновые филаменты растут с концов, а не с боков. Поэтому филаменты различны по длине, но все обладают одинаковой толщиной. По мере полимеризации субъединиц и снижения концентрации свободного мономера, фаза элонгации замедляется.

Когда процесс полимеризации находится в стационарном состоянии, то рост филаментов не происходит. Однако наблюдается медленный постоянный обмен между актиновыми субъединицами, находящимися на

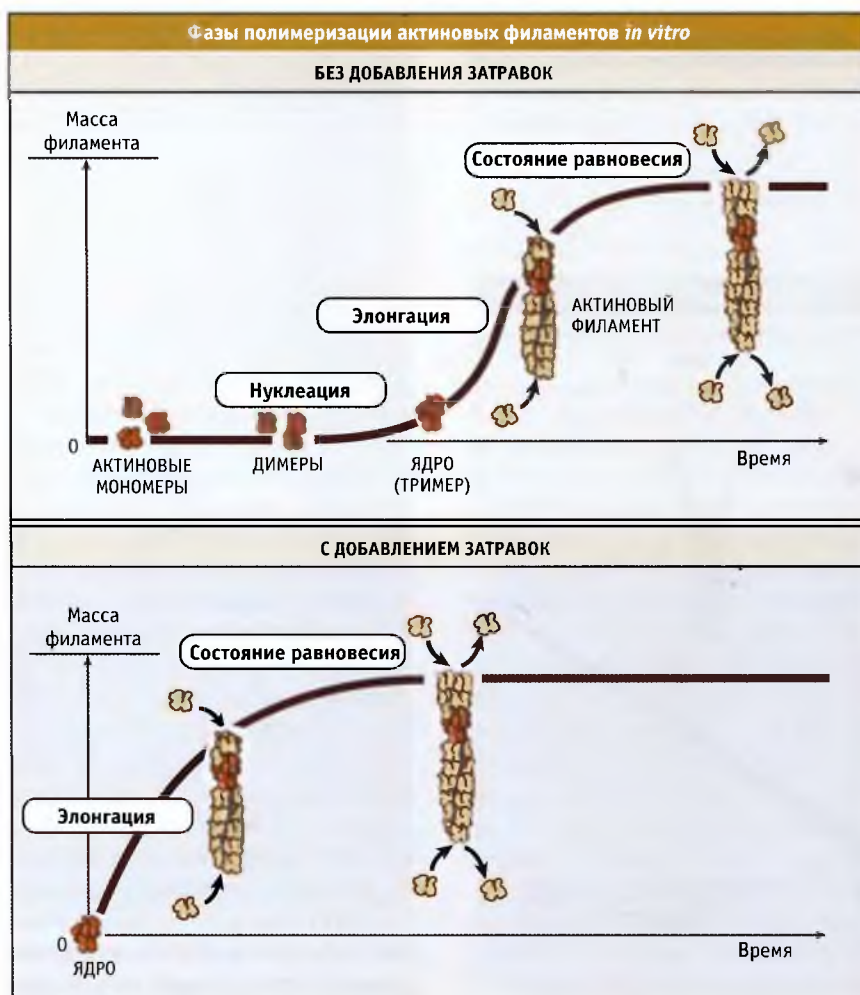
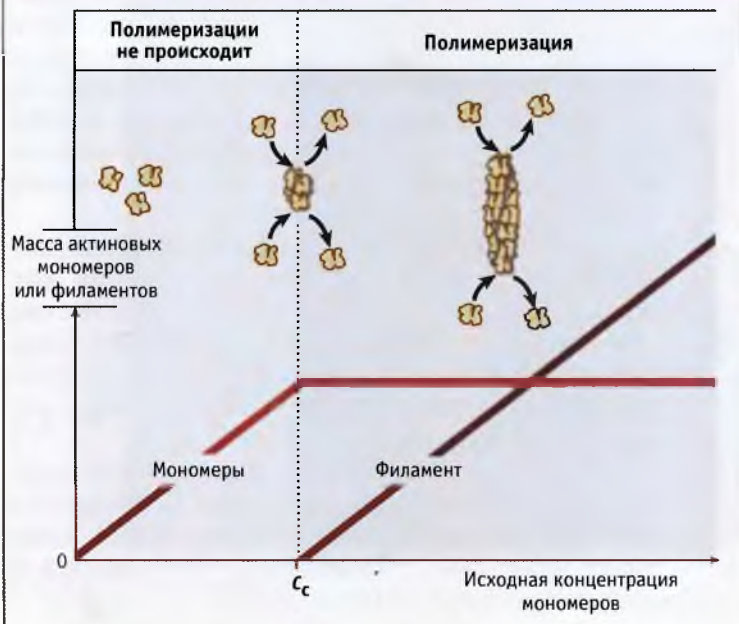


РИС. 8.5. Процесс сборки актиновых филаментов, начиная с раствора мономеров, можно подразделить на следующие фазы: нуклеация, элонгация и состояние равновесия. Фазу нуклеации можно обойти, добавив небольшое количество преформированных филаментов (ядер)

Полимеризация актина начинается, когда его концентрация превышает критическую

РИС. 8.7. По данным исследований *in vitro*, сборка актиновых филаментов начинается, когда исходная концентрация актиновых мономеров превышает критическую концентрацию, C_c



концах филаментов и в пуле мономеров. Концентрация свободных актиновых мономеров, характерная для стационарного состояния, называется **критической концентрацией** (C_c) (рис. 8.7). Этим термином также обозначают концентрацию актиновых субъединиц, которая необходима для образования филаментов (C_c для сборки актина). Когда общая концентрация мономерного актина превышает критическую, происходит образование филаментов. Напротив, если общая концентрация актина ниже критической, он существует только в мономерной форме. При определенном составе раствора критическая концентрация представляет собой постоянную величину, однако она зависит от присутствия регуляторных белков, которые связываются с актиновыми мономерами и филаментами (см. 8.8 Белки, связывающиеся с актиновыми мономерами, влияют на их полимеризацию и 8.9 Полимеризация актина в клетке контролируется белками нуклеации).

При концентрации мономеров выше критической происходит элонгация филаментов, скорость которой линейно зависит от концентрации мономеров в растворе (рис. 8.8). Скорость элонгации индивидуального филамента представляет собой произведение константы скорости добавления мономеров (k_{on} ; ед $\text{мкМ}^{-1} \text{с}^{-1}$) и их концентрации. Скорость деполимеризации (k_{off} ; ед с^{-1}) не зависит от концентрации мономерного актина. Когда концентрация мономерного актина равняется крити-

По данным экспериментов *in vitro*, скорость элонгации линейно зависит от концентрации актиновых мономеров

ческой, то скорость элонгации и деполимеризации становится одинаковой, и роста филамента не происходит:

$$(k_{\text{on}})(C_c) = k_{\text{off}}$$

После преобразования получаем:

$$C_c = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$$

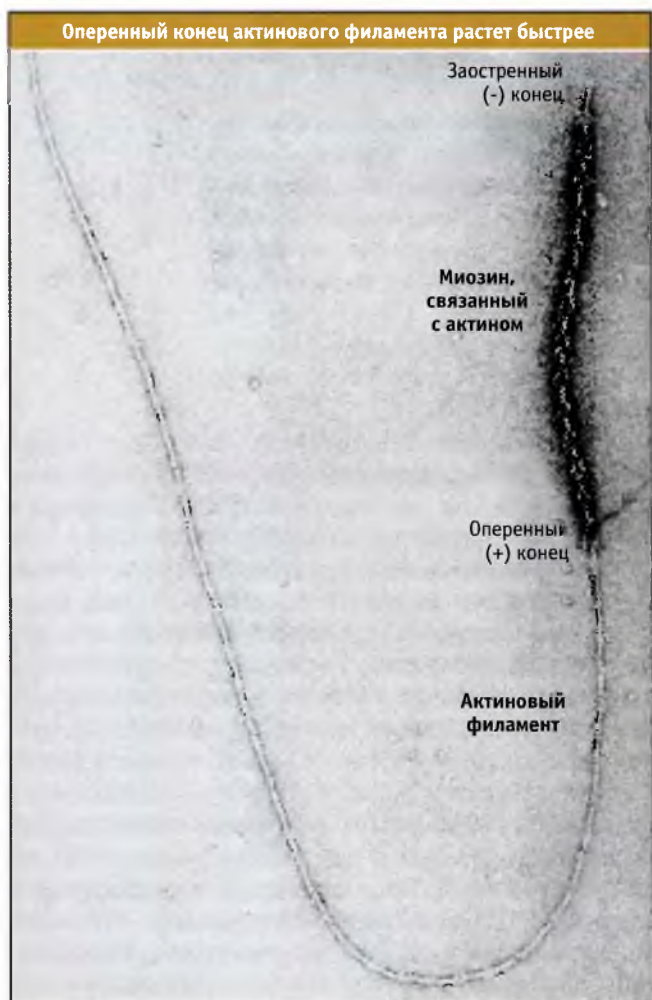
В состоянии равновесия константа диссоциации K_d равняется $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Поэтому критическая концентрация равняется равновесной константе диссоциации для связывания мономерного актина с концом филамента:

$$C_c = K_d$$

Скорость включения мономера в концы филамента неодинакова. Значения констант скорости элонгации

k_{on} и k_{off} (и их отношения, т. е. критическая концентрация) зависят от природы нуклеотида, связанного с актином (этот вопрос подробно рассматривается в следующем разделе). В присутствии АТФ мономерный актин связывается с оперенным концом филамента примерно в десять раз быстрее, чем с заостренным концом. Это подтверждается соответствующим экспериментом (см.

). В этом эксперименте для нуклеации полимеризации актина использовали короткие актиновые филаменты с присоединенным к ним миозином. На фотографии, сделанной в электронном микроскопе после элонгации филамента, видно, что на оперенном конце полимеризовалось гораздо больше актина, чем на заостренном. Поэтому оперенный конец часто обозначают как быстрорастущий (плюс-конец), а заостренный как медленно растущий (минус-конец) конец филамента.



Результаты эксперимента, демонстрирующего, что полимеризация актина, главным образом, происходит на оперенном конце филамента. Для нуклеации процесса элонгации использовали филамент, связанный с актином. Фотография любезно предоставлена Маршаллом Рунге, медицинский факультет Дж. Гопкинса и Томасом Поллардом, Йельский университет

8.6 Актиновые субъединицы гидролизуют АТФ после полимеризации

Основные положения

- Гидролиз АТФ под действием субъединиц актинового филамента носит необратимый характер. Поэтому полимеризация актина является неравновесным процессом
- Значение критической концентрации для сборки актина зависит от того, какой нуклеотид, АТФ или АДФ, связан с мономером
- Критическая концентрация для АТФ-актина ниже, чем для АДФ-актина
- В присутствии АТФ для двух концов актинового филамента существуют две различные критические концентрации

Как описано в предыдущем разделе, процесс спонтанной сборки актина *in vitro* может быть достаточно точно описан с помощью стандартных представлений, основанных на законе действующих масс и кинетике обратимых химических реакций. Однако актиновые субъединицы обладают ферментативной активностью и после включения в филамент гидролизуют связанный АТФ. Это вносит дополнительную сложность в описание процесса сборки актина. Мономерный актин не гидролизует АТФ, однако после полимеризации приобретает такую способность. При этом образуется АДФ и неорганический фосфат (P_i). Процесс гидролиза АТФ является практически необратимым. После гидролиза АДФ и P_i остаются связанными с актином нековалентными связями. Фосфат медленно высвобождается из филамента, однако АДФ остается прочно с ним связанным и не отщепляется в течение всего времени, пока субъединица находится в составе филамента.

Для полимеризации не требуется гидролиз АТФ. Фактически при полимеризации актина между включением субъединиц в филамент и гидролизом АТФ существует некоторый лаг-период (рис. 3.19). Более того, сам АТФ не нужен для полимеризации: АДФ-актиновые

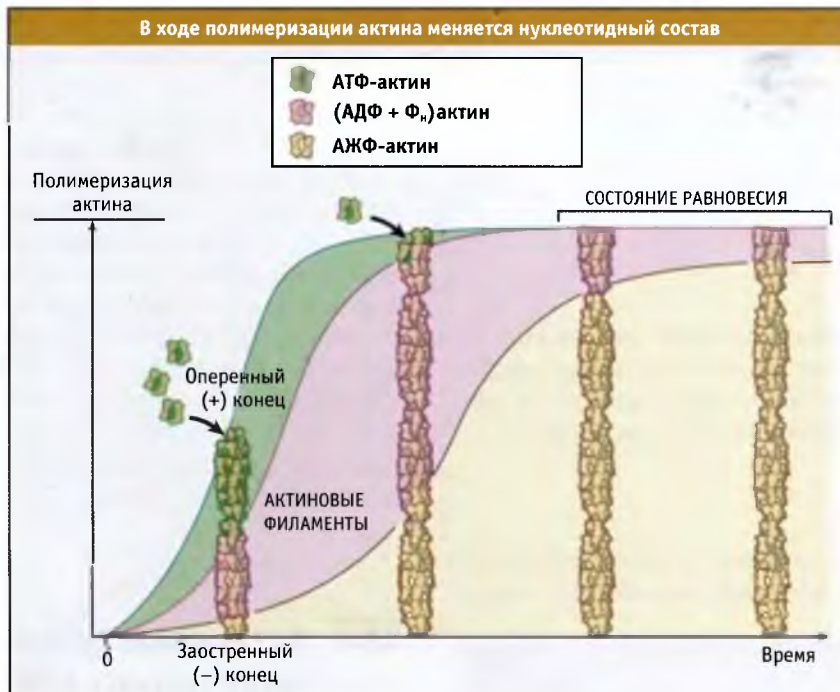


РИС. 8.10 Поскольку в начале фазы элонгации АТФ-актиновые мономеры связаны с оперенным концом, актиновые субъединицы содержат АТФ или, после гидролиза, АДФ и F_n . По мере прохождения элонгации и истощения пула свободного мономера, процесс замедляется сильнее, чем гидролиз АТФ. Таким образом, в состоянии равновесия актиновые филаменты содержат АДФ-актин, за исключением тех, на оперенном конце которых находится АДФ и F_n . По данным M.F. Cartier, *J. Biol. Chem.* 1991. 266: 1–4. © 1991 by American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

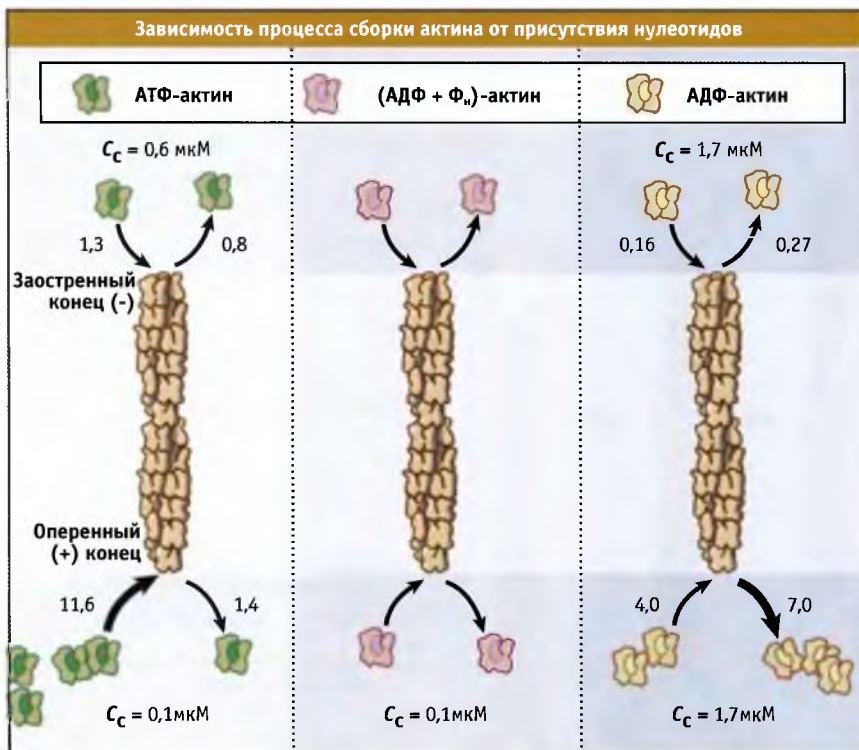
мономеры способны сами собираться в филаменты. Однако гидролиз АТФ необходим для регуляции функций актина в клетке (см. 8.8 Белки, связывающиеся с актиновыми мономерами, влияют на их полимеризацию и 8.9 Полимеризация актина в клетке контролируется белками нуклеации).

Как следует из РИС. 8.11, критическая концентрация для процесса сборки актина зависит от природы связанного нуклеотида (АТФ, АДФ- F_n или АДФ). Значение критической концентрации определяется концентрацией мономерного актина, необходимой для образования филаментов и рассчитывается из значений k_{off} и k_{on} , которые определяются в системе *in vitro*. На оперенном конце филамента критическая концентрация АТФ-актина (~0,1 мкМ) оказывается ниже, чем АДФ-актина (1,7 мкМ). Это означает, что очищенные АТФ-актиновые мономеры будут полимеризоваться в филаменты до тех пор, пока их концентрация не достигнет ~0,1 мкМ. Аналогичным образом, АДФ-актин будет полимеризоваться до тех пор, пока его концентрация не достигнет 1,9 мкМ. Критическая концентрация АДФ- F_n актина на оперенном конце (0,1 мкМ) сопоставима с концентрацией АТФ-актина. Поскольку $C_c = K_d$, эти значения указывают, что при высвобождении F_n происходят изменения в прочности связывания терминальной субъедини-

цы. Иными словами, энергия гидролиза АТФ запасается в филаменте до высвобождения F_n , после чего терминальные субъединицы (уже содержащие АДФ) оказываются связанными с филаментом более слабой связью.

Для актиновых филаментов, содержащих АДФ-актин, критическая концентрация АДФ-актиновых мономеров на обоих концах филамента примерно одна и та же (~2 мкМ). Это связано с тем, что субъединицы в филаменте и стабилизирующие контакты между ними одинаковы. Однако в присутствии АТФ критическая концентрация на оперенном конце (0,1 мкМ) оказывается ниже, чем на заостренном (0,7 мкМ). Это объясняется тем, что актиновые субъединицы на оперенном конце содержат АТФ (или АДФ- F_n), а на заостренном конце связанный АДФ (см. рис. 8.10). Такая химическая поляризация филамента обусловлена быстрым добавлением АТФ-мономеров к оперенному концу, что приводит к образованию «кэпа из АТФ». На заостренном конце добавление мономера происходит медленнее, так что гидролиз АТФ и высвобождение фосфата происходят быстрее, чем добавление АТФ-актиновых мономеров (если полимеризация не происходит очень быстро).

Когда пул актиновых мономеров представлен АТФ-актином (что характерно для клеток), критическая концентрация для всего филамента (т. е. равновесная



In vitro в состоянии равновесия критическая концентрация (C_c) для АТФ-актина или АДФ + F_{42} -актина на оперенном конце филамента оказывается ниже, чем на заостренном конце, в то время как значения C_c для АДФ-актина на обоих концах филамента остаются одинаковыми. Также представлены значения констант скорости для процессов ассоциации и диссоциации мономеров актина, $k_{\text{он}}$ и $k_{\text{оф}}$ соответственно, которые используются для расчета C_c . По данным оригинала, любезно предоставленного Энрике М. Де Ла Круз, Йельский университет. Воспроизведено с разрешения Э. М. Де Ла Круз и Е. Д. Поллард. 2001. *Science*. 293: 616–618. © AAAS

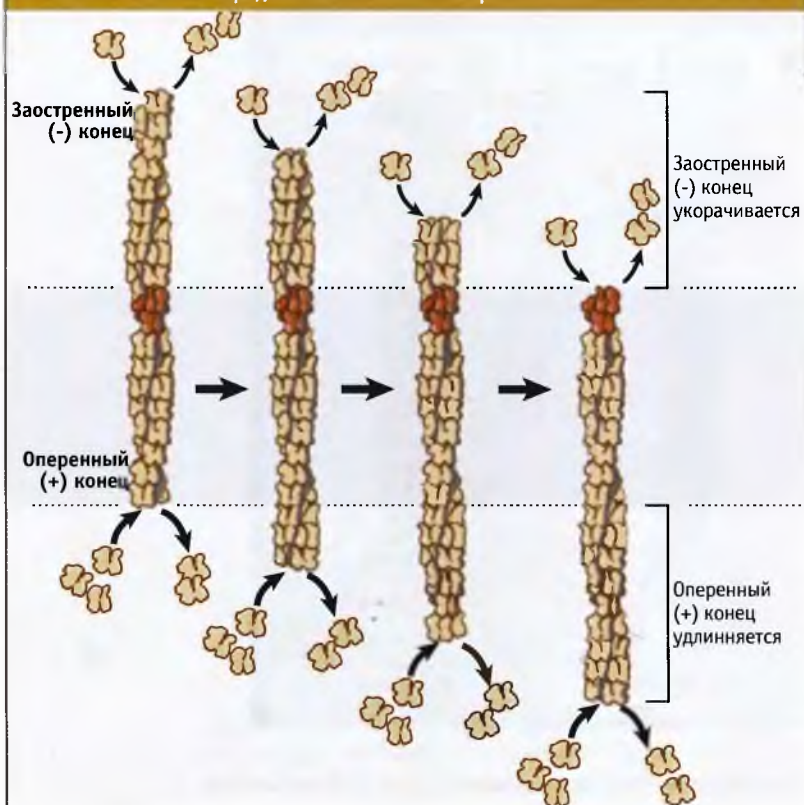
концентрация актинового мономера) лежит между критическими концентрациями для двух концов: выше, чем для оперенного, и ниже, чем для заостренного конца (см. рис. 8.11). Следовательно, в состоянии равновесия актиновые мономеры (в виде АТФ-актина) связаны с оперенным концом и после гидролиза АТФ и высвобождения F_{42} отщепляются от заостренного конца в виде АДФ-актина. Процесс полимеризации-деполимеризации обуславливают постоянный поток субъединиц через филаменты, что не сопровождается изменениями общей концентрации полимера или мономера. Этот поток называется **тредмиллингом** (крутоворот мономеров) и представлен на рис. 8.12. В клетках не происходит нерегулируемый тредмиллинг; скорее всего, процесс контролируется белками, связывающимися с актином.

В экспериментальных условиях, когда филаменты собираются из актиновых мономеров, содержащих АДФ, тредмиллинг не происходит, поскольку критическая концентрация на обоих концах филамента одинакова (см. рис. 8.11). Таким образом, актиновые субъединицы, отщепляющиеся от заостренного конца, должны обменивать связанный АДФ на АТФ, чтобы присоединиться к оперенному концу. Энергия гидролиза АТФ используется не для самого процесса полимеризации, а для обеспе-

чения сборки и разборки актина и направленного движения мономеров по филаментам.

Тредмиллинг происходит только в том случае, когда концентрация актиновых мономеров находится между значениями критических концентраций на концах филамента. Если концентрация мономера на оперенном и заостренном концах оказывается выше критической, то происходит элонгация филаментов с обоих концов. Филаменты диссоциируют с обоих концов, когда концентрация мономера становится ниже критической. При концентрации мономера, занимающей промежуточное положение между критическими концентрациями на концах, мономеры добавляются к оперенным концам и отщепляются от заостренных. Таким образом, становится понятным, что если в клетке осуществляется контроль над концентрацией актиновых мономеров и критической концентрацией на обоих концах, то можно регулировать полноту, скорость и локализацию процессов полимеризации и диссоциации. Этот вопрос подробно обсуждается в следующем разделе.

Механизм полимеризации актиновых филаментов и микротрубочек имеет ряд общих черт. Прежде всего в результате обоих процессов собираются полярные структуры, и процесс элонгации сопряжен с гидролизом



В состоянии равновесия в актиновых филаментах происходит тредмиллинг, при котором АТФ-актиновые мономеры быстрее присоединяются к оперенному концу, а АДФ-актиновые мономеры быстрее диссоциируют от заостренного конца. При этом длина филамента не изменяется

нуклеотидов. Для микротрубочек характерна динамическая нестабильность, при которой происходит быстрая полимеризация и диссоциация филаментов. Однако для актиновых филаментов нехарактерно существование фазы (фаза катастрофы), при которой происходит быстрая разборка филаментов. Это различие между актиновыми филаментами и микротрубочками обусловлено тем, что по сравнению с тубулином мономерный актин отщепляется от филамента в ~100 раз медленнее (подробнее о динамической нестабильности см. 7.5 Сборка и разборка микротрубочек происходят в ходе специфического процесса, который называется динамическая нестабильность).

8.7 Белки, связывающиеся с актином, регулируют его полимеризацию и организацию филаментов

Основные положения

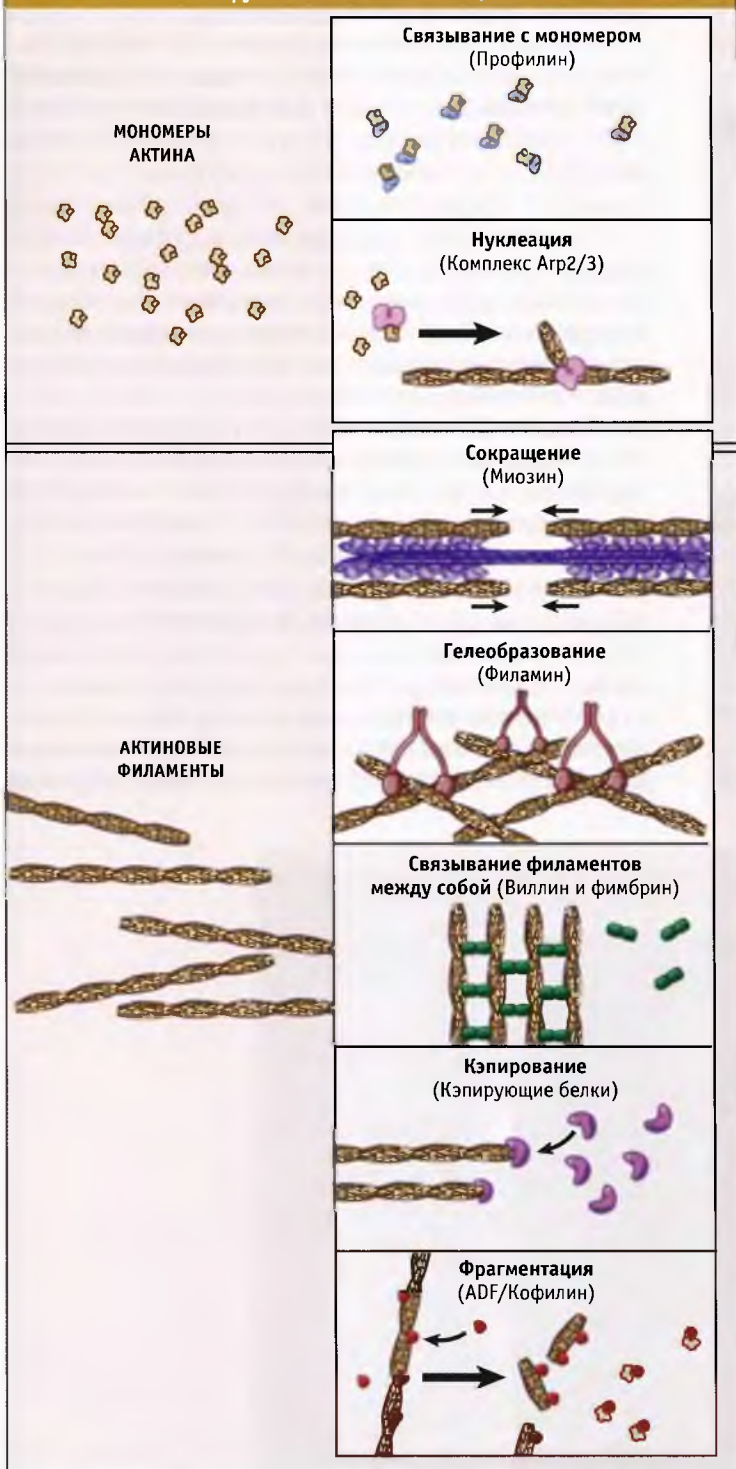
- Для того чтобы актиновый цитоскелет обеспечивал подвижность, клетка должна быть способной регулировать процесс полимеризации и деполимеризации актина
- На организацию актиновых филаментов в клетке влияют белки, связывающиеся с актином, которые ассоциированы с мономерами или с филаментами

В ответ на сигналы внешней среды, которые стимулируют деление, дифференцировку или подвижность клеток, происходит перестройка цитоскелета. Для того чтобы контролировать процесс перестройки, клетка должна быстро собирать и разбирать актиновые филаменты. Для обеспечения подвижности и изменения формы клеток с участием актинового цитоскелета должны существовать следующие механизмы:

- ингибирование спонтанной полимеризации пула мономеров актина;
- быстрая нуклеация новых актиновых филаментов;
- контроль над длиной актиновых филаментов;
- элонгация предсуществующих актиновых филаментов.

Эти механизмы реализуются с участием белков, связывающихся с актином, функционирование многих из которых регулируется системой внутриклеточных сигналов.

Сборка и трехмерная организация актиновых филаментов в клетках обеспечиваются большим количеством регуляторных белков, которые преимущественно связываются с мономерным актином или с филаментами. Некоторые из этих белков схематически изображены на рисунке. Белки, которые связываются с актиновыми мономерами, влияют на их способность связываться с нуклеотидами, позволяют поддерживать пул мономеров актина и индуцируют сборку филаментов в одном на-



В клетках динамика полимеризации актина и организация филаментов регулируются белками, связывающимися с актином. Одни белки взаимодействуют с актиновыми мономерами, другие — с филаментами

правлении. Белки, связывающиеся с филаментами, могут стабилизировать нуклеусы и филаменты, разрезать их, кэпировать концы или организовывать филаменты в пучки и сети. Взаимодействие с другими белками определяет функции актина и позволяет ему участвовать в разнообразных клеточных процессах. В последующих

разделах мы рассмотрим разные типы белков, способных связываться с актином, после чего в специальном разделе опишем механизмы совместного их функционирования (см. 8.13 *Подвижность клеток обеспечивается совместным функционированием актина и взаимодействующих с ним белков*).

8.8 Белки, связывающиеся с актиновыми мономерами, влияют на их полимеризацию

Основные положения

- Во многих эукариотических клетках присутствуют два белка, которые связываются с мономерным актином. Это тимозин β_4 и профилин.
- В клетках *Metazoa* тимозин β_4 изолирует актиновые мономеры и поддерживает цитозольный пул АТФ-актина, который может быть использован для быстрой элонгации филаментов.
- Комплексы профилина с актиновыми мономерами способствуют элонгации только оперенных концов филаментов.

В клетках поддерживается пул мономерного актина, который может быть использован для быстрой элонгации, когда внешний сигнал определяет время и место запуска процесса роста филаментов. Скорость элонгации актинового филамента зависит от концентрации актиновых мономеров, доступных для полимеризации (см. рис. 8.7). Для того чтобы осуществить быструю элонгацию в соответствующей клетке шкале времени, концентрация актиновых мономеров, доступных для полимеризации, должна быть гораздо выше критической. Белки, которые

связываются с актиновыми мономерами, способствуют регуляции скорости роста филаментов.

В клетках *Metazoa* присутствуют два наиболее распространенных белка, которые связываются с **мономерами актина**. Это тимозин β_4 и профилин. Тимозин β_4 обнаружен только у высших эукариот и, главным образом, находится в высокоподвижных и способных к фагоцитозу клетках. Профилин найден в большинстве эукариот, включая клетки растений, животных и дрожжей. Концентрация этих белков сопоставима с клеточной концентрацией актина. Хотя оба белка связывают актиновые мономеры, тимозин β_4 и профилин по-разному регулируют полимеризацию актина, и оба играют критическую роль в физиологических процессах.

Тимозин β_4 представляет собой небольшой пептид ($M_r < 5$ кДа). Он принадлежит к семейству белков, связывающихся с актиновым мономером, и образующих с ним комплекс в соотношении 1:1. Эти белки обладают консервативной первичной структурой. Тимозин β_4 ингибирует спонтанную полимеризацию актиновых мономеров и предотвращает добавление мономеров к существующим филаментам. Хотя белок представляет собой небольшой пептид, считается, что он связывается с протяженным участком поверхности мономера актина, стерически блокируя много областей, необходимых для образования важных контактов, стабилизирующих

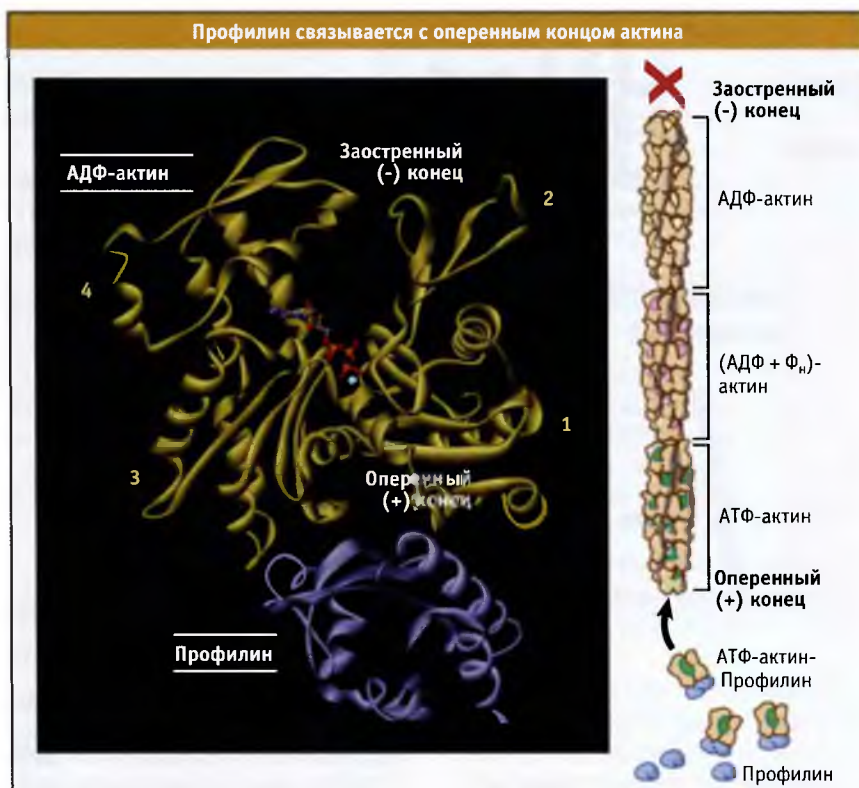


Рис. 8.8 Профилин связывается с оперенным концом актиновых мономеров и обеспечивает регуляцию полимеризации актина за счет включения мономера только со стороны оперенного конца. Модель атомной структуры комплекса профилин-актин построена на основании данных из Protein Data Bank file 2BTF

филаменты. В клетках, обладающих повышенной подвижностью, таких как нейтрофилы, концентрация тимозина β_4 может достигать нескольких сотен микромоль. Это позволяет таким клеткам поддерживать большой цитоплазматический пул мономера актина. Тимозин β_4 связывается с более высоким сродством с АТФ-актиновыми ($K_d \sim 2$ мкМ), чем с АДФ-актиновыми мономерами ($K_d \sim 50$ мкМ). Поэтому пул неполимерного актина в клетках состоит, главным образом, из АТФ-актина.

Профилин также является небольшим ($M_r \sim 15$ кДа) белком, способным связываться с мономерным актином, образуя комплексы в соотношении 1:1. Однако, в отличие от тимозина β_4 , эти комплексы могут связываться с оперенными концами актиновых филаментов. При связывании комплекса с оперенным концом профилин диссоциирует и в дальнейшем может связать другой мономер актина.

Показывает, что поскольку профилин связывает мономеры актина по субдомам 1 и 3, в его присутствии блокируется связывание мономера с заостренным концом филамента. Таким образом, комплекс профилин-актин способствует элонгации исключительно на оперенном конце филамента.

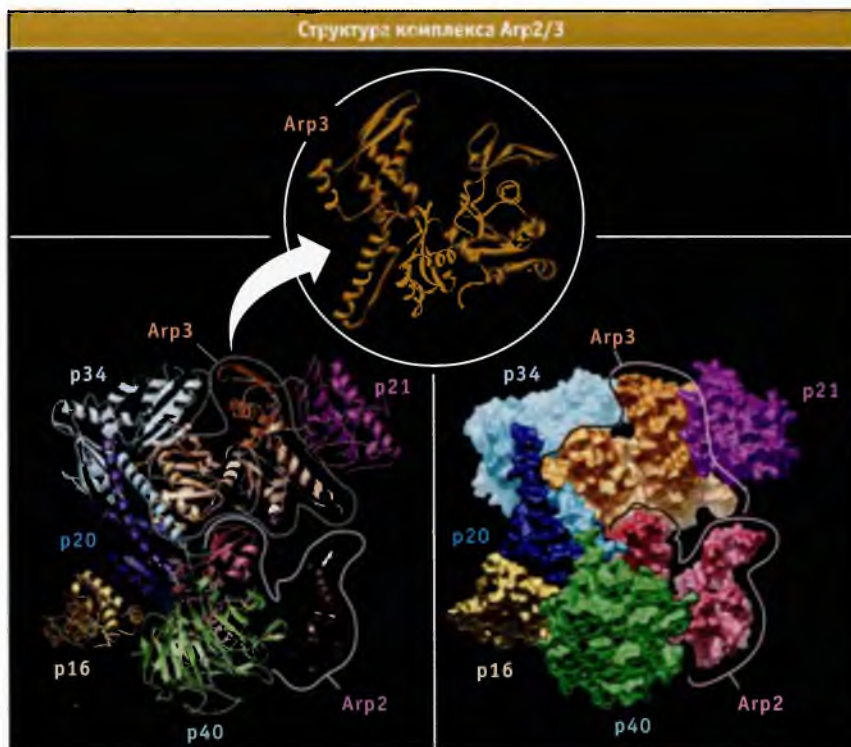
Еще одно ключевое свойство профилина — это его способность обменивать нуклеотид, связанный с мономерным актином. Поскольку, внутриклеточная концентрация АТФ гораздо выше, чем АДФ, присутствие профилина

позволяет мономеру актина быстро вступать в равновесие с цитоплазматическим АТФ и превращать АДФ-актиновые мономеры в АТФ-актиновые. Это способствует поддержанию большого пула АТФ-актиновых мономеров, необходимых для быстрого роста филаментов (подробнее о роли тимозина β_4 и профилина в перестройке актина в клетке см. 8.13 *Подвижность клеток обеспечивается совместным функционированием актина и взаимодействующих с ним белков*).

8.9 Полимеризация актина в клетке контролируется белками нуклеации

Основные положения

- Белки нуклеации позволяют клетке контролировать время и место образования филаментов *de novo*
- *In vivo* нуклеация филаментов происходит с участием комплекса Arp2/3 и форминов
- При нуклеации с участием Arp2/3 образуется разветвленная сеть филаментов, а форминовые белки инициируют неразветвленные филаменты
- Arp2/3 активируется на клеточной мембране при действии белков Scar, WASP и WAVE



Кристаллическая структура белкового комплекса Arp2/3. Представлена третичная структура каждой субъединицы (слева) или ее объемная модель (справа). Белки Arp2 и Arp3 по структуре близки к актину. Структура Arp3 построена по данным из Protein Data Bank file 1KBK. Модель структуры комплекса Arp2/3 с входящим в его состав белком Arp2, любезно предоставлена Томасом Д. Поллардом, Иельский университет. Воспроизведено с разрешения из Robinson R. C., et al. 2001. *Science*. 294: 1679–1684. © 2001 AAAS

Нуклеация является наиболее медленным этапом образования нового актинового филамента *in vitro* (см. рис. 8.6) и важнейшим средством контроля за регуляцией полимеризации клеточного актина. Для быстрой пространственно регулируемой полимеризации нового актинового филамента этап нуклеации необходимо ускорить. Белки, которые облегчают образование филаментов *de novo*, называются белками нуклеации. Комплекс Arp2/3 и формины хорошо охарактеризованы и представляют собой два типа белков нуклеации актиновых филаментов, играющих важную роль в регуляции подвижности клеток. Эти белки нуклеируют филаменты по разным механизмам и способствуют образованию в клетке различных типов сети филаментов.

По данным рентгеноструктурного анализа, Arp2/3 представляет собой макромолекулярный белковый комплекс, состоящий из Arp2, Arp3 и пяти дополнительных белков (рис. 8.15). Arp2 и Arp3 напоминают актин. Хотя по структуре эти белки близки к актину (см. рис. 8.2), они не могут полимеризоваться с образованием филаментов. Предполагается, что Arp2 и Arp3 связываются в комплекс таким образом, что он становится похож на стабильный димер актина с открытым оперенным концом. Это помогает стабильному нуклеусу образоваться в момент, когда актиновый мономер связывается с комплексом. По мере элонгации нового филамента на опе-

ренном конце, комплекс Arp2/3 остается связанным с заостренным концом.

Способность комплекса Arp2/3 к нуклеации усиливается при его взаимодействии с регуляторными белками и с боковыми поверхностями предсуществующих актиновых филаментов. Нуклеация может происходить на плазматической мембране (см. рис. 8.22). Новообразованные «дочерние» филаменты растут в направлении оперенного конца, подобно веткам располагаясь под углом 70° по бокам предсуществующих «материнских» филаментов. Как следует из экспериментов *in vitro*, способность комплекса Arp2/3 к связыванию с боковыми поверхностями филаментов приводит к образованию разветвленной сети актиновых фибрилл, напоминающую ту, которая наблюдается на быстрорастущих краях подвижных клеток (см. ламеллоподии на рис. 8.1). Комплекс Arp2/3 связывается более прочно с филаментами тех субъединиц, которые содержат АТФ или АДФ- Φ_{II} («молодые» филаменты), чем с субъединицами, содержащими АДФ («старые» филаменты) (см. 8.6 *Актиновые субъединицы гидролизуют АТФ после полимеризации*). Поэтому Arp2/3 преимущественно связывается с молодыми филаментами и образует на них ветвящиеся структуры. После высвобождения Φ_{II} и старения филамента Arp2/3 отщепляется. Это приводит к диссоциации боковых ветвей и к разборке актиновой сети.

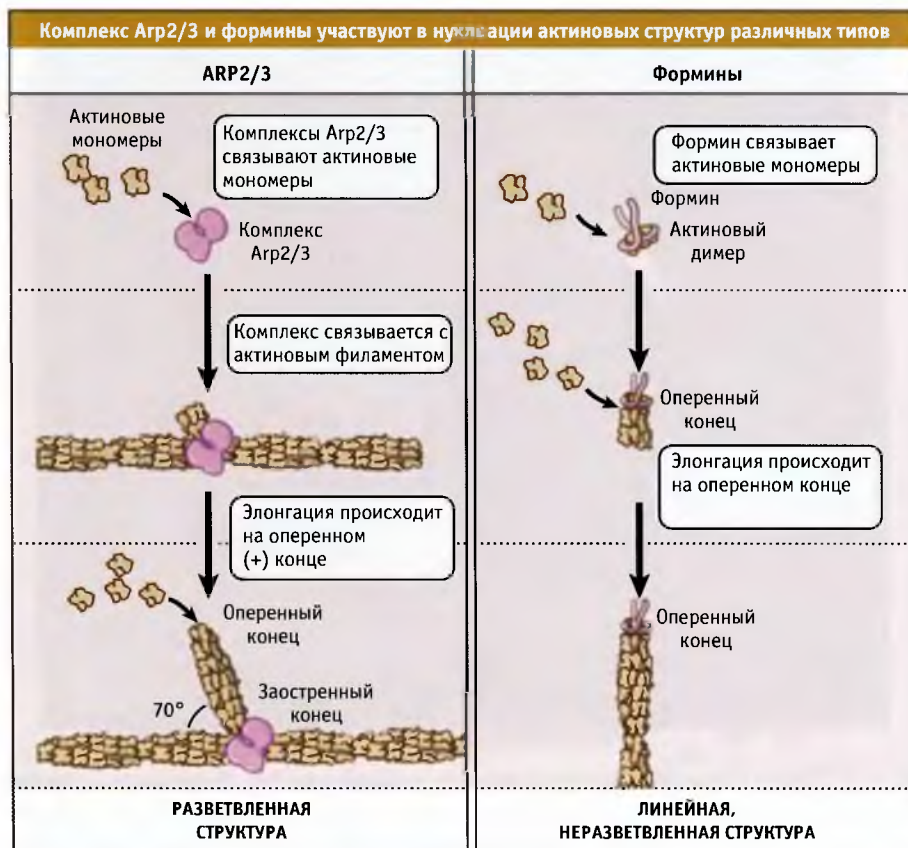


Рис. 8.10. Комплекс Arp2/3 обеспечивает нуклеацию разветвленных актиновых структур, в то время как формины участвуют в нуклеации неразветвленных, линейных актиновых образований

Посредством нескольких белков, система передачи сигнала активирует комплекс Arp2/3 на мембранах. Активация Arp2/3 имеет важное значение для роли, которую играет актин в протрузии мембран (см. 8.13 *Подвижность клеток обеспечивается совместным функционированием актина и взаимодействующих с ним белков*). Эти белки активируются малыми G-белками и включают Scar (супрессор рецептора цАМФ), WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) и WAVE (WASP-verprolin homologs). Вместе с существующими актиновыми филаментами они обеспечивают активацию комплекса Arp2/3.

Формины относятся к семейству структурно близких белков. Своим названием они обязаны мышинному гену, *limb deformity*. Эти белки содержат два уникальных гомологичных домена, которые называются формин гомологичный-1 и -2 (FH1 и FH2). Домен FH1 связывает профилин, а FH2 участвует в процессе нуклеации полимеризации актина. Формины характеризуются рядом примечательных особенностей: в ходе элонгации оперенного конца филамента они остаются связанными с ним; защищают его от кэпирующих белков при элонгации и увеличивают ее скорость за счет прямой ассоциации с профилином.

Механизм нуклеации и элонгации с участием формина отличается от механизма действия комплекса Arp2/3, который при элонгации остается на заостренном конце филамента. Поскольку, в отличие от разветвленной сети актина, создаваемой комплексом Arp2/3, формины нуклеируют образование актиновых филаментов, не связываясь с боковыми поверхностями уже существующих, они регулируют сборку неразветвленных филаментов ().

8.10 Длина актиновых филаментов регулируется кэпирующими белками

Основные положения

- Кэпирующие белки ингибируют элонгацию актиновых филаментов
- Кэпирующие белки функционируют как на оперенных, так и на заостренных концах актиновых филаментов
- Кэпирующие белки и белки семейства гельзолин подавляют элонгацию оперенных концов; в свою очередь, эта их способность ингибируется фосфолипидами плазматической мембраны
- Тропомодулин представляет собой белок, который кэпирует заостренный конец актинового филамента

In vitro, при нерегулируемом росте, актиновые филаменты быстро и непрерывно растут до тех пор, пока концентрация свободного мономера не достигнет критического уровня (см. рис. 8.6 и рис. 8.7). В клетке существуют специальные механизмы, которые контролируют количество свободных оперенных концов филаментов. Такой контроль необходим для предо-

твращения истощения пула мономерного актина и для регулировки размера специфических актиновых структур. Поскольку короткие актиновые филаменты обладают большей жесткостью, чем длинные, регуляция их размеров контролирует механические свойства актиновой сети. Белки, которые связываются с концами актиновых филаментов и предотвращают дальнейшую полимеризацию мономеров, называются **кэпирующими белками**. Некоторые кэпирующие белки связывают оперенные концы, в то время как другие ассоциируют с заостренными концами. Белки, образующие кэп на оперенном конце, ограничивают длину филамента, поскольку препятствуют элонгации. Белки, кэпирующие заостренный конец, предотвращают деполимеризацию актина.

К белкам, образующим кэп на оперенном конце, относятся CapZ, EPS8 и представители семейства гельзолин. Хотя кэпирующие и гельзолин-белки различаются по структуре и механизму действия, они связываются с оперенными концами филаментов и делают невозможным дальнейшее добавление мономеров. Эти белки обладают высоким сродством к оперенным концам филаментов и препятствуют добавлению актиновых субъединиц даже при высокой концентрации мономеров (подробнее о CapZ см. 8.21 *Миозин II участвует в мышечном сокращении*).

Свойства белков и кэпирующих белков гельзолина регулируются фосфолипидами плазматической мембраны. Фосфолипид фосфатидилинозитол 4,5-дифосфат (PIP₂) разрушает связь между обоими типами кэпирующих белков и оперенными концами актиновых филаментов. Поэтому они обеспечивают декэпирование филаментов или предотвращают их кэпирование на плазматической мембране. Фосфолипид PIP₂ расположен во внутреннем слое плазматической мембраны и участвует во внутриклеточной системе передачи сигналов. Уровень PIP₂ меняется в зависимости от сигнала, поступающего с поверхностных рецепторов клетки, сопряженных с одним из G-белков. Путем регуляции кэпирования на клеточной мембране можно контролировать элонгацию филаментов. Этот процесс является ключевым в миграции клеток и протрузии мембран (см. 8.13 *Подвижность клеток обеспечивается совместным функционированием актина и взаимодействующих с ним белков*). Уровень активности кэпирующих белков может влиять на тип протрузии (ламеллоподии или филоподии) (подробнее о PIP₂ см 14 *Функционирование внутриклеточных систем передачи сигналов*).

Тропомодулины представляют собой семейство широко распространенных кэпирующих белков, которые в присутствии регуляторного актинового белка тропомиозина обладают высоким сродством к заостренным концам актиновых филаментов. Тропомодулины контролируют длину актиновых филаментов волокон поперечно-полосатых мышц (см. 8.21 *Миозин II участвует в мышечном сокращении*). Они также регулируют длину актиновых филаментов и динамику их сборки в эритроцитах и эпителиальных клетках.

8.11 Динамика актиновых филаментов регулируется с помощью разрезающих и деполимеризующих белков

Основные положения

- Для поддержания пула растворимых мономеров актиновые филаменты должны диссоциировать
- Филаменты разрезаются и деполимеризуются при участии семейства белков ADF/кофилин
- При разрезании увеличивается количество концов филаментов, доступных для сборки и диссоциации
- Белки семейства ADF/кофилин кооперативно связываются с актиновыми филаментами, изменяя степень из скручивания
- Актиновые филаменты с присоединенным АДФ являются мишенями для белков семейства ADF/кофилин

Для быстрого пополнения растворимого пула актиновых мономеров в клетке полимеризованные актиновые филаменты должны диссоциировать. Хотя для поддержания пула мономера актина также необходим синтез белка *de novo*, он представляет собой слишком медленный процесс для быстрого перестройки актинового цитоскелета. Представители семейства кофилин/актиндеполимеризующий фактор (ADF) проявляют регуляторные свойства, связываясь с актиновыми фила-

ментами и ускоряя их деполимеризацию двумя путями: увеличивая скорость диссоциации субъединиц с концов филамента, и фрагментируя (разрезая) его. В последнем случае также увеличивается общее количество концов филамента доступных для элонгации. Связывание кофилина/ADF белков с актиновыми филаментами носит кооперативный характер, что позволяет этим белкам даже в небольшой концентрации проявлять максимальную эффективность.

Исследование нативных и покрытых колифином филаментов в электронном микроскопе показывает, что кофилин увеличивает степень их спирального скручивания (Bamburg, 1997). Вероятно, изменения скручивания обеспечивают кооперативность связывания кофилина, при котором развиваются физические усилия, способствующие диссоциации субъединиц и разрезанию филаментов за счет разрушения стабилизирующих продольных и латеральных контактов между актиновыми субъединицами. Механизм, посредством которого кофилин/ADF белки осуществляют разрезание филамента, пока не выяснен.

Связывание кофилина/ADF с актиновыми филаментами, главным образом, зависит от природы нуклеотида, связанного с субъединицами актина. При этом филаменты, содержащие связанный АДФ, избирательно узнаются кофилин/ADF белками и фрагментируются. Сродство этих белков к филаментам со связанным АДФ-Ф_i оказывается настолько слабым, что они становятся устойчивыми к фрагментации. Преимущественное связывание белков с АДФ-актином гарантирует отсутствие диссоциации новообразованных филаментов, содержащих АТФ- и АДФ-Ф_i-актин, и преимущественную атакуемость АДФ-актиновых субъединиц. Таким образом, в ответ на сигнал внешней среды, по мере перестройки цитоскелета, происходит преимущественная диссоциация более старых актиновых филаментов.

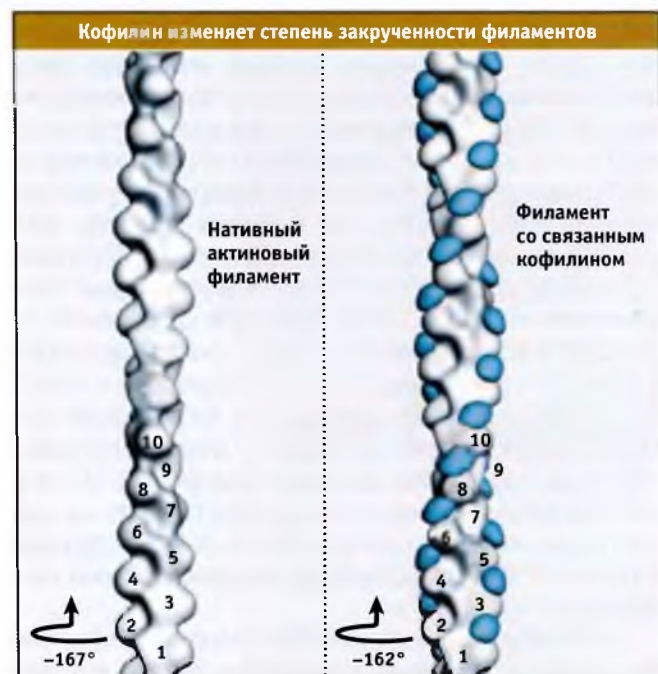


Рис. 8.17. Связывание множества молекул кофилина с актиновыми филаментами увеличивает степень закрученности спирали, что дестабилизирует связи между субъединицами и приводит к разрушению филамента. По данным *Trends Cell. Bio.*, vol. 364, Bamburg, J. R., McCough, A. and Ono, S. *Putting a new twist on actin...* pp. 364–370. © 1999 с разрешения Elsevier. Фотография любезно предоставлена Джеймсом Бамбургом, Университет Колорадо

8.12 Сшивающие белки организуют актиновые филаменты в пучки и ортогональные сети

Основные положения

- Сшивающие белки соединяют между собой актиновые филаменты, образуя пучки и ортогональную сеть
- Актиновые пучки и разветвленные структуры очень устойчивы к механическим усилиям
- Белки, сшивающие актин, обладают двумя сайтами связывания актиновых филаментов
- Актиновые пучки способствуют образованию стереоцилий и филоподий
- Ортогональные актиновые сети образуют плоские выросты мембраны (ламеллы) и гелеобразные структуры

Для того чтобы актиновые филаменты могли определять форму и подвижность клеток, они должны быть организованы в упорядоченный комплекс более высо-

координированных структур. В клетке существуют два основных типа актиновых структур — **пучки** и **структурная сеть**. Актиновые филаменты в пучках располагаются параллельно, а филаменты в сети переплетены и расположены перпендикулярно (ортогонально) по отношению к друг другу (см. ламеллоподии, рис. 8.1). Оба типа структур обеспечивают прочность клетки и по мере роста вызывают смещение мембраны вперед. В цитоплазме клетки актиновые структуры могут занимать довольно большие области.

Пучки и структурная сеть образуются при взаимодействии актиновых филаментов с белками, образующими поперечные сшивки. В различных клетках могут экспрессироваться различные сшивающие белки. Эти белки взаимодействуют сразу с двумя актиновыми филаментами и поэтому должны иметь для них два сайта связывания (*). В некоторых случаях фосфори-

лирование сшивающих белков блокирует связывание актина и образование структурной сети.

Как показано на рис. 8.18, сшивающие белки можно подразделить на три группы. Некоторые из них принадлежат к семейству, для которого характерно наличие доменов связывания с актином (ABD). Это белки III группы, которая включает фимбрин, α -актинин, спектрин, филламин и ABP120, обладающие ABD (27 кДа), состоящим из двух α -спирализованных доменов, гомологичных кальпонину. Большинство белков семейства ABD образуют гомо- или гетеродимеры, так что каждая молекула обладает двумя ABD и может сшивать два разных филамента. Как показано на рис. 8.19, тип актиновой структуры зависит от геометрической организации и расположения доменов. Например, в фимбриновом мономере два ABD расположены рядом, что позволяет белку образовывать плотно упакованные актиновые пучки, как в микровор-

Белки, сшивающие актиновые филаменты			
ГРУППА	БЕЛОК	МОЛ. МАССА (кДа)	ЛОКАЛИЗАЦИЯ
I	Фасцин	55	<ul style="list-style-type: none"> • Акросомальный выступ • Филоподии • Ламеллоподии • Микроворсинки • Стресс-фибриллы
	Скруин	102	<ul style="list-style-type: none"> • Акросомальный вырост
II	Виллин	92	<ul style="list-style-type: none"> • Микроворсинки кишечника и почек щеточной каемки
III Подгруппа с гомологичными доменами кальпонинового типа	Фимбрин	68	<ul style="list-style-type: none"> • Адгезивный контакт • Микроворсинки • Стереоцилии • Актиновые шнуры дрожжей
	Дистрофин	427	<ul style="list-style-type: none"> • Кортикальная сеть мышц
	ABP120 (димер)	92	<ul style="list-style-type: none"> • Псевдоподии
	α -актинин (димер)	102	<ul style="list-style-type: none"> • Адгезивный контакт • Филоподии • Ламеллоподии • Стресс-фибриллы
	Филламин (димер)	280	<ul style="list-style-type: none"> • Филоподии • Псевдоподии
	Спектрин (тетрамер)	α 280 β 246–275	<ul style="list-style-type: none"> • Кортикальные сети

РИС. 8.18. Сшивающие белки, которые принимают участие в организации актиновых филаментов в структуры, обладают модульным строением и содержат домены связывания с актином, разделенные спейсерными участками разной величины. В зависимости от природы актин-связывающих доменов (ABD), эти белки подразделяются на три группы. Белки I группы содержат уникальные ABD. Виллин, белок II группы, характеризуется ABD размером около 7 кДа. Белки, принадлежащие к группе III, обладают гомологичными доменами кальпонинового типа (около 26 кДа каждый). Эти домены характерны для многих различных белков, связывающихся с актином

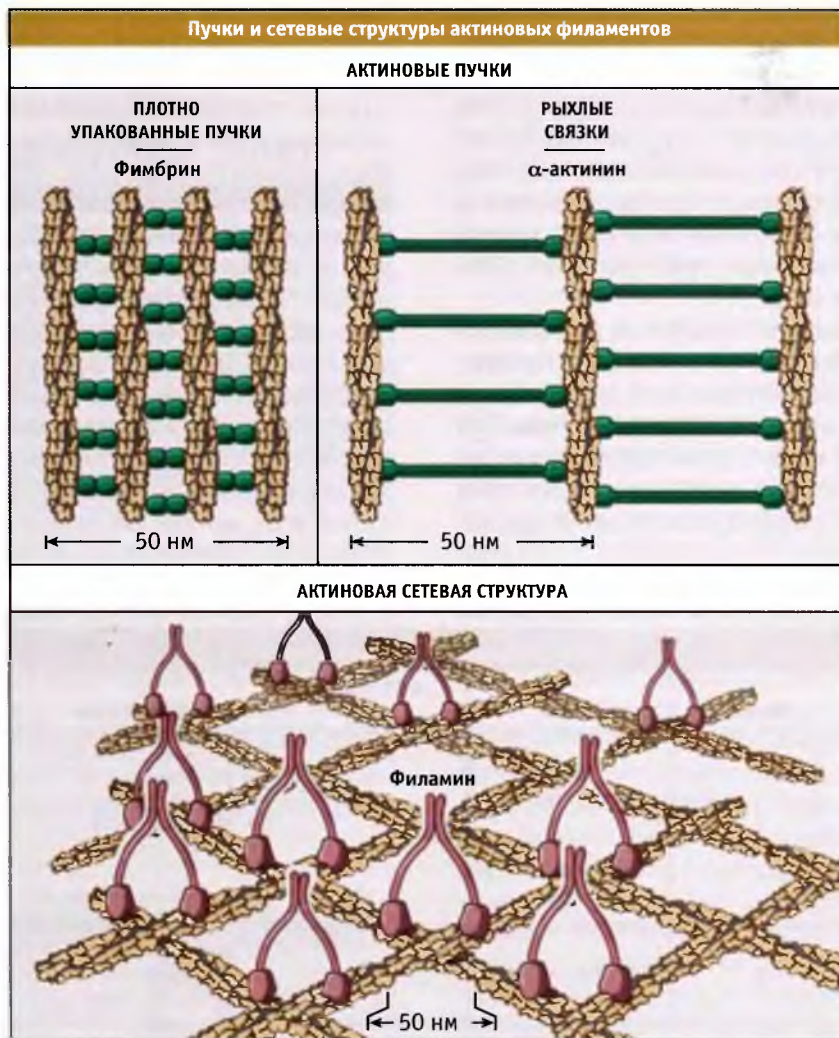


Рис. 8.19 Сшивающие белки взаимодействуют с актиновыми филаментами с образованием структур двух типов: пучков параллельно расположенных филаментов и сетевых структур

синках. Напротив, в димерах α -актина, филлина, спектрина и дистрофина ABD разделены протяженными спейсерными участками, и эти белки образуют рыхлые актиновые пучки и структурные сети.

К белкам, сшивающим актиновые филаменты, но отличающимся от ABD белков, относятся фасцин и виллин из групп I и II соответственно (см. рис. 8.18). Фасцин организует филаменты в плотно упакованные пучки (); эти пучки формируют филоподии, которые присутствуют в конусе роста мигрирующих нейронов (рис. 8.1). Виллин находится в микроворсинках некоторых эпителиальных клеток (рис. 8.1). В виллине, так же как и в фимбрине, домены связывания с актином расположены близко друг к другу, и оба белка образуют поперечные шивки между актиновыми филаментами в микроворсинках.



Рис. 8.20 Трансмиссионная электронная микрофотография пучка актиновых филаментов, связанных с помощью фасцина. Reproduced from *The Journal of Cell Biology*, 1994, vol. 125, pp. 369–380, by copyright permission of The Rockefeller University Press. Photo courtesy of Lynn Cooley, Yale University Medical School

8.13 **Подвижность клеток обеспечивается совместным функционированием актина и взаимодействующих с ним белков**

Основные положения

- Рост и организация структур клеточных отростков регулируются взаимодействием между актином и белками, взаимодействующими с его мономерами и филаментами
- При добавлении актиновых мономеров к оперенным концам актиновых филаментов, расположенных на плазматической мембране, она сдвигается кнаружи (в направлении роста)

Для перемещения клетки по поверхности необходимо формирование и рост клеточных отростков богатых актином, фиксация этих структур на поверхности (см. также 15 Внеклеточный матрикс и адгезия клеток), и сокращение тела клетки. В настоящем разделе мы опишем, каким образом за счет полимеризации актина и перестройки цитоскелета происходит выпячивание переднего участка ламеллоподии мигрирующей клетки, представленное на . Механизм формирования и роста ламеллоподий хорошо изучен. Для образования ламеллоподий необходима нуклеация актиновых филаментов с участием комплекса Arp2/3. При последующем добавлении актиновых мономеров к оперенному концу актинового филамента с краю клетки плазматическая мембрана выпячивается вперед (подробнее о том, как это может происходить, см. 8.24 Приложение: Две модели, описывающие генерацию силы при сборке

полимера). Отметим, что подвижность клеток можно наблюдать в системе *in vitro*, содержащей очищенный актин, активированный Arp2/3, кофилин и кэпирующий белок.

Во многих клетках, по мере того как они перемещаются вперед, поддерживается относительно постоянная величина ламеллоподий. Это объясняется тем, что скорость добавления мономеров на переднем участке ламеллоподий такая же, как скорость разборки филаментов на их заднем участке. Рост отростков и их геометрия регулируются взаимодействием между актином, белками нуклеации и кэпирования, а также белками, регулирующими их функции и разрезающими филаменты.

Цепочка событий, приводящих к перестройке актинового цитоскелета, начинается с внешнего сигнала, запускающего систему его реализации в клетке, которая приводит к активации белков WASP/Scar (). Эти белки связывают и активируют комплексы Arp2/3, которые нуклеируют новые филаменты, ответвляющиеся от материнских. Геометрия активации обеспечивает ориентацию оперенных концов новых филаментов в направлении плазматической мембраны.

Филаменты быстро удлиняются и сдвигают мембрану вперед, до тех пор пока оперенные концы не кэпируются соответствующими белками. Комплекс Arp2/3 и новообразованные короткие кэпированные актиновые филаменты образуют сетчатую структуру, которая с механической точки зрения хорошо приспособлена к постоянной протрузии мембраны по поверхности (см. ламеллоподии на рис. 8.1).

Необходимые для элонгации мономеры поступают из большого пула растворимых комплексов АТФ-акти-



Эпидермальный фактор роста (EGF) стимулирует миграцию и деление клеток, экспрессирующих рецепторы EGF. На этих видеокадрах видны эпителиальные клетки, у которых после добавления EGF наблюдается образование выроста мембраны — протрузии мембраны, связанное с полимеризацией актина. Время в мин:с. Фотографии любезно предоставлены Е. Майклом Остап, Пенсильванский университет

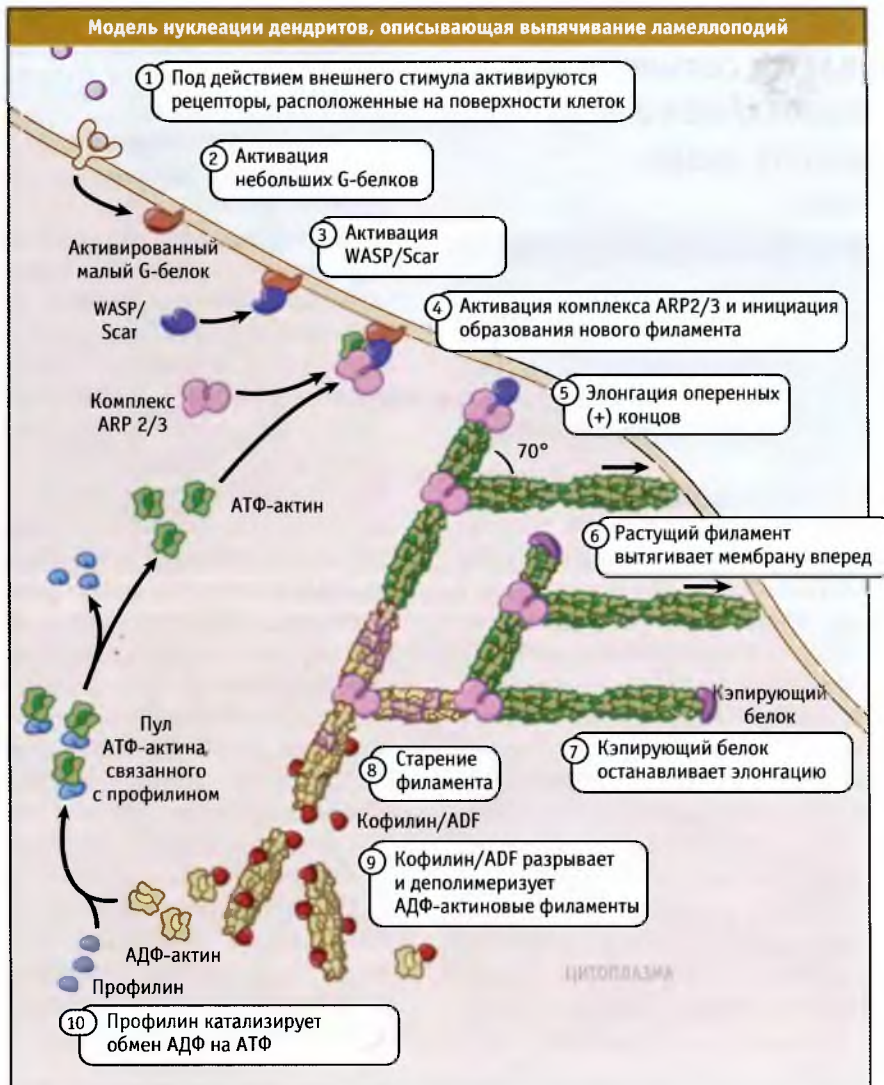


Рис. 8.22. В ответ на внешний сигнал клетка может начать мигрировать в определенном направлении. Модель нуклеации дендритов описывает, каким образом Arp2/3 энуклеирует сборку сети разветвленных актиновых филаментов, и как в процессе этой сборки край клетки выдвигается вперед. Измененный рисунок Томаса Д. Полларда из Иельского Университета, опубликованный в *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, volume 29. © 2000 by Annual Reviews (www.annualreviews.org)

на и тимозина β_4 . АТФ-актиновые мономеры находятся в состоянии равновесия с тимозином β_4 и профилином. Актин в профилин-актиновом комплексе связан со свободными оперенными концами актиновых филаментов. При связывании профилин-актинового комплекса с оперенным концом происходит диссоциация профилина. Это создает возможность добавления к филаменту следующего мономера. АТФ, связанный с полимеризованными субъединицами актина, гидролизуются и происходит медленное высвобождение фос-

фата, которое приводит к образованию АДФ-актина. За счет высвобождения фосфата увеличивается скорость диссоциации комплекса Arp2/3; при этом кофилин/ADF начинает связывать АДФ-актин, а также разрезать и деполимеризовать актиновые филаменты. Затем профилин начинает катализировать обмен АДФ на АТФ в актиновых мономерах, которые высвобождаются из филаментов. После этого АТФ-актиновые мономеры связывают тимозин β_4 и пополняют пул мономерного актина.

8.14 Полимеризация актина регулируется малыми G-белками

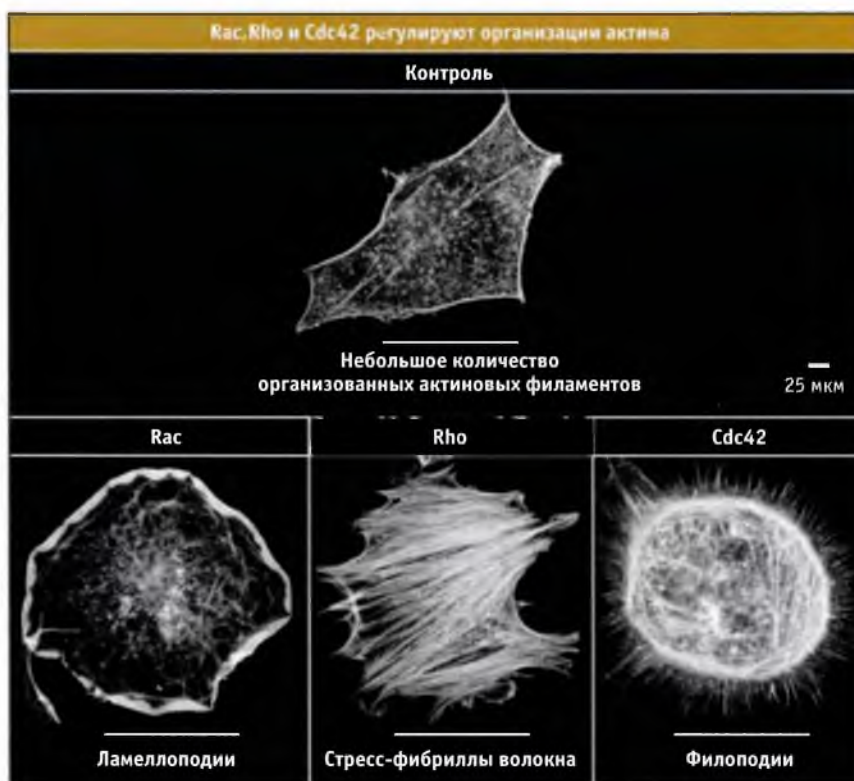
Основные положения

- Полимеризация актина и динамика филаментов регулируются белками, относящимися к группе Rho малых G-белков
- Активация белков Rho, Rac и Cdc42 индуцирует образование ламеллоподий, филоподий и сократительных филаментов соответственно

Как отмечалось в предыдущем разделе, серия событий, приводящих к перестройке актинового цитоскелета, начинается с поступления внешних сигналов, которые запускают внутриклеточную систему их реализации, активирующую белки WASP/Scar. Многие агенты внешней среды, например ростовые факторы, хемоаттрактанты и хемореpellенты, которые способствуют миграции клетки и изменению ее формы, связываются с трансмембранными рецепторами. Передача сигнала именно через эти рецепторы приводит к активации белков группы Rho, относящихся к мономерным G-белкам, причем различные рецепторы ответственны за активацию различных белков. Белки Rho представляют собой ГТФазы и относятся к подгруппе Ras, которые обладают способностью активироваться при

обмене ГДФ на ГТФ (см. 14.23 *Небольшые мономерные ГТФ-связывающие белки являются универсальными регуляторами*). У человека идентифицировано по меньшей мере двадцать различных генов, кодирующих белки группы Rho. На основании первичной структуры и клеточных функций эти белки можно подразделить на подгруппы, которые обозначаются Rho, Rac и Cdc42. Многие белки играют критическую роль в регуляции изменений актинового цитоскелета в ответ на внешние сигналы.

Белки подгруппы Rac и Cdc42 способствуют перестройке актиновых структур за счет активации белков WASP/Scar и WAVE. Последние, в свою очередь, активируют комплекс Arp2/3. *рис. 14.24* иллюстрирует результат активации белков Rac, Cdc42 и Rho, для каждого из которых в клетке существуют различные мишени и которые поэтому индуцируют образование различных актиновых структур. Белки подгруппы Rac индуцируют образование ламеллоподий и мембранных складок (роффов), структур, близких к ламеллоподиям, и способным отходить от дорзальной поверхности клетки и втягиваться обратно. Эти белки непосредственно не взаимодействуют с белками WAVE, однако могут высвобождать их из неактивного комплекса, так что последние способны связываться с комплексом Arp2/3.



Активация Rac, Rho или Cdc42 в клетке приводит к образованию актиновых структур различного типа. После окрашивания актиновых структур клетки исследовали во флуоресцентном микроскопе. Фотографии любезно предоставлены Аланом Холлом, МРС Лаборатория молекулярной и клеточной биологии и Лаборатория биологии клетки. По данным А. Hall. 1998. *Science*. 279: 509–514. © 1998 AAAS

Белки подгруппы Cdc42 непосредственно связываются с WASP; это связывание приводит к переходу WASP из неактивной формы в активную, которая способна стимулировать комплекс Arp2/3. Активация белков Cdc42 обеспечивает образование связей актиновых филаментов и рост филоподий.

Белки подгруппы Rho стимулируют образование сократимых филаментов, содержащих актин и миозин II (напоминающих стресс-фибриллы, см. рис. 8.1). Предполагается, что эти сократимые филаменты помогают клетке противостоять механическим воздействиям; они также определяют адгезивные свойства клеток и принимают участие в их формообразовании (подробнее о стресс-фибриллах и клеточной адгезии см. 15.14 *Интегриновые рецепторы участвуют в клеточных сигнальных процессах*). Сигналы, исходящие от Rho белков, приводят к фосфорилированию легких цепей миозина, что активирует немышечный миозин (см. 8.20 *Внутриклеточные функции и локализация миозинов регулируются различными путями*). Белки Rho также стабилизируют миозин-содержащие филаменты, активируя киназу (LIM киназу), которая фосфорилирует кофилин и ингибирует процессы разрезания и деполимеризации актиновых филаментов. Также белки этой подгруппы участвуют в активации нуклеации актиновых филаментов в клетках дрожжей, вызываемой формином.

8.15 Миозины представляют собой молекулярные моторы, связанные с актином, которые играют существенную роль во многих клеточных процессах

Основные положения

- Миозиновые белки являются преобразователями энергии, которые используют АТФ для обеспечения подвижности и генерации силы, направленных вдоль актиновых филаментов
- Миозиновая подгруппа молекулярных моторов на основе актина включает в себя по меньшей мере 18 классов, причем для многих белков существует несколько изоформ
- Одни миозины обеспечивают сокращение мышц и клеток, в то время как другие обеспечивают поддержку формы мембран и везикулярный транспорт
- Миозины играют ключевую роль в регуляции формы и поляриности клеток
- Миозины участвуют в процессах передачи сигнала и реализации сенсорных ощущений

Миозины представляют собой белковые моторы, использующие энергию гидролиза связанного АТФ для генерации силы, обеспечивающей подвижность вдоль актиновых филаментов. Миозины хорошо известны из-за своей роли в мышечном сокращении (описано в 8.21 *Миозин II участвует в мышечном сокращении*). Однако экспрессия миозина не ограничивается только мышцами. Эта большая группа белков, которые экс-

прессируются практически во всех клетках эукариот. Различные ее представители характеризуются структурными и биохимическими особенностями, которые предназначаются для специфических клеточных нужд.

Миозиновая группа молекулярных моторов на основе актина состоит по меньшей мере из 18 классов (или семейств), причем во многих классах белки имеют несколько изоформ. Классы различаются по результатам филогенетического анализа аминокислотных последовательностей. Все миозины, за исключением миозина VI, движутся по направлению к оперенному концу актиновых филаментов. Типы и количество миозинов, которые экспрессируются в данной клетке или организме, существенно различаются. Например, в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* экспрессируются пять миозинов, принадлежащих к трем разным классам, а у человека присутствуют сорок генов из двенадцати семейств.

Представители семейства миозинов участвуют в выполнении существенных и разнообразных клеточных функций. Для них характерно наличие трех общих доменов (головной или моторный домен, регуляторный и хвостовой домены), которые эволюционировали таким образом, что приобрели характеристики, позволяющие им выполнять в клетке различные специфические механические и регуляторные функции. Моторный и регуляторный домены управляют подвижностью, хвостовой домен участвует в полимеризации миозина и в связывании с другими клеточными компонентами, необходимыми для транспорта (см. 8.16 *Миозины содержат три структурных домена*). Достигнут большой прогресс в выяснении клеточных функций миозинов и их регуляции с участием моторных и хвостовых доменов. На рис. 8.24 представлены функции различных семейств миозина, рис. 8.25 суммирует свойства миозиновых доменов, а рис. 8.26 содержит сведения об экспрессии миозинов человека. Все известные миозины можно подразделить на четыре больших функциональных группы.

Миозины, обеспечивающие мышечное и клеточное сокращение. Изоформы семейства миозин II генерируют усилия, вызывающие сокращение скелетных, сердечных и гладких мышц (см. 8.21 *Миозин II участвует в мышечном сокращении*). Они также обеспечивают функционирование сократительного кольца при цитокинезе, миграцию клеток и прочие процессы, связанные с сократительной способностью клетки.

Миозины, обеспечивающие процессы мембранного и везикулярного транспорта. Моторы микротрубочек осуществляют цитозольный транспорт мембранных везикул на дальние расстояния (подробнее см. 7 *Микротрубочки*). Однако некоторые миозины играют существенную роль в транспорте на короткие расстояния и в регуляции распределения везикул и органелл. Например, процессивный мотор миозин-V транспортирует пигментные органеллы, обеспечивающие окраску кожи и волос, в то время как другие миозины, например изоформы миозина-I, -VI, -IX, и -X, участвуют в формировании и транспорте везикул при эндоцитозе и фагоцитозе.

Распространение и функции миозинов		
Семейство миозинов	Организм	Клеточные функции
I	Грибы Простейшие Все метазоа	<ul style="list-style-type: none"> • Связывают актиновый цитоскелет с липидными мембранами • Перемещение мембран • Передача сигналов движений • Обеспечение динамических свойств плазматической мембраны
II (обычные миозины)	Грибы Простейшие Все метазоа	<ul style="list-style-type: none"> • Сокращение скелетных, гладких мышц, а также миокарда • Немышечные изоформы обладают многочисленными функциями, включающими: <ul style="list-style-type: none"> – цитокинез – передвижение клеток – поддержание формы клеток – регуляция полярности клеток
III	Позвоночные <i>Limulus</i> <i>Drosophila</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Функционирование сенсорных клеток, включая транспорт сигнальных молекул в фоторецепторах • У человека мутации изоформ приводят к глухоте
IV	Акантамеба (простейшее)	<ul style="list-style-type: none"> • Неизвестны
V	Клетки большинства эукариот	<ul style="list-style-type: none"> • Обеспечивают ближний транспорт на близкие расстояния, везикулярный транспорт и дисперсию • Участвуют в локализации иРНК
VI	Метазоа	<ul style="list-style-type: none"> • Эндоцитоз и перемещение мембран • Возможно, играют роль в структурной организации актинового цитоскелета
VII	Метазоа <i>Dictyostelium</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Адгезия клеток, фагоцитоз и структурная организация актинового цитоскелета • У человека мутации в соответствующих генах приводят к глухоте
VIII	Растения	<ul style="list-style-type: none"> • Могут функционировать в эндоцитозе и в организации актина на периферии клетки
IX	Позвоночные <i>C. elegans</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Регуляция процессов системы передачи сигнала
X	Позвоночные	<ul style="list-style-type: none"> • Вероятно, принимают участие в мембранном транспорте • Обеспечивают связь передачи сигнала через фосфоинозитиды с фагоцитозом • Участвуют в позиционировании ядра
XI	Растения <i>Dictyostelium</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Подобно миозину-V, участвуют в транспортных процессах
XII	<i>C. elegans</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Неизвестны
XIII	<i>Acetabularia</i> (зеленая водоросль)	<ul style="list-style-type: none"> • Возможно, принимают участие в транспорте органелл и в росте кончиков водорослей
XIV	<i>Toxoplasma</i> <i>Plasmodium</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Обеспечивают подвижность и инвазивность
XV	Позвоночные <i>Drosophila</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Возможно, играют роль в формировании или поддержании структур богатых актином, таких как клетки сенсорных волосков внутреннего уха • Мутации в соответствующих генах у человека и мышей приводят к глухоте
XVI	Позвоночные	<ul style="list-style-type: none"> • Могут направлять фосфатазы в специфические участки клеток в развивающемся мозге
XVII	Грибы	<ul style="list-style-type: none"> • Могут участвовать в синтезе стенки у поляризованных клеток и в процессах морфогенеза у грибов
XVIII	Позвоночные <i>Drosophila</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Неизвестны

Свойства 18 семейств миозинов. Перечислены организмы, в которых они экспрессируются, и функции этих белков. Для некоторых миозинов функции неизвестны

Семейство миозинов	Структурные характеристики	Биохимические и кинематические свойства
I	<ul style="list-style-type: none"> Молекулы с одной головкой Все известные изоформы имеют хвостовой домен, который связывает кислые фосфолипиды Некоторые изоформы содержат домены гомологичные Src 3 (SH3) и сайты связывания актина, нечувствительные к нуклеотидам 	<ul style="list-style-type: none"> Непроцессивные моторы с низким коэффициентом загрузки
II (Обычные миозины)	<ul style="list-style-type: none"> Суперспирализованный домен полимеризуется, образуя биполярные филаменты 	<ul style="list-style-type: none"> Все известные мышечные изоформы представляют собой моторы с низким коэффициентом загрузки По крайней мере одна мышечная изоформа характеризуется относительно высоким коэффициентом загрузки и, вероятно, обеспечивает медленные и непрерывные сокращения
III	<ul style="list-style-type: none"> На N-концевом участке моторного домена расположен киназный домен 	<ul style="list-style-type: none"> Вероятно, представляют собой мотор с низким коэффициентом загрузки
IV	<ul style="list-style-type: none"> Хвостовой домен включает домен SH3 и другие домены, обеспечивающие белок-белковые взаимодействия 	<ul style="list-style-type: none"> Неизвестны
V	<ul style="list-style-type: none"> Суперспирализованный домен димеризуется, образуя молекулу с двумя головками Идентифицированы белки, которые связываются с хвостовым доменом и участвуют в специфическом адресовании в органеллы 	<ul style="list-style-type: none"> Мотор с высоким коэффициентом загрузки Прежде чем диссоциировать, миозин V, обладающий двумя головками, делает несколько шагов вдоль актинового филамента
VI	<ul style="list-style-type: none"> Моторный домен содержит вставку, которая позволяет миозину VI продвигаться к заостренному концу актиновых филаментов 	<ul style="list-style-type: none"> Мотор с высоким коэффициентом загрузки, который может существовать в форме мономера и димера Прежде чем диссоциировать, димеры могут делать несколько шагов вдоль актинового филамента
VII	<ul style="list-style-type: none"> Могут димеризоваться с образованием молекул с двумя головками Хвостовой домен по крайней мере одной изоформы связывает один из белков цитоскелета, талин 	<ul style="list-style-type: none"> Мотор с высоким коэффициентом загрузки, который, прежде чем диссоциировать, может делать несколько шагов вдоль актинового филамента
VIII	<ul style="list-style-type: none"> Содержит суперспирализованный домен, обеспечивающий димеризацию Моторный домен на N- терминальном конце содержит удлинение, функция которого неизвестна 	<ul style="list-style-type: none"> Неизвестны
IX	<ul style="list-style-type: none"> Предполагают, что это RhoGAP Моторный домен в сайте связывания актина содержит одну большую вставку и вторую вставку, гомологичную домену связывания Ras 	<ul style="list-style-type: none"> Предположительно представляет собой процессивный мотор с одной головкой Может продвигаться к заостренному концу актинового филамента
X	<ul style="list-style-type: none"> Хвостовой домен содержит участок, гомологичный домену плекстрина, и другой участок, обеспечивающий белок-белковые взаимодействия 	<ul style="list-style-type: none"> Мотор с низким коэффициентом загрузки
XI	<ul style="list-style-type: none"> Суперспирализованный домен димеризуется, образуя молекулу с двумя головками 	<ul style="list-style-type: none"> Процессивный мотор с высоким коэффициентом загрузки
XII	<ul style="list-style-type: none"> Моторный домен содержит вставки, функции которых неизвестны Хвостовой домен содержит участок, ответственный за белок-белковые взаимодействия 	<ul style="list-style-type: none"> Неизвестны
XIII	<ul style="list-style-type: none"> Моторный домен на N-концевом участке содержит удлинение с неизвестной функцией 	<ul style="list-style-type: none"> Неизвестны
XIV	<ul style="list-style-type: none"> Короткий хвостовой домен содержит скрытую регуляторную область 	<ul style="list-style-type: none"> Непроцессивный мотор с низким коэффициентом загрузки
XV	<ul style="list-style-type: none"> Хвостовой домен содержит MyTH4 и FERM-домены 	<ul style="list-style-type: none"> Неизвестны
XVI	<ul style="list-style-type: none"> В N-концевом участке мотора находится удлинение, содержащее анкериновые повторы, связывающиеся с фосфатазой Хвостовой домен содержит несколько растяжек, состоящих из полипролина 	<ul style="list-style-type: none"> Неизвестны
XVII	<ul style="list-style-type: none"> В состав хвостового домена входит домен хитинсинтазы 	<ul style="list-style-type: none"> Неизвестны
XVIII	<ul style="list-style-type: none"> N-концевой участок одной из изоформ представлен PDZ доменом, который взаимодействует с белками Хвостовой домен содержит суперспирализованную область и глобулярный хвост, расположенный со стороны C-концевого участка 	<ul style="list-style-type: none"> Неизвестны

Структурные и кинематические свойства семейств миозинов

Семейство миозинов	Количество генов	Характеристика экспрессии
I	8	В большинстве клеток
II (Обычные миозины)	14	Гены подразделяются на мышечные и немышечные; немышечные гены экспрессируются в большинстве клеток
III	2	Сетчатка (глаза), семенники, почки, кишечник и мешочек лабиринта (ухо)
V	3	В большинстве клеток
VI	1	В большинстве клеток
VII	2	Дифференциальная экспрессия в нескольких тканях, включающих улитку (ухо), сетчатку (глаза), легкие, семенники и почки
IX	2	В большинстве клеток
X	1	В большинстве клеток
XV	2	Дифференциальная экспрессия в ткани улитки, гипофиза, желудка, почек, тонкого кишечника и ободочной кишки
XVI	2	Головной мозг, почки и печень
XVIII	2	Дифференциальная экспрессия в кровяных клетках, клетках мышц и кишечника

Миозины, играющие ключевую роль в регуляции формирования и полярности клеток. Миозины необходимы для образования и функционирования богатых актином специализированных поверхностных образований, таких как филоподии, стереоцилии и псевдоподии. Например, некоторые изоформы миозина-I связывают липиды мембраны с актиновым цитоскелетом и обеспечивают сокращение мембранных протрузий, богатых актином; изоформы миозина-II обеспечивают сокращение стресс-фибрилл и актиновых филаментов кортикального слоя клеток, участвующих в поддержании формы клетки; миозин-VII обеспечивает сокращаемую связь между актиновым цитоскелетом и внеклеточными матриксами.

Миозины, участвующие в процессах передачи сигнала и реализации сенсорных ощущений. Миозин участвует в процессе передачи сигнала за счет ассоциации с сигнальными белками. Например, миозин-I регулирует активность ряда кальциевых каналов, миозин III взаимодействует с сигнальными молекулами фоторецепторов глаза, миозин-IX, по-видимому, регулирует активность Rho, и миозин-XVI направляет фосфатазу в специфические области клетки. Также миозины играют важную роль в реализации сенсорных ощущений. Известны мутации в генах, кодирующих синтез миозинов-VI, -VII и -XV. Они служат причиной потери слуха, которая происходит из-за нарушений в актин-содержащих структурах клеток сенсорных волосков внутреннего уха.

В последующих разделах мы рассмотрим структуру миозина, основные механизмы генерации усилий для всех охарактеризованных миозинов, и связь этих

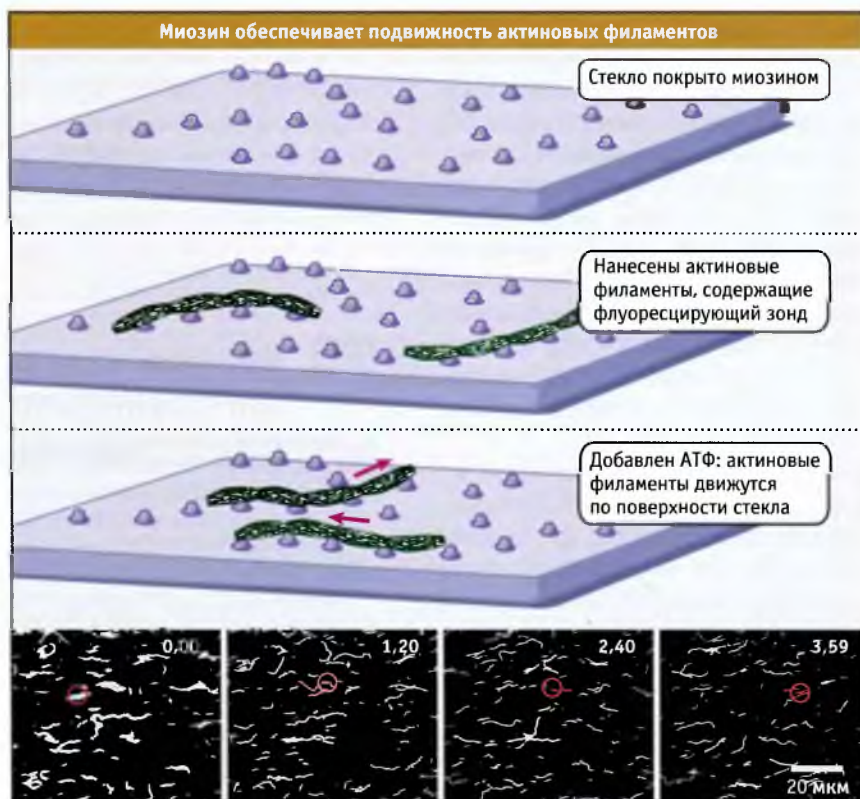
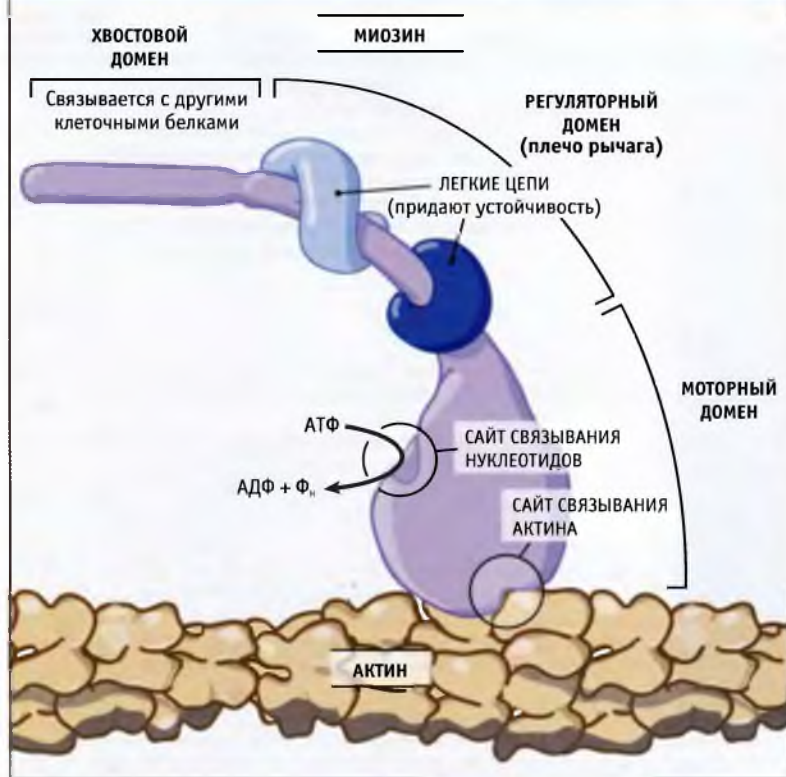
свойств с биологической ролью содержащих их клеток (обсуждение белковых моторов, взаимодействующих с микротрубочками см. 7.11 Общие представления о моторных белках микротрубочек; обсуждение роли миозина в делении дрожжевых клеток см. 7.14 Динамика микротрубочек и моторы совместно создают асимметрическую организацию клетки).

8.16 Миозины содержат три структурных домена

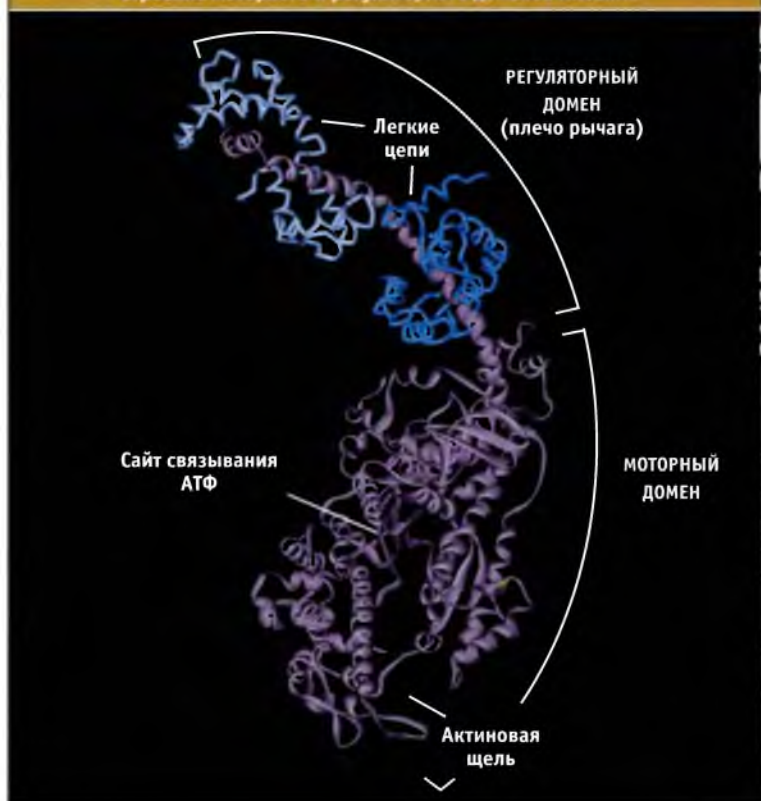
Основные положения

- Молекулы представителей семейства миозинов содержат три структурных домена, которые обозначаются как головной (или моторный), регуляторный и хвостовой домены
- Моторный домен содержит АТФ- и актин-связывающие сайты и превращает энергию гидролиза АТФ в механическую работу
- В большинстве миозинов регуляторный домен действует как плечо рычага, преобразующее усилие
- Хвостовой домен миозина взаимодействует с белками карго или с липидами и определяет биологические функции миозинов

Представители семейства миозинов обычно характеризуются наличием трех структурных доменов. Эти домены обозначаются как моторный, регуляторный и хвостовой и схематически представлены на Рис. 8.27. Размер моторного домена составляет ~80 кДа; он содержит АТФ- и актин-связывающие сайты, ответственные



Эксперимент, демонстрирующий, что миозиновые фрагменты, содержащие только моторный и регуляторный домены, обеспечивают подвижность актиновых филаментов, которая визуализируется *in vitro*. Фотографии представляют собой кадры видео, показывающего перемещение филаментов. Один из филаментов обведен кружком. Фотографии любезно предоставлены Тяньмин Лин и У. Майкл Остап, Пенсильванский университет



Кристаллическая структура миозинового фрагмента, содержащего моторный и регуляторный домены, представленная по данным рентгеноструктурного анализа, представленным в Protein Data Bank file 2MYS

за превращение химической энергии гидролиза АТФ в механическую работу. Этот каталитический моторный домен имеет наиболее консервативную структуру у всех представителей семейства миозинов, и его наличие является характерной чертой миозиновых белков.

Регуляторный домен представляет собой участок молекулы, способный связывать белки, известные под названием легких цепей (поскольку по сравнению с «тяжелой цепью» миозина они обладают меньшей молекулярной

массой). Большинство легких цепей представлено калмодулином или ему подобными белками (см. 14.15 Во всех эукариотических клетках система Ca^{2+} -сигналов выполняет различные функции). Индивидуальность структуры ассоциированных легких цепей определяется изоформой миозина и стадией развития организма. Изоформа миозина также определяет количество связанных легких цепей. Обычно легкие цепи остаются прочно связанными с миозином и рассматриваются как субъединицы его молекулы.

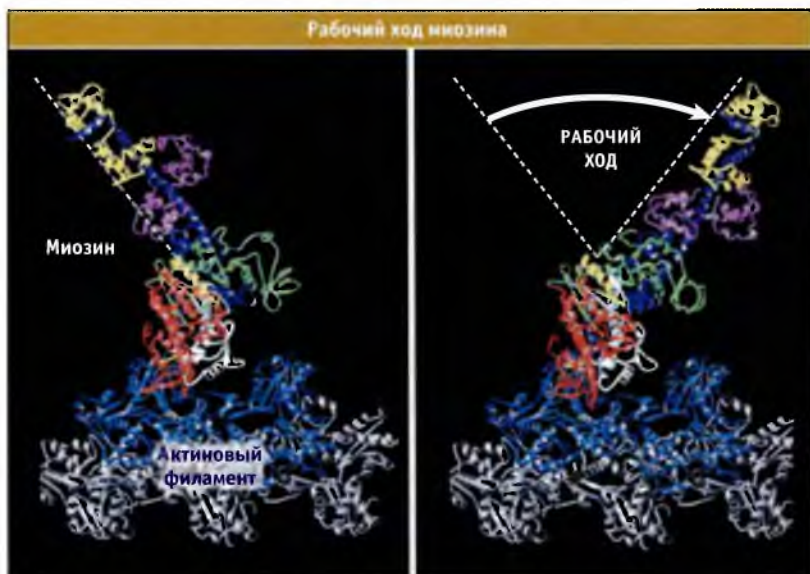
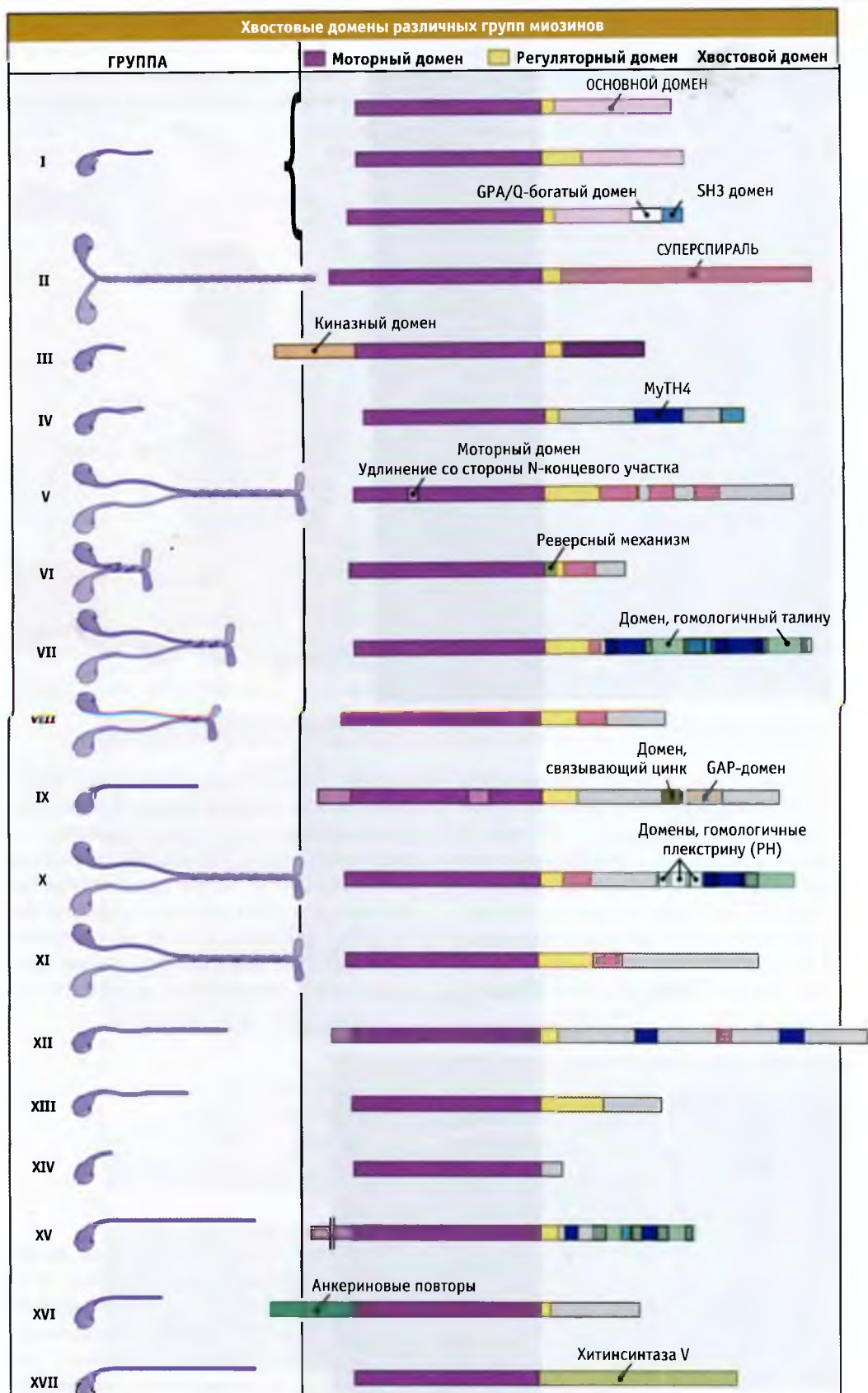


Рис. 8.30. Регуляторный домен миозина (плечо рычага) претерпевает сильные конформационные изменения, которые генерируют усилие для движения вдоль актинового филамента. Гидролиз АТФ и высвобождение P_i вызывают вначале небольшие конформационные изменения в актиновой щели, которые затем приводят к более сильным изменениям. Фотография любезно предоставлена Кеннет К. Холмс Институт медицинских исследований им. Макса Планка. По данным Holmes, K., et al., *Phil. Trans. R. Soc.*, 359, pp. 1819–1828 (2004) © The Royal Society



Хвостовые домены миозинов обладают специфическими функциями. Некоторые хвостовые домены содержат области, способные к олигомеризации с образованием миозиновых филаментов, другие связываются с белками, участвующими в транспортных процессах или функционирующими как ферменты

Подвижность и АТФ-зависимая активность некоторых миозиновых доменов регулируются путем модификации легких цепей при их фосфорилировании или за счет связывания ионов кальция (см. 8.20 *Внутриклеточные функции и локализация миозинов регулируются различными путями*).

Для генерации силы необходимо и достаточно наличие моторных и регуляторных доменов. Это подтверждается экспериментами по реконструированию системы подвижности *in vitro* (рис. 8.28).

На рис. 8.29 представлена кристаллическая структура моторного и регуляторного доменов, предложенная на основании рентгеноструктурных исследований. Эта структура позволяет понять основные характеристики механизма генерации силы. Молекула миозина обладает удлинённой формой, и моторный домен состоит из внутреннего складчатого β -слоя, окруженного α -спиралями. Такая структура напоминает мотор микротрубочек — кинезин (см. рис. 7.51), несмотря на отсутствие гомологии между их структурами (см. 7.11 *Общие представления о моторных белках микротрубочек*). Сайт связывания АТФ, подобно аналогичным сайтам в АТФазах и G-белках, связывает фосфатные группы АТФ вместе с ассоциированными с ними ионами магния. Связывание нуклеотида изменяет конформацию актин-связывающего сайта и регуляторного домена. Сайт связывания актина расположен в большом углублении на конце молекулы, примерно в 4 нм от сайта связывания АТФ. Связывание нуклеотида с миозином контролирует степень открытия этого углубления, что, в свою очередь, влияет на связывание миозина с актином. Когда АТФ связывается с миозином, углубление слегка приоткрывается, и тем самым сродство миозина к актину снижается.

Регуляторный домен расположен сразу после моторного и выглядит как α -спиральная структура (см. рис. 8.29). Он играет важную механическую роль в функционировании миозина, действуя как «плечо рычага». При развитии усилия конформационные изменения в сайте связывания нуклеотида, которые определяются природой связанного нуклеотида (АТФ, АДФ-Ф_i или АДФ), переносятся с мотора на регуляторный домен. Эти изменения конформации вызывают поворот плеча рычага, представляющий собой **рабочий ход**, в результате которого генерируется усилие (рис. 8.30) (подробнее о рабочем ходе мотора см. в следующем разделе 8.17 *Гидролиз АТФ под действием миозина представляет собой многоступенчатый процесс*). Легкие цепи стабилизируют структуру регуляторного домена, что дает ему возможность действовать в качестве жесткого рычага.

Хвостовые домены ответственны за связывание клеточных белков и липидов и/или других молекул миозина. Структуры хвостовых доменов у белков, относящихся к семейству миозинов, сильно различаются. У многих белков они содержат четко различимые субдомены, которые обуславливают белок-белковые взаимодействия (рис. 8.31). Хвостовые домены определяют природу транспортируемого груза (белки или липиды) и позволяют некоторым миозинам образовывать димеры или олигомеры, напоминающие филаменты. Таким образом,

они приобретают два или более каталитических моторных домена. Толстые филаменты поперечно-полосатых мышц служат примером таких миозиновых филаментов (описаны в 8.21 *Миозин II участвует в мышечном сокращении*). Различия в последовательности аминокислот хвостовых доменов являются следствием адаптации каждого типа миозина к выполнению в клетке специфических функций (рис. 8.24).

8.17 Гидролиз АТФ под действием миозина представляет собой многоступенчатый процесс

Основные положения

- Представители семейства миозинов осуществляют гидролиз АТФ по общей схеме
- Сродство миозина к актину определяется нуклеотидом (АТФ, АДФ-Ф_i или АДФ), ассоциированным с сайтом связывания
- Миозины, которые в сайте связывания содержат АТФ или АДФ-Ф_i, лишь в слабой степени способны связываться с актином
- В состоянии слабого связывания миозин быстро ассоциирует с актином и быстро от него отщепляется
- Гидролиз АТФ «активирует» миозин и происходит, пока последний не связан с актином
- В результате рабочего хода миозина генерируется усилие и происходит высвобождение фосфата после повторного связывания актина миозином-АДФ-Ф_i
- Миозины, которые в сайте связывания содержат АДФ или не содержат нуклеотида, способны к сильному связыванию актина
- В состоянии сильного связывания миозины, в течение долгого времени остаются присоединенными к актину
- В состоянии слабого связывания миозины не способны генерировать усилие
- В состоянии сильного связывания миозины не сдвигаются с места при приложении внешних усилий

Все известные миозины осуществляют гидролиз АТФ до АДФ и Ф_i по общей схеме. На рис. 8.32 представлена схема гидролиза АТФ, сопряженного с поворотом плеча рычага. Это сопряжение гидролиза АТФ с конформационными изменениями позволяет миозину продвигаться самому и продвигать груз вдоль актиновых филаментов.

В отсутствие АТФ миозин прочно и стереоспецифично связывается с актином, образуя т. н. комплекс окоченения. (После смерти уровень АТФ снижается и мышцы теряют эластичность. Это происходит вследствие образования актомиозинового комплекса, что приводит к трупному окоченению.)

При связывании АТФ с миозином (шаг 1 на рис. 8.32) происходит открытие углубления, связывающего актин; при этом взаимодействие актина с миозином ослабляется. Это приводит к отделению миозина от актина (шаг 2). При такой конформации миозин прочно связывает АТФ, не гидролизует его, поскольку необходимые для химического катализа боковые цепи аминокис-

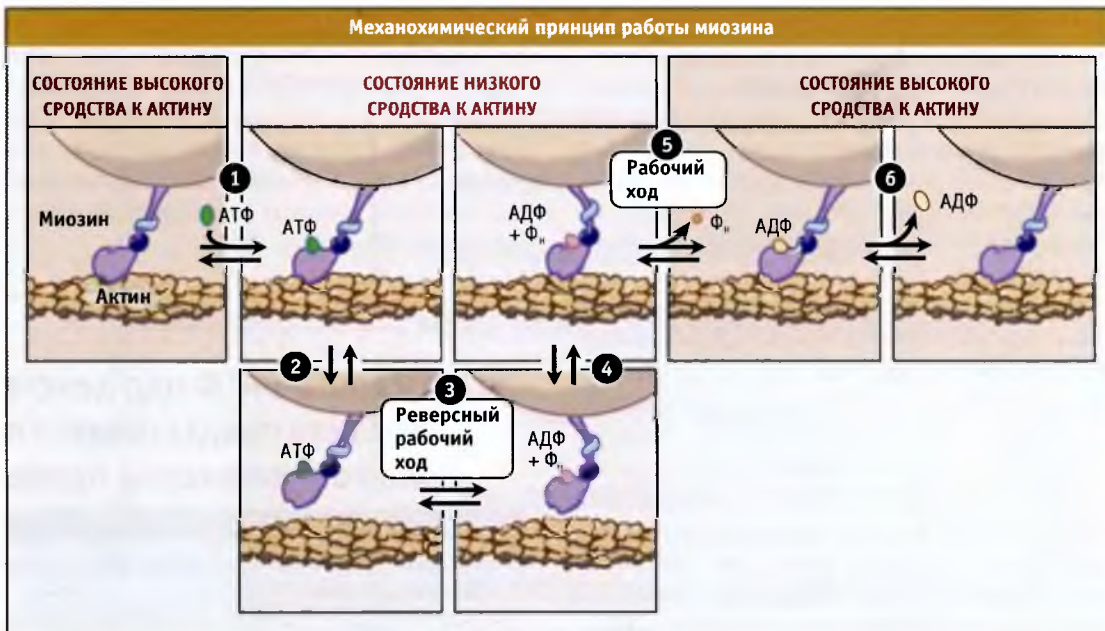


Рис. 8.32. Каждый шаг, включающий связывание АТФ, его гидролиз и высвобождение P_i и АДФ, позволяет миозину сделать один шаг вдоль актинового филамента. Изменения конформации, связанные с циклом АТФ, приводят к таким изменениям сродства миозина к актину, которые вызывают попеременное его связывание с актиновыми филаментами и отщепление от них

лот расположены таким образом, что не могут атаковать β - γ фосфатную связь АТФ.

В миозине происходит второе конформационное изменение, в результате которого АТФ гидролизуется до АДФ и P_i , остающихся нековалентно связанными с миозином (шаг 3). Это конформационное изменение включает движение структурных элементов в моторном домене, которые приводят к повороту регуляторного домена. Регуляторный домен, который действует как плечо рычага миозина, поворачивается в исходное состояние, в котором миозин готов к выполнению рабочего хода.

Без связанного актина высвобождение фосфата из миозина в исходном состоянии происходит крайне медленно. Это обеспечивает возможность миозину не расходовать АТФ, когда он не взаимодействует с актином. После связывания с актином (шаг 4) скорость высвобождения фосфата из миозина сильно увеличивается. Силовое усилие миозина, т. е. вращение регуляторного домена (шаг 5), сопровождается шагом высвобождения фосфата. После завершения силового усилия происходит высвобождение АДФ (шаг 6), что приводит к образованию миозина, присоединенного к актину, но не содержащего нуклеотид. Цикл повторяется при присоединении АТФ к миозину. В зависимости от типа миозина, каждый цикл связывания АТФ, его

гидролиза и высвобождения фосфата приводит к продвижению по актиновому филаменту на расстояние между 5 и 25 нм (см. 8.19 *Миозин перемещается на нанометровые расстояния и генерирует усилия в несколько пиконьютонов*).

Сродство миозина к актину в ходе цикла гидролиза АТФ меняется. Промежуточные продукты этого цикла можно охарактеризовать в соответствии с их сродством к актиновым филаментам. Миозины, которые содержат связанный АТФ или АДФ- P_i , находятся в состоянии слабого связывания или генерации предварительных усилий (шаги 2 и 4), которые характеризуются присоединением и диссоциацией от актинового филамента во временной шкале в 100 раз быстрее, чем цикл гидролиза АТФ. Эти слабые состояния связывания не дают силу. Если актиновый филамент вытягивается относительно миозина в этих состояниях, миозины скользят по филаментам, поскольку они присоединяют и отсоединяются от актина очень быстро. В состоянии слабого связывания миозин вращается в исходном состоянии, готовя себя для генерации усилий. Если актиновые филаменты вытянуты, миозин сильно связан с ним и противостоит движению и выполняет роль якоря актинового филамента (подробнее о механизме функционирования мотора микротрубочек см. 7.12 *Как работают моторные белки*).

8.18 Кинетические свойства миозиновых моторов приспособлены к выполнению их внутриклеточной роли

Основные положения

- АТФазный цикл является наиболее консервативным для всех миозинов
- Кинетика АТФазного цикла различных миозинов настроена для выполнения специфических биологических функций
- Миозины с высоким коэффициентом загрузки проводят большую часть продолжительности цикла в присоединенном к актину состоянии
- Миозины с низким коэффициентом загрузки проводят большую часть времени в отсоединенном от актина состоянии
- Некоторые миозины с высоким коэффициентом загрузки являются процессивными и «шагают» по актиновым филаментам на большие расстояния

Как описано в предыдущем разделе, все миозины используют механохимический принцип. Однако моторные домены различных изоформ миозина характеризуются биохимическим и механическим свойствами, которые обладают определенной «настройкой» для выполнения определенной роли в клетке. Эти свойства миозинов суммированы на рис. 8.24 и 8.25. Например, отдельные миозины, работающие индивидуально или небольшими группами и способные перемещать органеллы по актиновым филаментам на большие расстояния, обладают свойствами, отличающимися от миозинов, работающих в организованных филаментах, генерирующих большие усилия и поддерживающих высокую скорость сокращения (например, мышц). Специфические свойства различных миозинов проявляются в

различиях в константе скорости, которые определяют переходы между различными этапами АТФазного цикла, а не различиями в основных путях АТФазной реакции. Разные константы скорости приводят к разным скоростям, с которыми миозины проходят через АТФазный цикл и к различным их **коэффициентам загрузки**. Под коэффициентом загрузки понимают часть общего времени АТФазного цикла, в течение которой индивидуальный мотор обычно прочно связан с актином (рис. 8.25).

Миозины, работающие в виде комплекса из многих моторов, обычно имеют низкие коэффициенты загрузки. В миозиновом филаменте, содержащем сотни моторных доменов (например, в толстом филаменте мышц), каждый мотор должен быть присоединен к актину, выполнить цикл рабочего хода и затем быстро отсоединиться от актина, не мешая другим миозином в той же сборке. Если один из миозиновых моторов остается связанным с актином слишком долго, он будет препятствовать другим миозином в сборке выполнять рабочий ход и ингибировать быстрое скольжение, которое необходимо для мышечного сокращения. (см. 8.21 *Миозин II участвует в мышечном сокращении*).

До отсоединения от актинового филамента миозины с высоким коэффициентом загрузки способны выполнять вдоль него многочисленные шаги. Рассмотрим димерный миозин (например, миозин-V), который транспортирует органеллу вдоль актинового филамента. Если бы оба его моторных домена отсоединились от актина, то под действием термических сил молекула миозина ушла бы с трека. Поэтому, чтобы происходил транспорт, по крайней мере один мотор все время должен быть связанным с актином. Считают, что эти процессивные двухглавые миозины имеют скоординированную АТФазную активность двух головок, позволяющую им легко и синхронно двигаться.

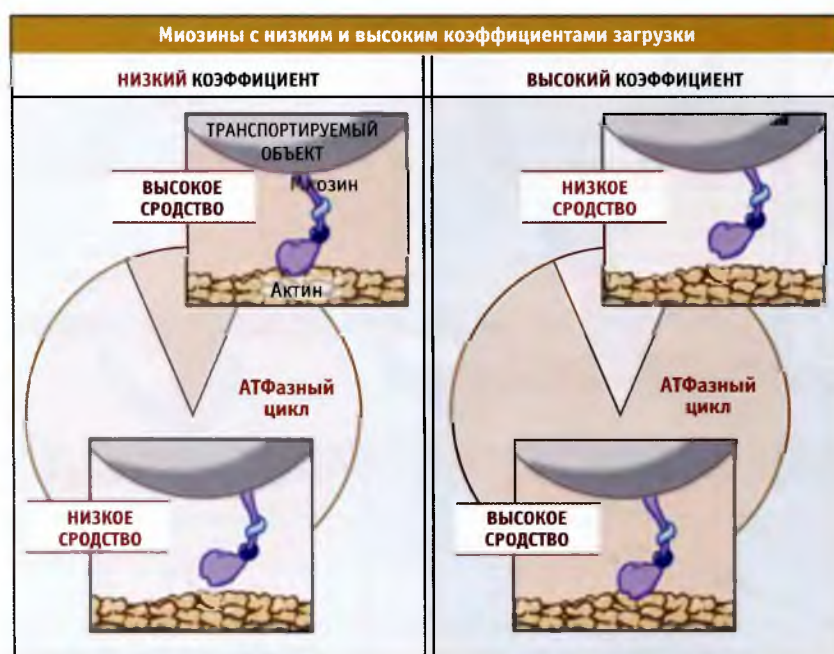


Рис. 8.25. Коэффициент загрузки представляет собой часть времени в АТФазном цикле, в течение которого миозиновый мотор остается связанным с актином

8.19 Миозин перемещается на нанометровые расстояния и генерирует усилия в несколько пиконьютон

Основные положения

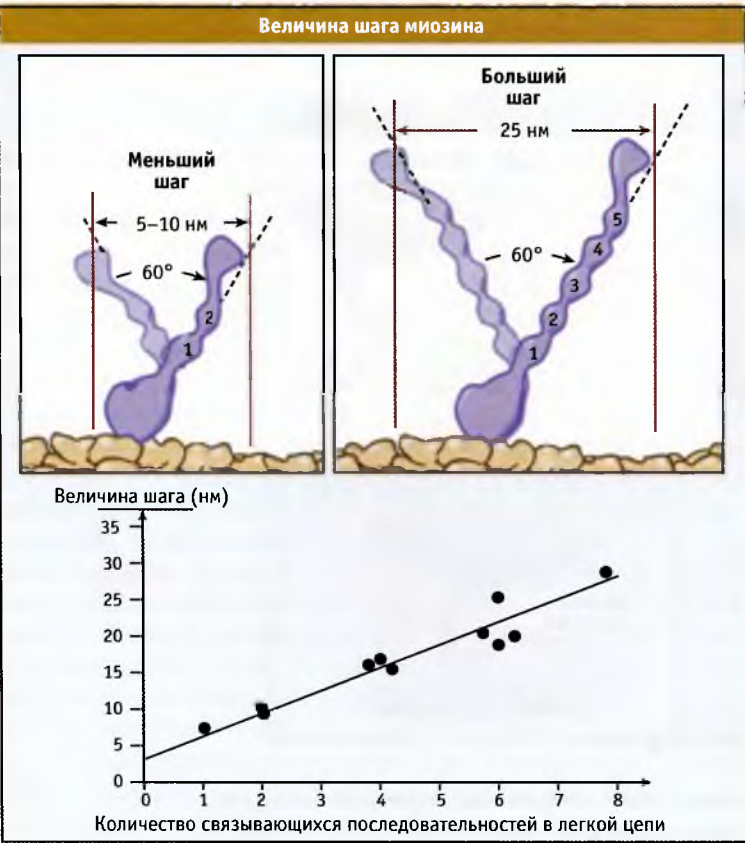
- Один миозиновый мотор генерирует усилие, достаточное для транспорта биологических молекул и везикул (несколько пиконьютон)
- Рабочий ход миозина пропорционален длине «плеча рычага»

Хотя миозин является ферментом, катализирующим гидролиз АТФ в АДФ и P_i , биологически значимым продуктом этой реакции является не АДФ и P_i , а физическая сила. В растворе физиологической концентрации количество работы, высвобождающейся при гидролизе молекулы АТФ, составляет примерно 80 pN-нм, где pN сокращение, применяющееся для обозначения пиконьютона (10^{-12} ньютон), а нм обозначает длину в нанометрах (10^{-9} метра). Для справки отметим, что один pN приблизительно соответствует весу одного эритроцита, а 1 нм радиусу спирали ДНК. Миозины способны превращать в полезную работу около 50% всей энергии, высвобождающейся при гидролизе АТФ. Остальная энергия рассеивается в виде тепла. Таким образом, миозин фактически генерирует порядка 40 pN-нм на одну молекулу АТФ. Это не очень большая энергия, однако она в 10 раз превышает термическую энергию температуры тела. Этой энергии также

оказывается достаточно для транспортировки молекулой миозина органеллы по цитоплазме. Однако для выполнения более понятного уровня работы, которая должна совершаться в ткани мышц, вместе должны работать много миллионов молекул миозина. Например, для того чтобы поднять с пола и поставить на стол корзинку с зеленью, необходимо приложить усилие ~50 Nm.

Усилие, которое способна развивать одна молекула миозина, было рассчитано из данных, полученных методом оптической силовой спектроскопии. Этот метод позволяет регистрировать усилие, которое развивает одна молекула миозина при движении по актиновому филаменту (см. **EXP:8-0001**). Различные изоформы миозина генерируют примерно 5–10 pN на молекулу гидролизованного АТФ (объединенное усилие). Хотя все миозины генерируют примерно одинаковые усилия, количество времени, в течение которого различные миозины остаются прочно связанными с актиновым филаментом после выполнения рабочего хода, как следует из данных измерений биохимической кинетики, сильно различается.

Вместе с тем, унитарная величина усилия, т. е. расстояние, на которое движется молекула миозина при гидролизе молекулы АТФ, сильно варьирует. Измерения одной молекулы также позволяют измерять унитарную величину усилия и послужили поддержкой для механизма плеча рычага при движении миозина. Величина усилия миозина также зависит от угла, на который поворачивается регуляторный домен, и



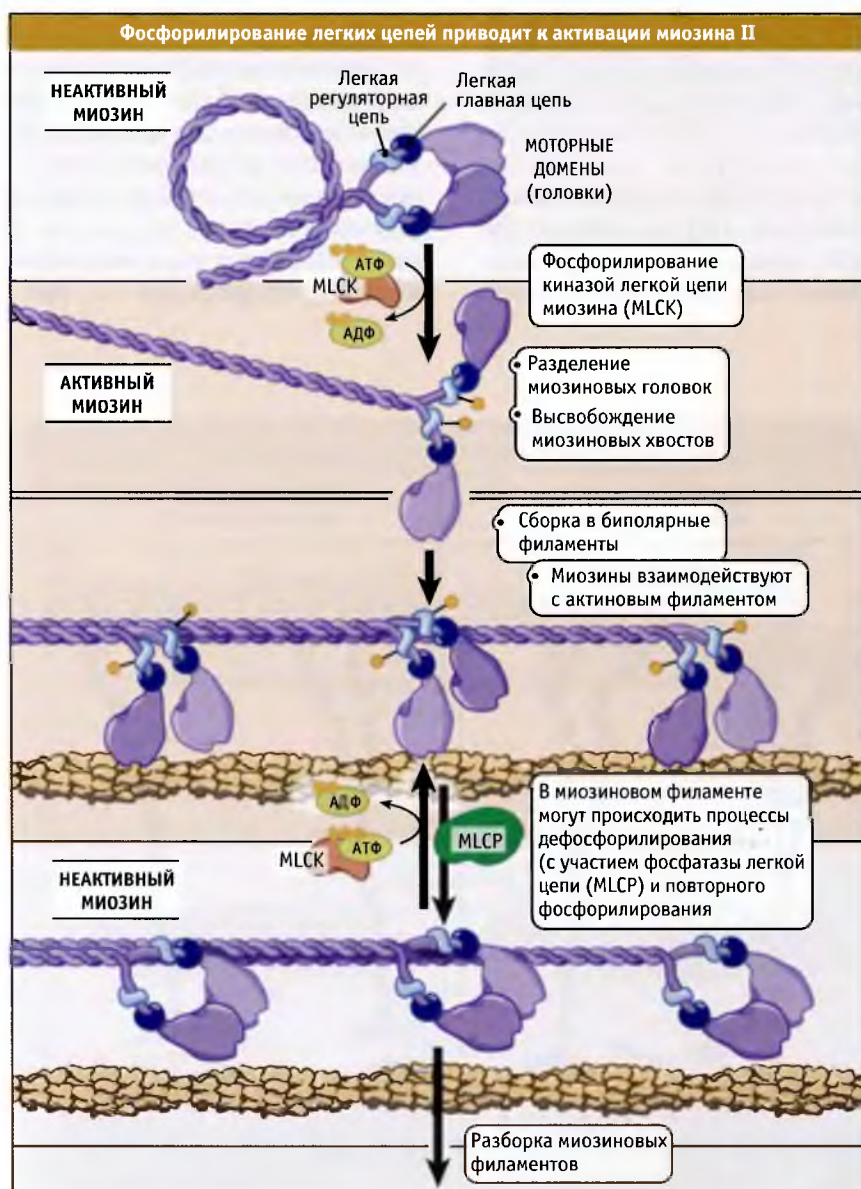
Расстояние, которое проходит миозин в расчете на затраченную молекулу АТФ, зависит от длины плеча рычага (регуляторного домена). По данным Warshaw, D.M. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2004. 25: 467–474

показывает, что миозины с более длинными регуляторными доменами обладают более длинными величинами усилия, чем миозины с короткими регуляторными доменами. Скорость скольжения (v) миозина равняется расстоянию (d), пройденному за единицу времени (t), и $v = d/t$. Поэтому миозин с большим усилием будет обладать более быстрой скоростью движения, чем миозин имеющий ту же самую АТФазную скорость, но меньший размер усилия.

8.20 Внутриклеточные функции и локализация миозинов регулируются различными путями

Основные положения

- Усилия, развиваемые миозинами, и их внутриклеточная локализация регулируются
- Функция миозина регулируется его фосфорилированием и при взаимодействии с белками, связывающимися с актином и миозином



Фосфорилирование немышечного миозина II киназой легкой цепи миозина приводит к его активации, которая обеспечивает образование миозинового филамента и его взаимодействие с актином. При дефосфорилировании, под действием фосфатазы легкой цепи миозина, происходит взаимодействие двух моторных доменов в молекуле, приводящее к их инактивации

Усилия, развиваемые миозинами, и их внутриклеточная локализация регулируются их фосфорилированием, а также при взаимодействии с белками, связывающимися с актином и миозином. К числу наиболее полно охарактеризованных регуляторов активности миозина относятся белки, связывающиеся с актиновыми филаментами, тропомиозин и тропонин, которые экспрессируются в клетках поперечнополосатых мышц (подробнее см. 8.21 *Миозин II участвует в мышечном сокращении*). В этом разделе мы рассмотрим каким образом регулируются функции миозинов с участием регуляторных и хвостовых доменов.

Активность некоторых миозинов регулируется фосфорилированием их легких цепей, которые связаны с регуляторным доменом. Наиболее полно охарактеризованы цитоплазматический миозин II, а также миозин, содержащийся в клетках гладких мышц. В этих миозинах каждая тяжелая цепь связана с одной легкой, которая называется основной легкой цепью, и с другой, которая называется регуляторной легкой цепью. Как показано на рис. 8.35, фосфорилирование легкой регуляторной цепи соответствующей миозиновой киназой легкой цепи (MLCK) приводит к активации миозина, а дефосфорилирование легкой цепи фосфатазой

(MLCP), к его ингибированию. Если легкая регуляторная цепь находится в нефосфорилированной форме, то два моторных домена молекулы миозина взаимодействуют между собой таким образом, что нарушается их способность к гидролизу АТФ и к связыванию актина. Также *in vitro* было показано, что нефосфорилированная молекула миозина может принимать «свернутую» конформацию, при которой ингибируется образование миозиновых филаментов. Правда, неизвестно, существует ли такая конформация молекулы миозина в клетке. Фосфорилирование легкой регуляторной цепи миозина приводит к нарушению внутримолекулярных взаимодействий, в результате которых проявляется ингибирующий эффект. При этом индуцируется образование миозиновых филаментов и активируется миозинная АТФаза.

Активность MLCK и MLCP регулируется с участием внутриклеточной системы передачи сигналов, включающей ионы кальция и белки семейства Rho, представляющие собой небольшие G-белки. При этом изменяется общее количество фосфорилированной и нефосфорилированной форм миозина-II. Фосфорилированный миозин II собирается в сократимые структуры, включающие стресс-фибриллы (см. рис. 8.1), цитокинетичес-

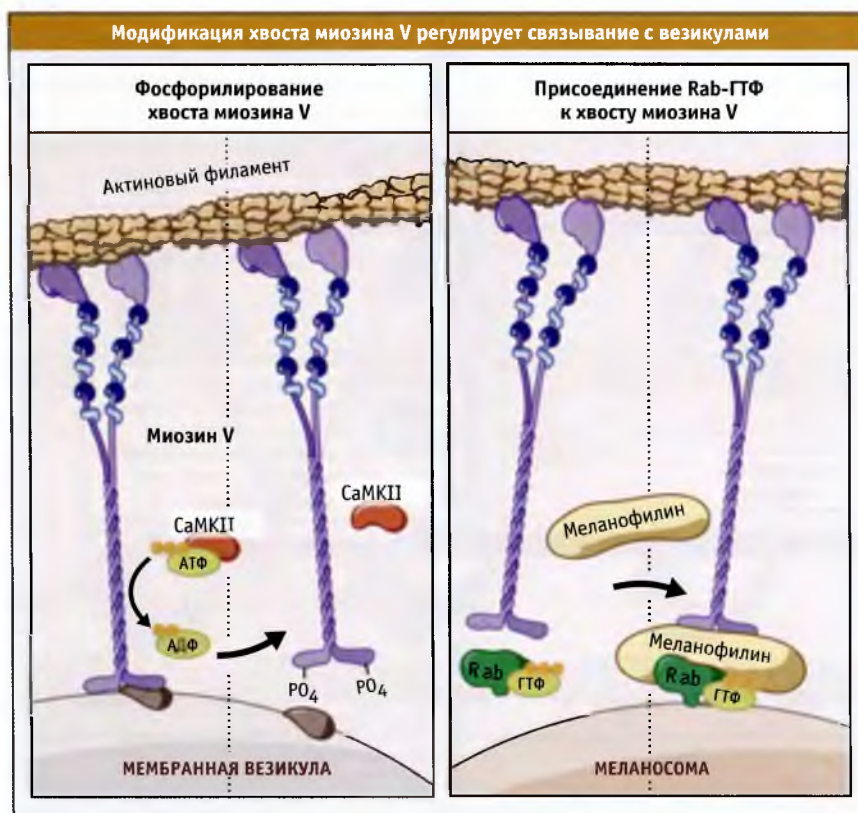


РИС. 8.36. Миозин V связывается с мембранными везикулами и транспортирует их вдоль актиновых филаментов. Связывание одних везикул с миозином V зависит от степени его фосфорилирования, в то время как связывание других, например меланосом, зависит от присутствия Rab-белков

кое кольцо и сократимые фибриллы, обеспечивающие сокращение гладких мышц (подробнее о внутриклеточных системах передачи сигналов см. 14 *Функционирование внутриклеточных систем передачи сигналов*).

Активность некоторых представителей семейства миозинов регулируется связыванием ионов кальция с легкими цепями, однако значение этого пути регуляции изучено недостаточно. Известно, что ионы кальция вызывают конформационные изменения легких цепей, что влияет на АТФазную активность миозина и его подвижность.

Хвостовые домены некоторых миозинов связываются с карго, например с внутриклеточными мембранами и белками, которые транспортируются по актиновым филаментам с участием миозина. Взаимодействие миозина с транспортируемыми объектами может регулироваться за счет фосфорилирования миозинового хвостового домена или при связывании с другими белками. Как показано на рисунке, хвост миозина V, содержащего две головки и способного транспортировать карго, может регулироваться по обоим механизмам. Фосфорилирование хвоста миозина V ослабляет его связывание с транспортируемыми объектами и приводит к диссоциации комплекса. Дефосфорилирование миозина приводит к связыванию с карго и к его транспорту по акти-

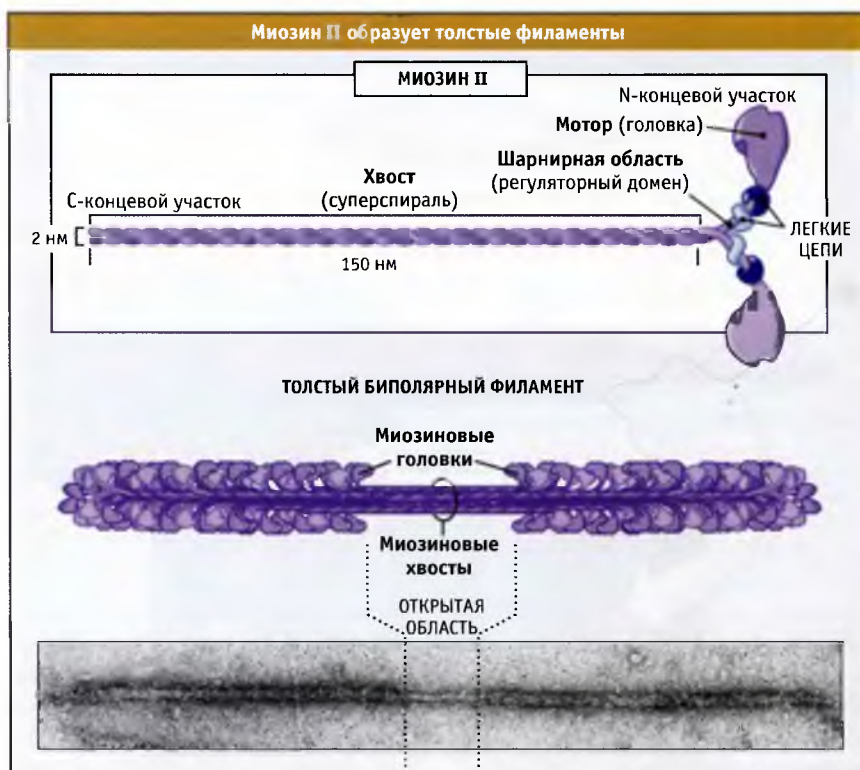
новым филаментам. Миозин V также взаимодействует с карго посредством ассоциации с семейством Rab малых G-белков. Этот миозин с высоким сродством связывается с ГТФ-связанным Rab, но имеет низкое сродство к комплексу ГДФ-Rab. Когда миозин V не связан с карго, он может принимать свернутую конфигурацию, которая вызывает ингибирование его АТФазной активности.

8.21 Миозин II участвует в мышечном сокращении

Основные положения

- Миозин II представляет собой мотор, обеспечивающий сокращение мышц
- Актин и миозин II являются основными компонентами саркомера, основной единицей сокращения поперечнополосатых мышц

Мышцы представляют собой ткань, способную к сокращению, которая обеспечивает движение тела и подвижность органов. В соответствии с внешним видом сократительных волокон, мышцы можно под-



Миозин II представляет собой гексамерный комплекс, состоящий из двух тяжелых цепей и двух пар различных легких цепей. Эти комплексы собираются в биполярные толстые филаменты. Фотография любезно предоставлена Андреа Вайсбергом и Саулом Вайнгардом, Пенсильванский университет

разделить на две основных группы: поперечнополосатые и гладкие. Волокна поперечнополосатых мышц называются так потому, что при большом увеличении можно видеть их характерную исчерченность. К этой группе относятся скелетные и сердечная мышцы. Скелетные мышцы обеспечивают подвижность скелета, а сердечная сокращение сердца. Волокна гладких мышц не исчерченные и имеют веретенообразную форму. Эти мышцы образуют стенки органов, например мочевого пузыря, кровеносных сосудов и желудочно-кишечного тракта.

Белковый мотор, который обеспечивает сокращение мышц, относится к семейству миозина-II (см. рис. 8.24). Этот миозин принадлежит к числу наиболее распространенных белков позвоночных, он легко выделяется и поэтому является одним из хорошо изученных белков. На рис. 8.37 представлено строение молекулы миозина II, состоящей из шести полипептидных цепей: двух тяжелых и двух наборов, каждый из которых состоит из двух легких цепей. Дистальный участок хвоста мышечного миозина II связан с другими молекулами миозина II, образуя волокна, состоящие примерно из 300 молекул миозина. Эти волокна биполярны, и моторные домены всех миозинов направлены от центральной зоны.

Эти волокна называются **толстые биполярные филаменты**. В настоящем разделе мы обсудим организацию и роль миозина II в сокращении поперечнополосатых мышц. Эти вопросы хорошо изучены.

Поперечнополосатые мышцы состоят из пучков мышечных волокон. Последние представляют собой крупные многоядерные клетки, длина которых варьирует от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров, а диаметр составляет 20–100 мкм. Рис. 8.38 показывает, что каждое мышечное волокно состоит более чем из 1000 миофибрилл, которые представляют собой палочковидные органеллы, способные к сокращению. Миофибриллы состоят из повторяющихся единиц, которые называются **саркомеры**. Саркомеры расположены друг за другом и обуславливают характерную исчерченность мышц.

Саркомеры представляют собой основные сокращающиеся единицы поперечнополосатых мышц; при сокращении и расслаблении мышцы их длина изменяется. Как показано на рис. 8.39, саркомеры содержат толстые филаменты, состоящие, главным образом, из биполярных филаментов миозина II, и тонких филаментов, которые содержат актиновые нити и регуляторные белки. Оперенные концы акти-

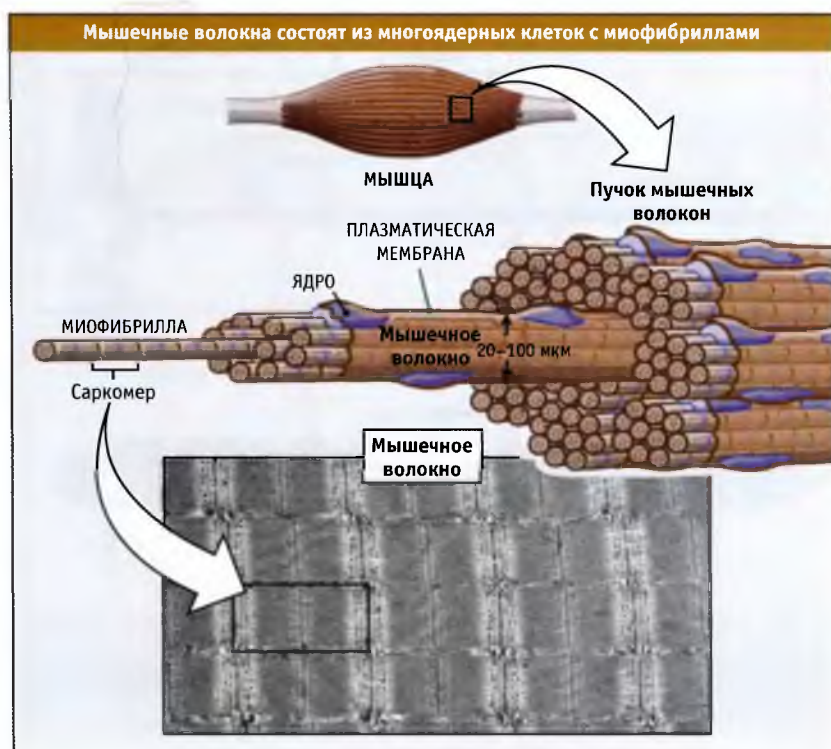
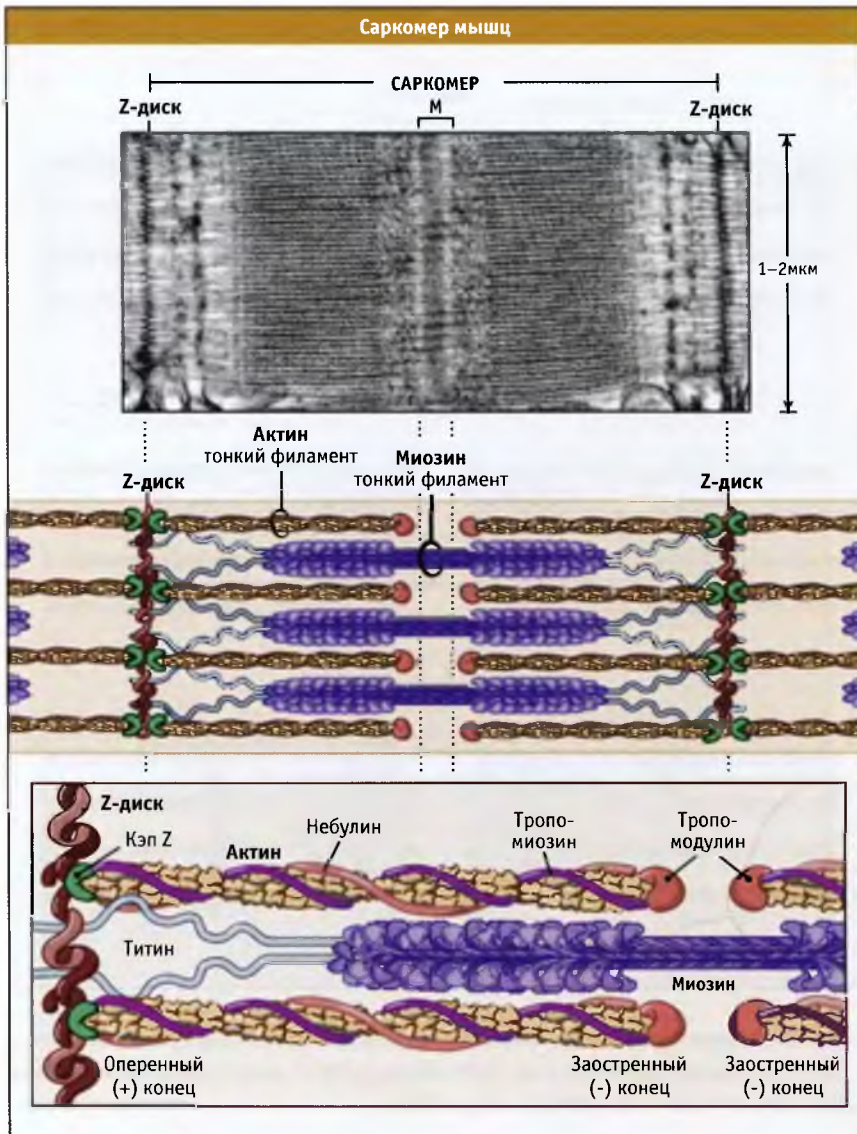


РИС. 8.38. Скелетные мышцы состоят из мышечных волокон, содержащих миофибриллы и представляющих собой удлиненные клетки. Миофибриллы способны к сокращению и содержат повторяющиеся структурные единицы, называемые саркомерами. Фотография любезно предоставлена Кларой Франчини-Армстронг, медицинский факультет Пенсильванского университета



На конце каждого саркомера находится Z-диск, к которому через CapZ (кэпирующий белок) присоединяются актиновые филаменты. Толстые миозиновые филаменты соединяются с Z-дисксом через белок титин и вплетаются между актиновыми филментами. Небулин проходит от Z-диска к тропомодулину. Однако как он связывает актин, пока неизвестно: Фотография лю-безно предоставлена Кларой Франчини-Армстронг, медицинский факультет Пенсильванского университета

новых филаментов с одной стороны прикреплены к структуре саркомера, которая носит название Z-диск. При этом все актиновые филаменты с одной стороны Z-диска имеют одинаковую полярность. Актиновые филаменты прикрепляются к Z-дису и кэпируются за счет связывания с кэпирующим белком (CapZ), что предотвращает деполимеризацию актиновых филаментов. Заостренные концы актиновых филаментов ориентированы к центру саркомера и кэпированы тропомодулином. С актиновыми филаментами также

взаимодействует белок небулин; он может регулировать сборку волокон и длину тонких филаментов.

Толстые филаменты находятся в центре, на М-линии, между Z-дисками. М-линия представляет собой структуру, состоящую из гибко связанных биполярных толстых филаментов; эти связи скрепляют толстые филаменты, гексагонально расположенные внутри. Наряду с М-линией, белок филаментов, который называется титином, образует эластичные связи между Z-дисками и миозиновыми волокнами. Титин обеспечивает центровку толс-

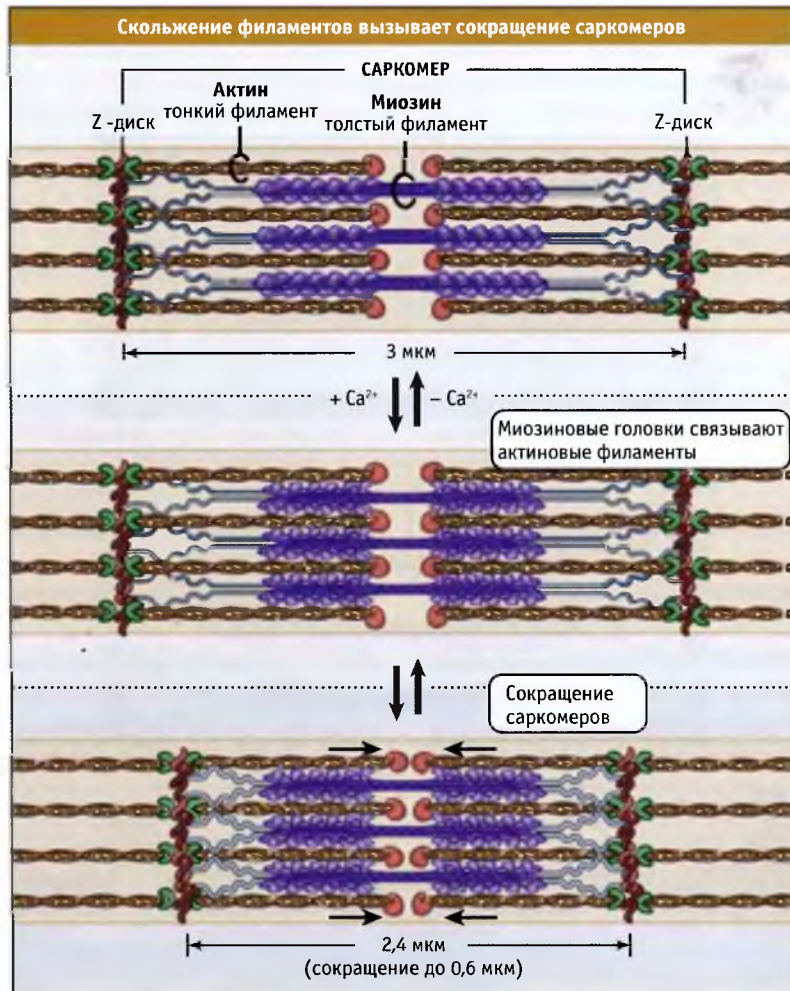


РИС. 8.40. Сокращение мышцы происходит, когда толстые миозиновые филаменты присоединяются к актиновым и перемещают их таким образом, что Z-диски сдвигаются относительно друг друга. При этом длина саркомера уменьшается

тых филаментов в саркомере и действует как пружина, которая не допускает растягиваться саркомеру.

Тонкие и толстые филаменты переплетаются, образуя трехмерную решетчатую структуру. Поскольку саркомер биполярен, в обеих половинах миозиновые моторы по отношению к актину ориентированы одинаково. При сокращении моторные домены миозина толстых филаментов взаимодействуют с актином тонких филаментов (РИС. 8.40). При сокращении саркомер укорачивается за счет скольжения тонких и толстых филаментов относительно друг друга, что сближает соседние Z-диски к центру саркомера. По мере продвижения головок миозина к зазубренным концам актиновых филаментов, длина толстых и тонких филаментов остается постоянной. Ширина саркомера в расслабленной мышце позвоночных составляет около 3 мкм, а при сокращении она становится около 2,4 мкм.

В мышечном волокне укорачиваются группы, состоящие из тысяч саркомеров, что приводит к укорачиванию всей мышцы. Общая длина укороченного мышечного волокна определяется двумя факторами: длиной, на которую укорачивается каждый саркомер, и количеством саркомеров в группе (). Процентная величина, на которую происходит укорачивание мышечных волокон, одна и та же, независимо от их длины.

Величина усилия, генерируемого саркомером, пропорционально числу акто-миозиновых взаимодействий в половине саркомера, а величина усилия, которое развивает мышечное волокно, пропорционально числу параллельно расположенных саркомеров. Таким образом, штангисты увеличивают свою силу за счет увеличения площади поперечного сечения мышц, а не за счет их длины.

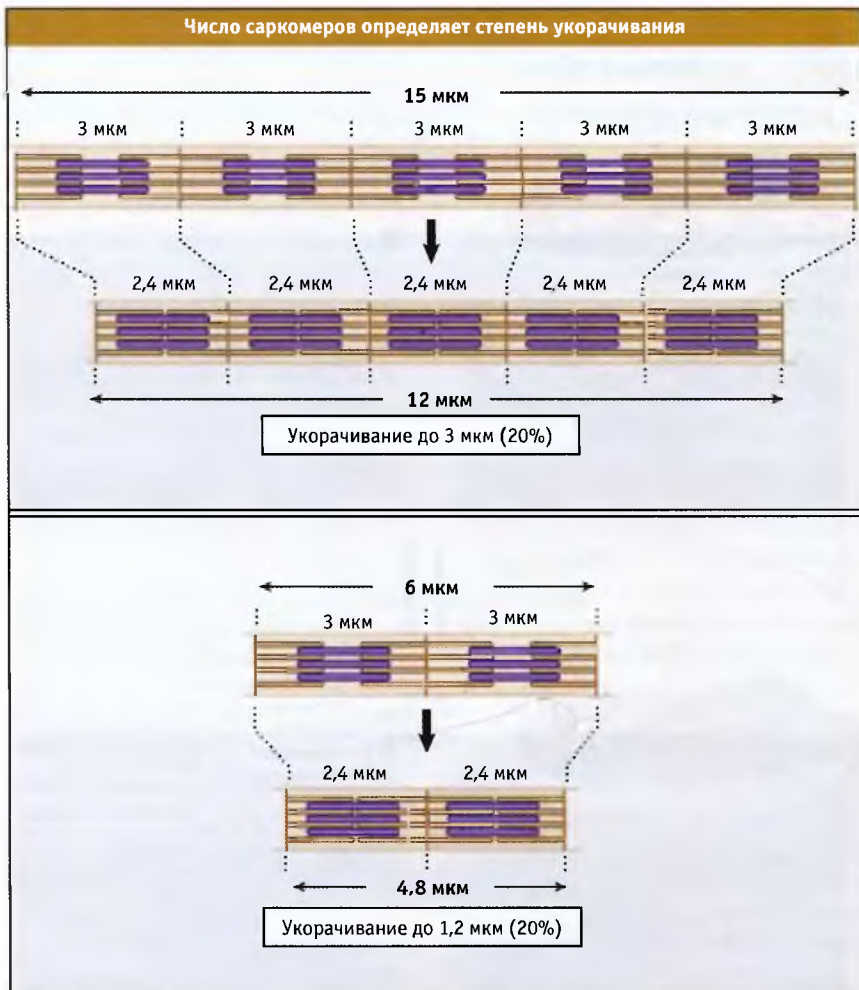


Рис. 3.43. Чем длиннее миофибрилла (т. е. чем больше саркомеров), тем более она укорачивается при сокращении. Однако в процентном отношении величина укорачивания не зависит от числа саркомеров

Как показано на рис. 3.43, сокращение поперечно-полосатых мышц регулируется с участием тропонин-тропомиозинового комплекса, который связан с актином в тонких филаментах. Молекулы тропомиозина представляют собой суперспирализованные полипептиды длиной 40 нм. Она располагаются друг за другом вдоль актиновых спиралей. Тропонин представляет собой комплекс из трех различных белков: тропонина С, тропонина I и тропонина Т. Один комплекс связывается с тропомиозином так, что они располагаются вдоль тонких филаментов через 40 нм интервалы.

При низких концентрациях ионов кальция тропомиозин находится в таком состоянии, что пространственно блокирует сайт связывания миозина на актине, так что мышца расслабляется и гидролиз АТФ под действием миозина происходит очень медленно. За счет взаимодействия актина с миозином релаксированные сар-

комеры способны к пассивному растяжению, оказывая небольшое сопротивление.

Нервные импульсы вызывают выход кальция в цитозоль из саркоплазматического ретикулума. Последний представляет собой органеллу, которая депонирует кальций в мышце. Повышение уровня кальция в цитозоле приводит к его связыванию с тропонином-С и к конформационным изменениям в молекуле белка. В результате этих изменений тропомиозин отходит от миозин-связывающего сайта в актине, и миозин получает возможность взаимодействовать с актином и генерировать усилия за счет механохимического цикла (рис. 8.32). (Подробнее о саркоплазматическом ретикулуме и высвобождении кальция см. 3.24 Морфологически и функционально ЭПР подразделяется на ряд отделов и 2.13 Сердечная и скелетные мышцы активируются за счет сопряжения процессов возбуждения и сокращения.)

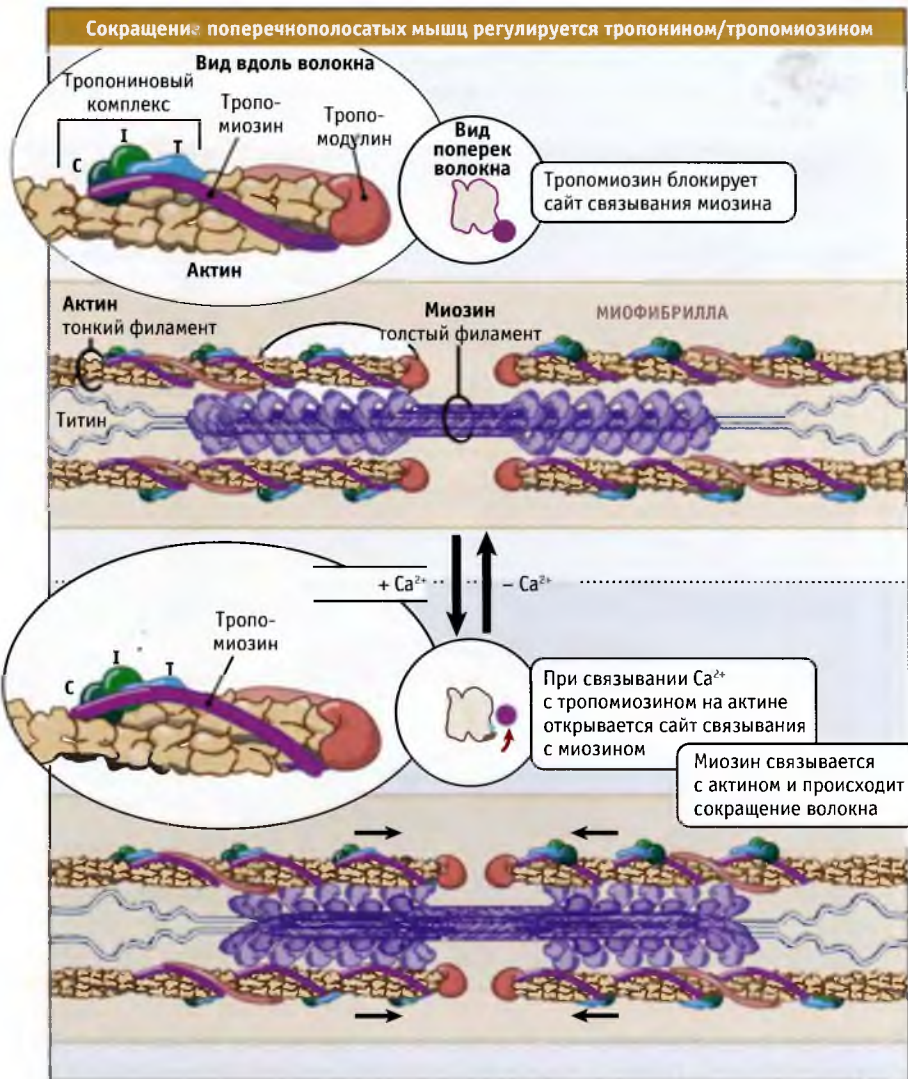


Рис. 8.42. Сокращение поперечнополосатых мышц регулируется уровнем Ca^{2+} в цитозоле, который определяет положение комплекса тропонин/тропомиозин относительно миозина и актина

8.22 Что дальше?

В исследованиях механизма полимеризации актина и контроля за этим процессом достигнут существенный прогресс. Однако еще предстоит выяснить, как различные пути передачи сигнала обеспечивают организацию актинового цитоскелета в функционально специализированные структуры. В частности, какие конкретные белки осуществляют нуклеацию, экпирование и образование сшивок при формировании филоподий? Какие белки необходимы для организации контрактильного кольца?

Три отдельных элемента цитоскелета (актиновые филаменты, микротрубочки и промежуточные филаменты) интенсивно взаимодействуют между собой. Например, транспортируемые везикулы и органеллы способны продвигаться по актиновым филаментам и микротрубочкам, моторы микротрубочек связываются с промежуточными филаментами и транспортируют их, а миозиновые моторы и другие белки, связывающие актин, обнаружены в комплексе с белками, связывающимися с микротрубочками. В настоящее время исследователи выясняют, каким образом взаимодействуют элементы цитоскелета и какие последствия имеют для клетки такие взаимодействия.

Многое еще предстоит выяснить в отношении функций большинства представителей семейства миозинов. Мы располагаем информацией о процессах, в которых принимают участие белки семейства миозинов, однако детали функционирования в этих процессах белковых моторов пока неизвестны. К числу наиболее актуальных вопросов относятся следующие: Почему для функционирования белков систем передачи сигнала необходимы моторные домены (миозин II, -IX, и -XVI)? Какую роль в эндоцитозе и движении мембран играют такие миозины, как миозин-I и -VI? Какова роль миозинов в регуляции структуры богатых актином клеточных выростов (миозин-I, -VI, -VII, и -XV)? Исследователи продолжают изучать биохимические, структурные и клеточные свойства миозинов, помогающие понять молекулярные механизмы их функционирования.

8.23 Резюме

Актиновый цитоскелет представляет собой опорную структуру, которая позволяет клетке принимать определенную форму, обеспечивает подвижность и изменение местоположения ее внутренних структур и органелл. Эти динамические свойства цитоскелета обеспечиваются за счет сборки и разборки актиновых филаментов, которые представляют собой структурно поляризованные полимеры, состоящие из актиновых мономеров. В клетке сборка актиновых филаментов из мономеров и процесс их обратной разборки находятся под строгим контролем со стороны многих белков, связывающихся с актином.

Эти белки регулируют полимеризацию новых актиновых филаментов, предотвращают полимеризацию актиновых мономеров, контролируют длину филаментов и сшивают их между собой. Взаимодействие процессов передачи сигнала с белками, связывающими актин, представляет собой один из способов контроля динамики и структурного состояния цитоскелета.

Миозины представляют собой белки, способные связываться с актином, которые для выполнения механической работы используют энергию, высвобождающуюся при гидролизе АТФ. Миозины обнаружены во всех клетках эукариот и представляют собой большое семейство белков, включающее, по меньшей мере, восемнадцать белковых групп. Структура и биохимические свойства различных изоформ миозинов, которые возникли в ходе эволюции, позволяют им выполнять в клетке разнообразные роли. Миозины участвуют в процессах мышечного и клеточного сокращения, в транспорте мембран и везикул, в регуляции формы и поляриности клеток, а также в системе передачи сигналов.

8.24 Приложение: Две модели, описывающие генерацию силы при сборке полимера

Каким образом добавление актиновых мономеров в филамент генерирует силу, необходимую для протрузии мембраны? Предложены две модели «броуновского колеса», описывающие, как в результате полимеризации актина генерируется усилие и происходит смещение частицы или границы мембраны. Обе модели предполагают наличие некоего компонента (актинового филамента или транспортируемой частицы), который находится в беспорядочном температурном (броуновском) движении. Также они постулируют, что концентрация актиновых мономеров превышает критическую, так что может происходить элонгация филамента. Однако модели различаются в зависимости от природы диффундирующего компонента (актиновый филамент или частица).

Согласно одной модели, актиновый филамент зафиксирован, обладает достаточной жесткостью и не может изгибаться. Частица (например, везикула) или мембрана (например, перемещающийся участок мембраны подвижных клеток) благодаря броуновскому движению постоянно меняет свое положение (рис. 8.43). Когда оперенный конец филамента находится в контакте с мембраной, его элонгация не происходит, поскольку свободные мономеры актина не могут присоединиться к оперенному концу. При движении частицы или мембраны за счет диффузии между ней и оперенным концом филамента образуется зазор. Когда этот зазор становится достаточно большим, происходит присоединение мономера и тем самым предотвращается диффузия частицы в обратном направлении (на рис. 8.43 влево). В результате предупреждения обратной диффузии и заполнения появляющихся промежутков между оперенным концом актинового филамента и частицей, изменяется характер движения частицы. Она начинается двигаться в определенном направлении (на рис. 8.43 направо). Скорость движения частицы зависит от того, насколько быстро она способна диффундировать, и от величины вероятности добавления нового актинового мономера (что, в свою очередь, определяется концентрацией актина и размером области, доступной для элонгации). При этом чем выше скорость диффузии частицы, тем быстрее происходит элонгация оперенного конца, и тем быстрее частица продвигается вправо.

Вторая модель учитывает способность филаментов и частиц участвовать в броуновском движении. Поскольку интенсивность движения пропорциональна величине частицы (более крупные частицы диффундируют медленнее, чем более мелкие), частицы, по размерам превышающие актиновые филаменты, считаются практически неподвижными. Актиновые филаменты неспособны к быстрой диффузии, однако за счет тем-



РИС. 3.4. Две модели, описывающие, каким образом полимеризация актиновых филаментов, присоединенных к оперенному концу, генерирует усилие, достаточное для продвижения мембраны или везикулы

пературного эффекта они могут сгибаться. Таким образом, за счет этого может открываться пространство между частицей и филаментом, в результате чего становится возможным добавление мономера к оперенному концу филамента. Согнувшийся филамент находится в напряженном состоянии и стремится выпрямиться. Это сила эластичности действует на частицу, которая при достаточной величине силы по мере выпрямления филамента перемещается.

Генерация силы происходит за счет реакции полимеризации и не требует энергии гидролиза АТФ. Гидролиз АТФ требуется для реутилизации актиновых субъединиц, с тем чтобы процесс мог произойти снова (см. 8.13 Подвижность клеток обеспечивается совместным функционированием актина и взаимодействующих с ним белков). Без реакции гидролиза и реутилизации мономера процесс происходит только один раз.

Список литературы

8.1 Введение

Обзор

Bray, D., 2001. *Cell Movements: From Molecules to Motility*. New York: Garland.

Sheterline, P., Clayton, J., and Sparrow, J.C., 1999. *Actin*, 4th Edition. Oxford: Oxford University Press.

8.2 Актин является широко распространенным белком цитоскелета

Обзор

Sheterline, P., Clayton, J., and Sparrow, J.C., 1999. *Actin*, 4th Edition. Oxford: Oxford University Press.

8.3 Мономерный актин связывает АТФ и АДФ

Исследования

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W., 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* v. 347 p. 44–49.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* v. 347 p. 37–44.

Tirion, M. M., and ben-Avraham, D., 1993. Normal mode analysis of G-actin. *J. Mol. Biol.* v. 230 p. 186–195.

8.4 Актиновые филаменты представляют собой структурно поляризованные полимеры

Обзор

Oosawa, F., and Asakura, S., 1975. *Thermodynamics of polymerization of protein*. London: Academic Press.

Исследования

Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W., 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* v. 347 p. 44–49.

Huxley, H. E., 1963. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* v. 16 p. 281–308.

Lorenz, M., Popp, D., and Holmes, K. C., 1993. Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J. Mol. Biol.* v. 234 p. 826–836.

Wegner, A., 1976. Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* v. 108 p. 139–150.

8.5 Полимеризация актина представляет собой многоступенчатый и динамичный процесс

Обзор

Frieden, C., 1985. Actin and tubulin polymerization: The use of kinetic methods to determine mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* v. 14 p. 189–210.

Oosawa, F., and Asakura, S., 1975. *Thermodynamics of polymerization of protein*. London: Academic Press.

Исследования

Pollard, T. D., 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* v. 103 p. 2747–2754.

Pollard, T. D., and Mooseker, M. S., 1981. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell Biol.* v. 88 p. 654–659.

Woodrum, D. T., Rich, S. A., and Pollard, T. D., 1975. Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method. *J. Cell Biol.* v. 67 p. 231–237.

8.6 Актиновые субъединицы гидролизуют АТФ после полимеризации

Обзор

Mitchison, T. J., 1992. Compare and contrast actin filaments and microtubules. *Mol. Biol. Cell* v. 3 p. 1309–1315.

Исследования

Carlier, M. F., Pantaloni, D., Evans, J. A., Lambooy, P. K., Korn, E. D., and Webb, M. R., 1988. The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. *FEBS Lett.* v. 235 p. 211–214.

Carlier, M. F., and Pantaloni, D., 1986. Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry* v. 25 p. 7789–7792.

Combeau, C., and Carlier, M. F., 1988. Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF₃ and AlF₄-. *J. Biol. Chem.* v. 263 p. 17429–17436.

Cooke, R., 1975. The role of the bound nucleotide in the polymerization of actin. *Biochemistry* v. 14 p. 3250–3256.

Pollard, T. D., 1984. Polymerization of ADP-actin. *J. Cell Biol.* v. 99 p. 769–777.

Pollard, T. D., and Mooseker, M. S., 1981. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell Biol.* v. 88 p. 654–659.

Pollard, T. D., and Weeds, A. G., 1984. The rate constant for ATP hydrolysis by polymerized actin. *FEBS Lett.* v. 170 p. 94–98.

Wegner, A., 1976. Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* v. 108 p. 139–150.

8.7 Белки, связывающиеся с актином, регулируют его полимеризацию и организацию филаментов

Обзор

dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., and Nosworthy, N. J., 2003. Actin binding proteins: Regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* v. 83 p. 433–473.

Zigmond, S. H., 2004. Beginning and ending an actin filament: Control at the barbed end. *Curr. Top. Dev. Biol.* v. 63 p. 145–188.

8.8 Белки, связывающиеся с актиновыми мономерами, влияют на их полимеризацию

Исследования

Mockrin, S. C., and Korn, E. D., 1980. Acanthamoeba profilin interacts with G-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* v. 19 p. 5359–5362.

Safer, D., Elzinga, M., and Nachmias, V. T., 1991. Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J. Biol. Chem.* v. 266 p. 4029–4032.

Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C., and Lindberg, U., 1993. The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* v. 365 p. 810–816.

Tilney, L. G., Bonder, E. M., Coluccio, L. M., and Mooseker, M. S., 1983. Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: A behavior regulated by profilin. *J. Cell Biol.* v. 97 p. 112–124.

8.9 Полимеризация актина в клетке контролируется белками нуклеации

Обзор

Pollard, T. D., and Borisy, G. G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* v. 112 p. 453–465.

Vartiainen, M. K., and Machesky, L. M., 2004. The WASP-Arp2/3 pathway: Genetic insights. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 174–181.

Zigmond, S. H., 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 99–105.

Исследования

Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D., 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* v. 127 p. 107–115.

Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E., and Pollard, T. D., 1999. Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 96 p. 3739–3744.

Robinson, R. C., Turbedsky, K., Kaiser, D. A., Marchand, J. B., Higgs, H. N., Choe, S., and Pollard, T. D., 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* v. 294 p. 1679–1684.

8.10 Длина актиновых филаментов регулируется кэпирующими белками

Обзор

Fischer, R. S., and Fowler, V. M., 2003. Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol.* v. 13 p. 593–601.

Wear, M. A., and Cooper, J. A., 2004. Capping protein: new insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem. Sci.* v. 29 p. 418–428.

Yin, H. L., and Janmey, P. A., 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* v. 65 p. 761–789.

Zigmond, S. H., 2004. Beginning and ending an actin filament: Control at the barbed end. *Curr. Top. Dev. Biol.* v. 63 p. 145–188.

8.11 Динамика актиновых филаментов регулируется с помощью разрезающих и деполимеризующих белков

Обзор

Bamburg, J. R., 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: Essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 15 p. 185–230.

Исследования

Galkin, V. E., Orlova, A., VanLoock, M. S., Shvetsov, A., Reisler, E., and Egelman, E. H., 2003. ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments. *J. Cell Biol.* v. 163 p. 1057–1066.

McGough, A., Pope, B., Chiu, W., and Weeds, A., 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* v. 138 p. 771–781.

8.12 Сшивающие белки организуют актиновые филаменты в пучки и ортогональные сети

Обзор

Kreis, T., and Vale, R., 1999. *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford: Oxford University Press.

8.13 Подвижность клеток обеспечивается совместным функционированием актина и взаимодействующих с ним белков

Обзор

Bray, D., 2001. *Cell Movements: From Molecules to Motility*. New York: Garland.

Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D., 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* v. 29 p. 545–576.

Pollard, T. D., and Borisy, G. G., 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* v. 112 p. 453–465.

Rafelski, S. M. and Theriot, J. A., 2004. Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* v. 73 p. 209–239.

Исследования

Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F., 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* v. 401 p. 613–616.

Svitkina, T. M., and Borisy, G. G., 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* v. 145 p. 1009–1026.

Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G., and Portnoy, D. A., 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* v. 357 p. 257–260.

Theriot, J. A., and Mitchison, T. J., 1991. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* v. 352 p. 126–131.

Wang, Y. L., 1985. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J. Cell Biol.* v. 101 p. 597–602.

8.14 Полимеризация актина регулируется малыми G-белками

Обзор

Raftopoulou, M., and Hall, A., 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* v. 265 p. 23–32.

8.15 Миозины представляют собой молекулярные моторы, связанные с актином, которые играют существенную роль во многих клеточных процессах

Обзор

Balasubramanian, M. K., Bi, E., and Glotzer, M., 2004. Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr. Biol.* v. 14 p. R806–R818.

Berg, J. S., Powell, B. C., and Cheney, R. E., 2001. A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* v. 12 p. 780–794.

De La Cruz, E. M., and Ostap, E. M., 2004. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 61–67.

Hasson, T., 2003. Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J. Cell Sci.* v. 116 p. 3453–3461.

Hirokawa, N., and Takemura, R., 2003. Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Biochem. Sci.* v. 28 p. 558–565.

Howard, J., 2001. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Kreis, T., and Vale, R., 1999. *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford: Oxford University Press.

Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F., 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* v. 84 p. 359–369.

Sellers, J., 1999. *Myosins*, 2nd Edition. Oxford: Oxford University Press.

Sokac, A. M., and Bement, W. M., 2000. Regulation and expression of metazoan unconventional myosins. *Int. Rev. Cytol.* v. 200 p. 197–304.

Soldati, T., 2003. Unconventional myosins, actin dynamics and endocytosis: a ménage à trois? *Traffic* v. 4 p. 358–366.

Исследования

Avraham, K. B., Hasson, T., Steel, K. P., Kingsley, D. M., Russell, L. B., Mooseker, M. S., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A., 1995. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat. Genet.* v. 11 p. 369–375.

Holt, J. R., Gillespie, S. K., Provance, D. W., Shah, K., Shokat, K. M., Corey, D. P., Mercer, J. A., and Gillespie, P. G., 2002. A chemical-genetic strategy implicates myosin-1c in adaptation by hair cells. *Cell* v. 108 p. 371–381.

Lee, S. J., and Montell, C., 2004. Light-dependent translocation of visual arrestin regulated by the NINAC myosin III. *Neuron* v. 43 p. 95–103.

- Liang, Y., et al., 1999. Characterization of the human and mouse unconventional myosin XV genes responsible for hereditary deafness DFNB3 and shaker 2. *Genomics* v. 61 p. 243–258.
- Müller, R. T., Honnert, U., Reinhard, J., and Bähler, M., 1997. The rat myosin myr 5 is a GTPase-activating protein for Rho in vivo: essential role of arginine 1695. *Mol. Biol. Cell* v. 8 p. 2039–2053.
- Novak, K. D., Peterson, M. D., Reedy, M. C., and Titus, M. A., 1995. Dictyostelium myosin I double mutants exhibit conditional defects in pinocytosis. *J. Cell Biol.* v. 131 p. 1205–1221.
- Patel, K. G., Liu, C., Cameron, P. L., and Cameron, R. S., 2001. Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits 1alpha and 1gamma1. *J. Neurosci.* v. 21 p. 7954–7968.
- Richards, T. A., and Cavalier-Smith, T., 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* v. 436 p. 1113–1118.
- Tuxworth, R. I., Weber, I., Wessels, D., Addicks, G. C., Soll, D. R., Gerisch, G., and Titus, M. A., 2001. A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. *Curr. Biol.* v. 11 p. 318–329.
- Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J., and Weston, M. D., 1995. Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* v. 374 p. 60–61.
- Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B., and Hammer, J. A., 1997. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: Evidence that myosin V is an organelle motor. *J. Cell Sci.* v. 110 (Pt 7) p. 847–859.
- 8.16 Миозины содержат три структурных домена**
- Обзор**
- Geeves, M. A., and Holmes, K. C., 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* v. 68 p. 687–728.
- Holmes, K. C., and Geeves, M. A., 2000. The structural basis of muscle contraction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* v. 355 p. 419–431.
- Krendel, M., and Mooseker, M. S., 2005. Myosins: Tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)* v. 20 p. 239–251.
- Warshaw, D. M., 2004. Lever arms and necks: A common mechanistic theme across the myosin superfamily. *J. Muscle Res. Cell Motil.* v. 25 p. 467–474.
- Исследования**
- Kull, F. J., Sablin, E. P., Lau, R., Fletterick, R. J., and Vale, R. D., 1996. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* v. 380 p. 550–555.
- Rayment, I., Holden, H. M., Whittaker, M., Yohn, C. B., Lorenz, M., Holmes, K. C., and Milligan, R. A., 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* v. 261 p. 58–65.
- Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. N., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G., and Holden, H. M. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* v. 261 p. 50–58.
- Toyoshima, Y. Y., Toyoshima, C., and Spudich, J. A., 1989. Bidirectional movement of actin filaments along tracks of myosin heads. *Nature* v. 341 p. 154–156.
- Warshaw, D. M., Guilford, W. H., Freyzon, Y., Kremmentsova, E., Palmiter, K. A., Tyska, M. J., Baker, J. E., and Trybus, K. M., 2000. The light chain binding domain of expressed smooth muscle heavy meromyosin acts as a mechanical lever. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 37167–37172.
- 8.17 Гидролиз АТФ под действием миозина представляет собой многоступенчатый процесс**
- Обзор**
- De La Cruz, E. M., and Ostap, E. M., 2004. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 61–67.
- Geeves, M. A., and Holmes, K. C., 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* v. 68 p. 687–728.
- Vale, R. D., and Milligan, R. A., 2000. The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* v. 288 p. 88–95.
- Исследования**
- Lymn, R. W., and Taylor, E. W., 1971. Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry* v. 10 p. 4617–4624.
- 8.18 Кинетические свойства миозиновых моторов приспособлены к выполнению их внутриклеточной роли**
- Обзор**
- De La Cruz, E. M., and Ostap, E. M., 2004. Relating biochemistry and function in the myosin superfamily. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 16 p. 61–67.
- Исследования**
- Sellers, J. R., and Veigel, C., 2006. Walking with myosin V. *Curr. Opin. Cell Biol.* v. 18 p. 68–73.
- 8.19 Миозин перемещается на нанометровые расстояния и генерирует усилия в несколько пиконьютонов**
- Обзор**
- Guilford, W. H., and Warshaw, D. M., 1998. The molecular mechanics of smooth muscle myosin. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* v. 119 p. 451–458.
- Howard, J., 2001. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Warshaw, D. M., 2004. Lever arms and necks: a common mechanistic theme across the superfamily. *J. Muscle Res. Cell Motil.* v. 25 p. 467–474.
- Исследования**
- Finer, J. T., Simmons, R. M., and Spudich, J. A., 1994. Single myosin molecule mechanics: Piconewton forces and nanometre steps. *Nature* v. 368 p. 113–119.
- Warshaw, D. M., Guilford, W. H., Freyzon, Y., Kremmentsova, E., Palmiter, K. A., Tyska, M. J., Baker, J. E., and Trybus, K. M., 2000. The light chain binding domain of expressed smooth muscle heavy meromyosin acts as a mechanical lever. *J. Biol. Chem.* v. 275 p. 37167–37172.

8.20 Внутриклеточные функции и локализация миозинов регулируются различными путями

Обзор

- Bähler, M., and Rhoads, A., 2002. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.* v. 513 p. 107–113.
- Matsumura, F., 2005. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol.* v. 15 p. 371–377.
- Somlyo, A. P., and Somlyo, A. V., 2003. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol. Rev.* v. 83 p. 1325–1358.

Исследования

- Adelstein, R. S., and Conti, M. A., 1975. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature* v. 256 p. 597–598.
- Karcher, R. L., Roland, J. T., Zappacosta, F., Huddleston, M. J., Annan, R. S., Carr, S. A., and Gelfand, V. I., 2001. Cell cycle regulation of myosin-V by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Science* v. 293 p. 1317–1320.
- Wang, F., Thirumurugan, K., Stafford, W. F., Hammer, J. A., Knight, P. J., and Sellers, J. R., 2004. Regulated conformation of myosin V. *J. Biol. Chem.* v. 279 p. 2333–2336.

- Wendt, T., Taylor, D., Messier, T., Trybus, K. M., and Taylor, K. A., 1999. Visualization of head-head interactions in the inhibited state of smooth muscle myosin. *J. Cell Biol.* v. 147 p. 1385–1390.
- Wu, X., Bowers, B., Wei, Q., Kocher, B., and Hammer, J. A., 1997. Myosin V associates with melanosomes in mouse melanocytes: Evidence that myosin V is an organelle motor. *J. Cell Sci.* v. 110 (Pt 7) p. 847–859.

8.21 Миозин II участвует в мышечном сокращении

Обзор

- Bagshaw, C. R., 1992. *Muscle Contraction*, 2nd Edition. London: Chapman and Hall.
- Engel, A. G., and Franzini-Armstrong, C., 2004. *Myology*. New York: McGraw-Hill.

8.24 Приложение: Две модели, описывающие генерацию силы при сборке полимера

Исследования

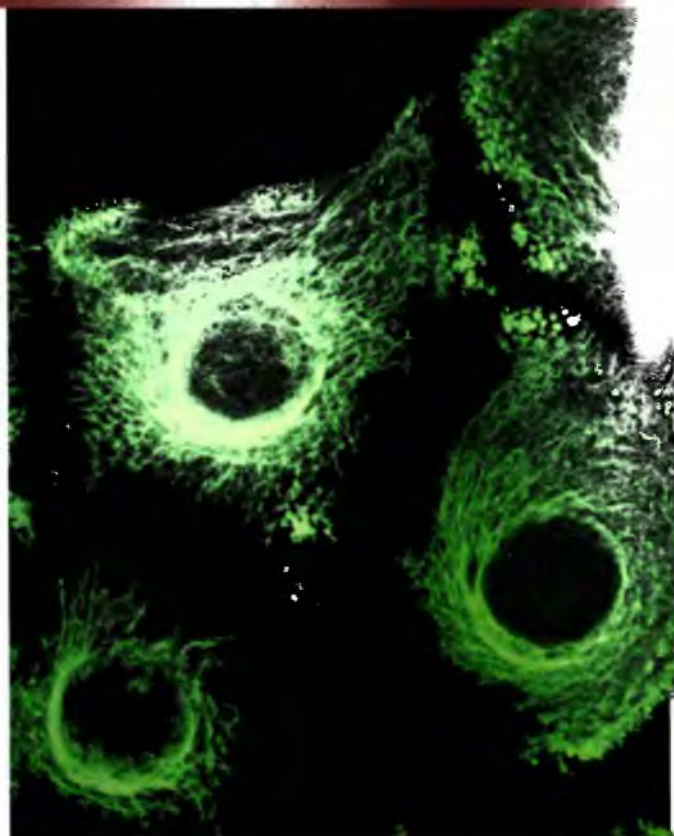
- Peskin, C. S., Odell, G. M., and Oster, G. F., 1993. Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys. J.* v. 65 p. 316–324.

Промежуточные филаменты

Биржитт Лейн

Центр молекулярной медицины, Сингапур

Мутации в кератине, которые являются причиной повышенной повреждаемости кожи *in vivo*, приводят к разрыву филаментов при механических воздействиях на культуру клеток. Воспроизведено из работы Russell, D., Andrews, P. D., Lane, E. B. *J. Cell. Sci.* 2004. 117: 5233–5243. Фотография любезно предоставлена Биржитт Лейн, Центр Молекулярной медицины, Сингапур



КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ГЛАВЫ

- 9.1** Введение
- 9.2** Шесть групп белков промежуточных филаментов обладают сходным строением, но экспрессируются по-разному
- 9.3** Две самые большие группы белков промежуточных филаментов представляют собой кератины типа I и II
- 9.4** Мутации в кератинах снижают механическую прочность эпителиальных клеток
- 9.5** Белки промежуточных филаментов в нервной, мышечной и соединительной тканях часто ко-экспрессируются
- 9.6** Промежуточные филаменты ламины укрепляют ядерную мембрану
- 9.7** Даже два разных белка филаментов хрусталика сохранили свою структуру в процессе эволюции

- 9.8** Субъединицы промежуточных филаментов обладают высоким сродством друг к другу и полимеризуются в механически прочные структуры
 - 9.9** Конформация молекул белков промежуточных филаментов регулируется с помощью посттрансляционных модификаций
 - 9.10** Белки, которые ассоциированы с промежуточными филаментами, являются факультативными, а не основными
 - 9.11** Гены белков промежуточных филаментов присутствуют на всем протяжении эволюции метазоа
 - 9.12** Что дальше?
 - 9.13** Резюме
- Список литературы

- Промежуточные филаменты представляют собой основные компоненты ядерного и цитоплазматического цитоскелета
- Промежуточные филаменты необходимы для поддержания правильной структуры тканей и их функционирования
- По диаметру промежуточные филаменты находятся между актиновыми филаментами и микротрубочками и образуют прочные сети
- Промежуточные филаменты представляют собой полимеры, состоящие из белковых субъединиц
- Белки, из которых состоят промежуточные филаменты, гетерогенны и кодируются семейством больших и сложно устроенных генов
- У человека более 50 болезней обусловлены возникновением мутаций в белках промежуточных филаментов

Микротрубочки, актиновые филаменты (микрофиламенты) и **промежуточные филаменты** представляют собой три основные системы белковых филаментов, составляющих цитоскелет. Промежуточные филаменты образуют в цитоплазме и ядре сеть (Рис. 9.1) и присутствуют во всех клетках метазоа (животных). В отличие от микротрубочек и актиновых филаментов, которые необходимы даже для выживания изолированных клеток *in vitro*, основная функция промежуточных филаментов проявляется на уровне тканевой организации, где они необходимы для надлежащего функционирования тканей и органов. Некоторые типы промежуточных филаментов участвуют в скреплении клеток друг с другом, что необходимо для формирования тканей.

Белки промежуточных филаментов кодируются несколькими большими семействами генов. Эти белки образуют сложную систему филаментов, на долю которых в клетке в нормальных физиологических условиях приходится до 80% общего клеточного белка. Внутриклеточное распределение промежуточных филаментов отличается от характерного для актино-

вых филаментов и микротрубочек. Гистологи обнаружили их (в виде нейрофибрилл нейронов и тонофиламентов клеток эпидермиса) задолго до того, как в 1960-х гг. при электронно-микроскопическом исследовании мышечной ткани были описаны индивидуальные филаменты. В клетках мышц «промежуточные» филаменты занимали по диаметру среднее положение между «толстыми филаментами» миозина-II и «тонкими филаментами» актина. Их средний диаметр составляет около 10 нм, т. е. они толще, чем актиновые филаменты (около 8 нм), и тоньше микротрубочек (около 25 нм). Все три системы филаментов представлены на Рис. 9.1.

Белки промежуточных филаментов характеризуются общей молекулярной структурой и полимеризуются в филаменты, обладающие высокой механической прочностью. В электронном микроскопе они выглядят одинаково. У высших позвоночных семейство соответствующих белков организовано наиболее сложно, и этот вопрос будет рассмотрен в настоящей главе. Похожие промежуточные филаменты также обнаружены у беспозвоночных, однако у них количество генов, кодирующих соответствующие белки, значительно меньше, чем у позвоночных. Также промежуточные филаменты беспозвоночных менее гетерогенны и обладают меньшей тканевой специфичностью, чем у млекопитающих. В геноме человека находится порядка 70 генов, кодирующих белки промежуточных филаментов. Принимая во внимание альтернативный сплайсинг для пары из них, общее количество этих белков приближается к 75. Они представлены гораздо большим числом вариантов и более гетерогенны, чем актиновые или тубулиновые белки. Для всех белков промежуточных филаментов характерна тканеспецифическая экспрессия. Также их экспрессия изменяется в процессе дифференцировки.

Большинство сведений, касающихся экспрессии и биохимических свойств промежуточных филамен-

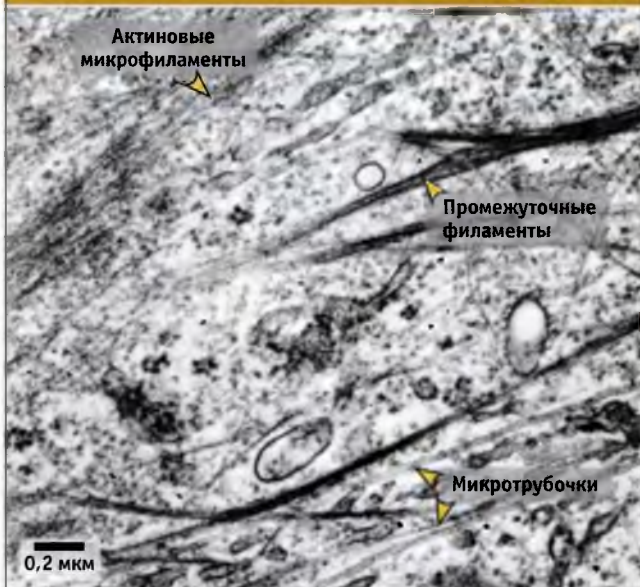


Распределение различных типов промежуточных филаментов в культивируемых фибробластах. Иммунофлуоресцентное окрашивание на виментин и ламин В. Виментин находится в цитоплазме, а ламин В в ядре. Фотография любезно предоставлена Джоном Коммоном и Биржитт Лейн, Центр молекулярной медицины, Сингапур

Шесть групп белков промежуточных филаментов обладают сходным строением, но экспрессируются по-разному

Основные положения

- Все белки промежуточных филаментов обладают одинаковым строением и имеют общий элемент, представляющий собой центральный стержнеобразный α -спирализованный домен
- Семейство белков промежуточных филаментов подразделяется на шесть групп, представители каждой из которых содержат гомологичную последовательность аминокислот
- Различные типы промежуточных филаментов характеризуются разным типом экспрессии в тканях
- Антитела к индивидуальным белкам промежуточных филаментов представляют собой ценные инструменты для исследования дифференцировки клеток и различных патологических процессов



Основные компоненты цитоскелета в электронном микроскопе. На ультратонком срезе клетки эпителия почки видны актиновые микрофиламенты, промежуточные филаменты K8/K18 и микротрубочки. Фотография воспроизведена из *The Keratinocyte Handbook*, ed. by Leigh, I. M., et al. © Cambridge University Press, 1994. Фотография любезно предоставлена Биржитт Лейн, Биологический факультет, Университет Данди

тов, были получены до того, как были установлены их функции и связь с некоторыми заболеваниями. Сейчас показано, что мутации в генах белков промежуточных филаментов связаны с многими генетическими заболеваниями, которые характеризуются различными фенотипическими проявлениями. Они включают по меньшей мере 50 отдельных болезней, от фликтены до прогерии. Почти все типы генов белков промежуточных филаментов связаны с той или иной формой проявления хрупкости тканей. Это позволяет предполагать, что для функционирования ткани *in vivo* необходима надлежащая механическая прочность и что в значительной степени она прямо или опосредованно связана с промежуточными филаментами. Принимая во внимание, что экспрессия генов белков промежуточных филаментов носит тканеспецифический характер, весьма возможно, что все эти белки придают клеткам тканей мельчайшие оттенки различия. Клеткам тканей необходимы различные свойства, такие как прочность, пластичность, быстрота сборки и разборки структур, обеспечивающих прочность. Может быть, в этом кроется причина того, что в ходе эволюции возникло столь много генов, кодирующих белки промежуточных филаментов.

На основании структуры ДНК и степени гомологии аминокислотных последовательностей семейство белков промежуточных филаментов подразделяется на шесть групп. Существование этих групп может говорить о тканеспецифической экспрессии белков. Почти все белки промежуточных филаментов обладают сходным строением, и их молекулы построены по общему принципу. Все они собираются в филаментарные структуры, диаметр которых по данным электронной микроскопии составляет порядка 10 нм. Их молекулы имеют удлинённую форму и содержат длинный стержнеобразный α -спиральный домен, ограниченный не организованными в спираль головными и хвостовыми доменами (рис. 9.3). Стержнеобразный домен имеет четыре α -спиральных сегмента (1A, 1B, 2A и 2B), которые разделены «линкерными» участками (L1, L12 и L2). На основании первичной структуры считают, что эти линкеры не образуют спиральную конфигурацию. Длина стержнеобразного домена промежуточных филаментов у всех клеток млекопитающих примерно одинакова (около 350 аминокислот). Молекулярная масса большинства белков промежуточных филаментов находится между 40 и 70 кДа.

На границах стержнеобразного домена промежуточных филаментов находятся консервативные последовательности аминокислот (см. рис. 9.3). Последние 12 остатков аминокислот стержнеобразного домена представляют собой спирализованный терминальный мотив, обычно имеющий структуру Glu-Ile-Ala-Thr-Tyr-Arg-(X)-Leu-Leu-Glu-Gly-Glu (где X — любая аминокислота). Эта последовательность является сигнальной и присутствует во всех белках промежуточных филаментов. Самое начало спирализованной последовательности, расположенной на N-конце стержнеобразного домена, более варибельно по своей структуре. Консервативность структуры этих двух спирализованных пограничных последовательностей позволяет предполагать, что они имеют особое функциональное значение, и существует много экспери-

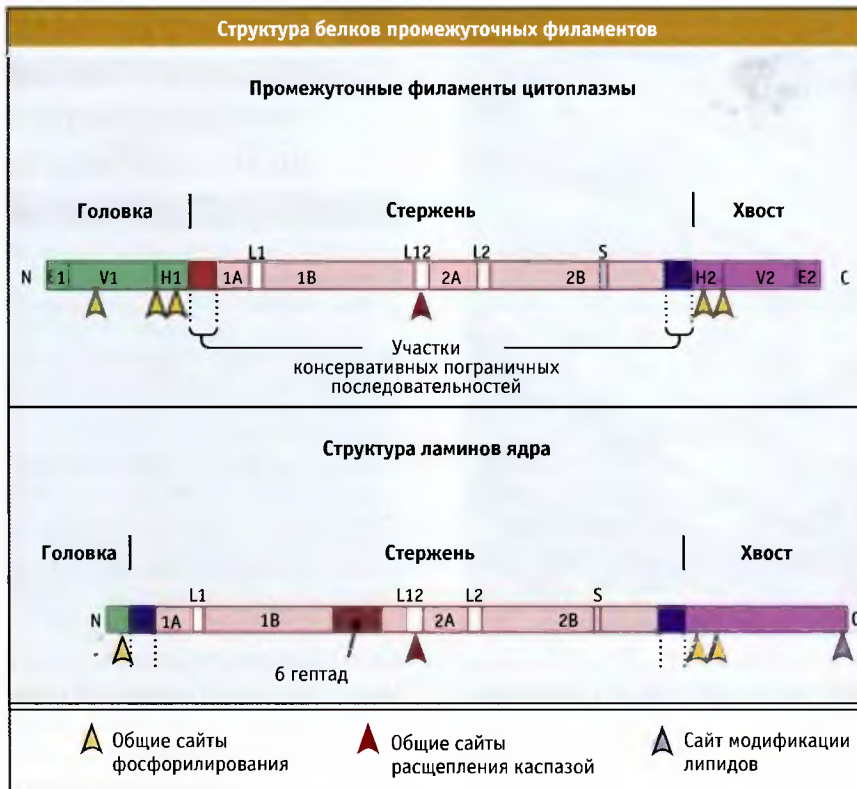


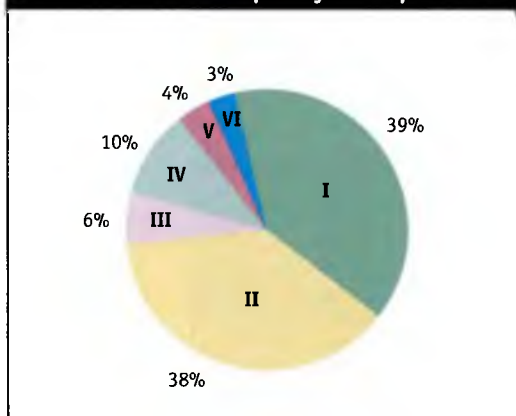
Рис. 9.3 Общая структура белков промежуточных филаментов человека, построенная по данным секвенирования. Все белки промежуточных филаментов имеют центральный стержневой домен и боковые головной и хвостовой домены. Этот тип общей структуры лучше всего соответствует белкам типов II, III, и VI. У белков типа I отсутствуют области H1/H2, а у белков типа V нет доменов E/V. Для белков ламины позвоночных и филаментов беспозвоночных показано наличие дополнительных аминокислот, удлиняющих стержневой домен. Стрелками отмечено положение сайтов фосфорилирования (в молекулах некоторых белков промежуточных филаментов присутствуют дополнительные сайты фосфорилирования), сайты атаки каспаз и общие сайты модификации ламинарных липидов

ментальных данных в пользу того, что они могут являться местами связи при взаимодействии белковых субъединиц в процессе сборки филаментов. Мутации в этих доменах характеризуются разрушительным действием и вызывают развитие тяжелых патологий (см. 9.4 *Мутации в кератинах снижают механическую прочность эпителиальных клеток*). К числу двух других характерных особенностей последовательности стержнеобразного домена относится нерегулярность цепи 2B, получившей название «запирание» (S на рис. 9.3), и вставки кластеров аминокислот, несущих положительный и отрицательный заряд. Эти кластеры расположены вдоль поверхности α -спирали, повторяясь через каждые 9,5 остатков. Они участвуют в латеральных взаимодействиях доменов стержнеобразной структуры при сборке филаментов (см. 9.8 *Субъединицы промежуточных филаментов обладают высоким сходством друг к другу и полимеризуются в механически прочные структуры*).

По сравнению со стержнеобразными доменами, структура N-концевого головного и C-концевого

хвостового доменов гораздо более вариабельна. Это относится и к длине, и к первичной структуре. Обычно в каждом из концевых доменов различают три различных субдомена: крайний, концевой домен (E1 или E2), вариабельная область, содержащая повторы, богатые глицином и серином (V1 в головной части и V2 в хвостовой), и гипервариабельная область (H1 или H2) (см. рис. 9.3). У многих белков промежуточных филаментов концевые домены содержат сайты фосфорилирования, участвующие в сборке и разборке самих филаментов. Третичная структура головных и хвостовых доменов известна не полностью, однако их конфигурация, вероятно, меняется по мере сборки молекулы белка. Головной домен необходим для сборки филаментов, однако роль хвостового домена представляется менее ясной, поскольку некоторые белки промежуточных филаментов его не содержат.

Шесть групп семейства промежуточных филаментов обозначаются как I–VI группы гомологичных последовательностей (). Такое разделение основано на



По степени гомологии гены белков промежуточных филаментов можно разделить на шесть групп. Гены, относящиеся к группам I и II, составляют большинство генов белков промежуточных филаментов (показано в процентах)

сходстве ДНК, аминокислотной последовательности и структуре гена. Первыми белками промежуточных филаментов, для которых была установлена первичная структура, были кератины волос («тип I») и шерсти («тип II»). Белки I и II типа перечислены на рис. 9.5 и 9.6.

Степень гомологии между генами белков одной и той же группы составляет около 60%, однако в некоторых случаях она может быть свыше 95%. Между генами разных групп гомология снижается до 20%. Степень гомологии между стержнеобразными доменами обычно выше для белков, относящихся к одной и той же группе. Особенно это проявляется для последовательностей, расположенных на границе спирализованных участков. Головные и хвостовые домены обнаруживают большую вариабельность, и часто отмечается большее сходство между белками филаментов, с одинаковым характером экспрессии, чем между белками, принадлежащими к одной и той же гомологичной группе. Строение концевых доменов также может быть совершенно различно: кератины типа I имеют короткие домены N1 и N2, или вовсе не имеют их. В то же время белки типа IV не обладают субдоменами E1/V1 и E2/V2.

Перечисленные гомологичные группы белков хорошо совпадают с четко выраженным тканеспецифическим характером экспрессии белков промежуточных филаментов и с их эволюционной историей. Белки, относящиеся к группе I и группе II, представляют собой кератины, которые экспрессируются в эпителии и на долю которых приходится 54 из 70 генов белков промежуточных филаментов человека. Белки III группы включают четыре родственных белка, каждый из которых специфичен для определенного типа клеток. В IV группе находится семь белков нейрофиламентов, а в V широко распространены белки ядерной ламины, гены которых с эволюционной точки зрения относятся к самой древней группе генов белков промежуточных филаментов. К VI группе относятся два различных белка филаментов глаз-

ного хрусталика, которые не могут быть отнесены к другим группам.

Между отдельными белками каждой группы проявляется тканевая специфичность (см. рис. 9.5, 9.6 и 9.12; описание различных типов клеток эпителия см. 9.3 *Две самые большие группы белков промежуточных филаментов представляют собой кератины типа I и II*). Также некоторые белки промежуточных филаментов экспрессируются при воспалительных и раневых процессах. По-видимому, промежуточные филаменты представляют на сегодняшний день наиболее надежные маркеры дифференцировки клеток и тканей. Для оценки степени дифференцировки, которая необходима для исследований по биологии клетки и различных патологических состояний, широко используются антитела к белкам промежуточных филаментов. Исследование тканеспецифической экспрессии белков промежуточных филаментов позволяет проследить их участие в процессах развития и дифференцировки. Обычно характер экспрессии сохраняется даже в случае метастазирующих опухолей. Процесс аномальной дифференцировки, который часто может быть обнаружен по характеру экспрессии белков промежуточных филаментов, служит ранним показателем протекания в организме серьезных патологических процессов. Характерной особенностью белков промежуточных филаментов является их тканевая специфичность, которая в большей степени, чем все другие их свойства, способствовала исследованиям этих основных структурных белков. Эти исследования проводились до момента установления их связи с развитием различных заболеваний.

9.3 Две самые большие группы белков промежуточных филаментов представляют собой кератины типа I и II

Основные положения

- У млекопитающих большая часть белков промежуточных филаментов представлена кератинами
- Кератины являются облигатными гетерополимерами белков типа I и II
- Характер совместной экспрессии кератинов обоих видов служит показателем степени дифференцировки клеток эпителия и их пролиферативного статуса
- К числу наименее специализированных относятся простые кератины K8 и K18
- Из белков всех промежуточных филаментов наиболее сложным и варьирующим типом экспрессии отличаются кератины, выполняющие барьерную функцию
- Структурные кератины твердых опорных структур отличаются от других кератинов и, вероятно, принадлежат к эволюционно наиболее поздним белкам

Большинство генов белков промежуточных филаментов у человека кодируют кератины. Как показано на рис. 9.5 и 9.6, известно 28 кератинов, относящихся к

Белки промежуточных филаментов типа I (кератины типа I)		
Белок (старое название)	Направление дифференцировки ткани (на примере нормальных тканей)	Компонент, участвующий в сборке
K18	Однослойный эпителий: все виды (выстилающий кишечник)	K8, K7
K20	Однослойный эпителий: некоторые отделы кишечника (тонкий кишечник)	K8, (K7)
K9	Многослойный эпителий: супрабазальный; ороговевающий (ладони, подошвы)	(K1)
K10	Многослойный эпителий: супрабазальный, ороговевающий (эпидермис)	K1
K12	Многослойный эпителий: неороговевающий (роговица)	K3
K13	Многослойный эпителий: супрабазальный, неороговевающий (слизистая рта)	K4
K14	Многослойный эпителий и обладающий сложной структурой эпителий: базальные клетки; все (эпидермис)	K5
K15	Многослойный эпителий: некоторые базальные клетки (эпидермис)	(K5)
K16	Многослойный эпителий: супрабазальный; стрессорный быстро обменивающийся (слизистая рта)	K6a
K17	Многослойный эпителий: стресс, быстрая обмениваемость (глубокие волосяные фолликулы)	K6b
K19	Многослойный эпителий: базальные клетки, клетки простого эпителия (молочная железа)	K8
K23	Эпителий (локализация не установлена)	
K24	Эпителий (локализация не установлена)	
K25 (K25irs1) K26 (K25irs2) K27 (K25irs3) K28 (K25irs4)	Клетки структурного эпителия, эпителий, образующий структуры (внутренние волосяные фолликулы)	
K31 (Ha1) K32 (Ha2) K33a (Ha3-I) K33b (Ha3-II) K34 (Ha4) K35 (Ha5) K36 (Ha6) K37 (Ha7) K38 (Ha8) K39 K40	Клетки структурного эпителия: твердые структуры и производные (волосы, ногти, язык)	Кератины трихоцитов типа II

РИС. 9.5. Белки промежуточных филаментов человека, относящиеся к гомологичной группе типа I (кератины типа I). Белки сгруппированы в простые кератины (клетки простого эпителия), барьерные кератины (характерные для многослойного чешуйчатого эпителия и эпителия сложной структуры) и в два типа структурных кератинов, связанных с эпидермальными элементами

типу I, и 26 белков, относящихся ко II типу. В ткани эпителия кератины, которые иногда называются цитокератинами, экспрессируются совместно, т. е. как тип I /тип II. Экспрессия кератинов является настолько характерной особенностью клеток эпителия, что их присутствие может служить признаком эпителиальной ткани. Ткани, которые не экспрессируют кератины (например, клетки эндотелия кровеносных сосудов) не относятся к эпителиальным. Кератиновые филаменты связаны с межклеточными контактами (десмосомами) и с местами контактов клетки с матриксом (полудесмосомами).

Все вместе образует структурную сеть, которая особенно характерна для многослойного эпителия, например эпидермиса (подробнее об этих контактах см. 15 Внеклеточный матрикс и адгезия клеток). Основные кератины эпителиального слоя подразделяются на группы в зависимости от заряда и молекулярной массы. В состав группы K1 (тип II) входят наиболее крупные и основные белки, а в состав группы K19 — более мелкие и кислые белки группы I.

Каждый кератин группы I экспрессируется совместно с кератином группы II, и каждая пара характерна

Белки промежуточных филаментов типа II (кератины типа II)		
Белок (старое название)	Направление дифференцировки ткани (на примере нормальных тканей)	Компонент, участвующий в сборке
K7	Однослойный эпителий: многие виды (молочная железа)	K18 (K19)
K8	Однослойный эпителий: все виды (выстилающий кишечник)	K18 (K19, K20)
K1	Многослойный эпителий: супрабазальный, ороговевающий (эпидермис)	K10 (K9)
K2 (K2e)	Многослойный эпителий: супрабазальный, ороговевающий; поздний (эпидермис)	(K10)
K3	Многослойный эпителий: неороговевающий (роговица)	K12
K4	Многослойный эпителий: супрабазальный, неороговевающий (слизистая рта)	K13
K5	Многослойный и комплексный эпителий: базальные клетки все виды (эпидермис)	K14 (K15)
K6a	Многослойный эпителий: супрабазальный; стрессорный быстро обменивающийся (слизистая рта)	K16
K6b	Многослойный эпителий: стресс, быстрая обменяемость (глубокие волосяные фолликулы)	K17
K6c (K6e/h)	Эпителий (локализация не установлена)	
K75 (K6hf)	Многослойный эпителий (оболочка волосяных фолликулов)	(K16, K17)
K76 (K2p)	Многослойный эпителий: супрабазальный ороговевающий (небо)	(K10)
K77 (K1b)	Эпителий (лотовые железы)	
K78 (K5b)	Эпителий (локализация не установлена)	
K79 (K6l)	Эпителий (локализация не установлена)	
K80 (Kb20)	Эпителий (локализация не установлена)	
K71 (K6irs1) K72 (K6irs2) K73 (K6irs3) K74 (K6irs4)	Клетки структурного эпителия, эпителий, образующий элементы (внутренние волосяные фолликулы)	
K81 (Hb1) K82 (Hb2) K83 (Hb3) K84 (Hb4) K85 (Hb5) K86 (Hb6)	Клетки структурного эпителия: твердые структуры и производные (волосы, ногти, язык)	Кератины трихоцитов типа I

Белки промежуточных филаментов человека, относящиеся к гомологичной группе типа II (кератины типа II). Белки сгруппированы в простые кератины (клетки простого эпителия), барьерные кератины (характерные для многослойного ороговевающего эпителия и эпителия сложной структуры) и в два типа структурных кератинов, связанных с эпидермальными элементами

для степени дифференцировки и специализации определенного типа клеток эпителия (рис. 9.1). Хотя *in vitro* любой из кератинов, относящихся к I или II типу, будет образовывать филаменты с различными комплементарными кератинами другого типа, *in vivo* они проявляют гораздо большую селективность, образуя специфические пары. Экспрессия таких пар кератинов тесно связана со специфическими направлениями дифференцировки эпителия или даже с различными стадиями этого процесса, и присутствие одного представителя пары почти всегда служит признаком наличия другого (см. рис. 9.2).

С функциональной точки зрения, пары кератинов можно подразделить по крайней мере на три группы: простые, барьерные и структурные кератины.

Кератины экспрессируются в клетках эпителия. Эпителиальная ткань представляет собой тип тканевой организации, который характеризуется плотной упаковкой клеток в один или несколько слоев. Эпителий образует границу органов, а также секреторных и всасывающих протоков. В этих случаях обычно говорят об **однослойном эпителии**, клетки которого непосредственно контактируют с подлежащим слоем внеклеточного матрикса

Пары кератинов, экспрессирующиеся в тканях

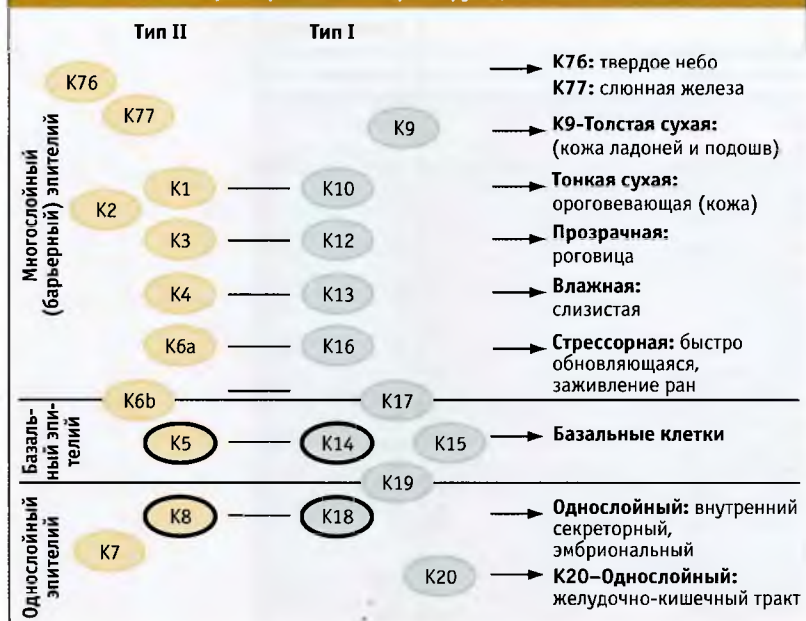


Рис. 9.7 Экспрессия кератинов характеризуется тканевой специфичностью. Они экспрессируются попарно: тип I/тип II. Каждая пара характерна для специфического типа дифференцировки эпителия. Выделены первичные кератины

(базальной ламины), а свободная поверхность открыта в просвет протока или кишки (см. рис. 9.8). Крайний случай представляет собой многослойный или **стратифицированный эпителий**, образующий основную барьерную ткань оболочек тела и органов. К этому типу относятся эпидермис, покрывающий внешнюю поверхность тела, а также специализированный эпителий, выстилающий от-

верстия и полости прилегающих к ним протоков. Клетки стратифицированного эпителия обычно называют кератиноцитами. Ткань стратифицированного эпителия также формирует дополнительные структуры эмбрионального происхождения, состоящие из специализированного сложного эпителия, образующего, например, железы, волосы и ногти, которые могут включать участки, состоя-

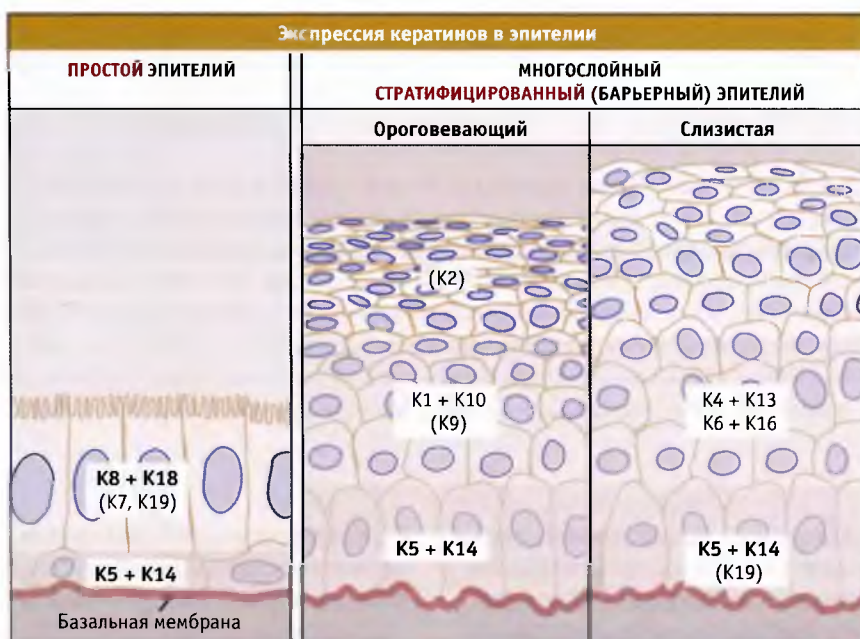


Рис. 9.8 Последовательность экспрессии основных кератинов в однослойном (например, в железистом) и барьерном (например, в ороговевающем или слизистом) эпителии. Первичные кератины выделены жирным шрифтом. Вариабельные или минорные кератины не показаны. Экспрессия кератинов зависит от положения клеток в ткани и, таким образом, от ее пролиферативного статуса: утрата контакта клеток с базальным слоем приводит к их выходу из цикла и к вступлению в дифференцировку

щие из простого эпителия. Наружные клетки полностью сформировавшегося стратифицированного барьерного эпителия плоской или чешуйчатой формы. Этот эпителий обычно состоит из 6–10 слоев клеток. Чтобы защитить тело от физических, химических и канцерогенных воздействий, клетки постоянно обновляются.

Клетки эпителия скрепляются вместе посредством десмосом, а также полудесмосом с субстратами. Все контакты в виде плотной сети, состоящей из связок кератиновых филаментов, проходят через цитоплазму каждой клетки (см. *15 Внеклеточный матрикс и адгезия клеток*). По сравнению с клетками других типов, кератиноциты многослойного эпителия экспрессируют большее количество и более широкий набор белков промежуточных филаментов, что связано с тем, что эти клетки должны противостоять массивным внешним физическим воздействиям. Состав специфических белков кератиновых филаментов, которые экспрессируются в эпителиальных клетках, зависит от локализации и физиологического состояния последних. Особенно отчетливо это прослеживается в изменении экспрессии кератина, которое происходит при дифференцировке клеток стратифицированного эпителия. К числу наименее дифференцированных клеток стратифицированного эпителия принадлежат базальные клетки, которые еще сохраняют контакт с базальной мембраной. Эти клетки еще способны к делению, некоторые из них являются стволовыми клетками ткани, и делиться крайне редко, однако большая часть клеток делится, обеспечивая тем самым рост ткани. После того как базальная клетка разделилась, одна из дочерних клеток покидает базальный компартмент и перемещается в первый супрабазальный слой. В результате этого важного перемещения клетка выходит из-под прямого влияния базальной мембраны и сигналов роста и становится коммитированной к терминальной дифференцировке. Затем клетка начинает свой путь к поверхности эпителия. Этот путь представляет собой процесс терминальной дифференцировки, который в конце концов завершается гибелью клетки и ее потерей из ткани. Рис. 9.8 иллюстрирует прогрессирующие изменения экспрессии кератинов, связанные с выходом некоторых клеток из пролиферативного компартмента и их коммитированием к дифференцировке.

В процессе развития первыми экспрессируются простые кератины. В этой группе первичные или универсальные кератины представлены белками K8 (тип II) и K18 (тип I). Они присутствуют в ранних эмбриональных клетках и, по-видимому, представляют собой эволюционно наиболее древние кератины. Их экспрессия минимальна, что соответствует наименее дифференцированному состоянию кератинов, характерному для функционального эпителия, пласт которого состоит из поляризованных и плотно, без промежутков, скрепленных между собой клеток. У позвоночных K8 и K18 представляют собой белки с наиболее консервативной первичной структурой и присутствуют в клетках на всех ступенях развития, от яйцеклетки до зрелой ткани. Все эмбриональные клетки экспрессируют K8 и K18 до

стадии гаструляции, когда некоторые эктодермальные клетки начинают дифференцироваться, образуя слой мезодермы, прекращают синтез K8/K18, и начинают экспрессировать виментин, белок, относящийся к типу III.

Белки K8 и K18 продолжают экспрессироваться в клетках эмбрионального эпителия до тех пор, пока эти клетки не станут коммитированными к специфическому направлению морфогенеза, т. е. когда они начинают экспрессировать тканеспецифические белки промежуточных филаментов. Во взрослом организме K8 и K18 характерны для клеток простого эпителия, обладающих секреторными и/или всасывающими функциями, например клеток желез, печени, дыхательного эпителия и желудочно-кишечного тракта (см., например, рис. 9.9). Эти белки экспрессируются в клетках различных карцином, и антитела к ним широко используют-

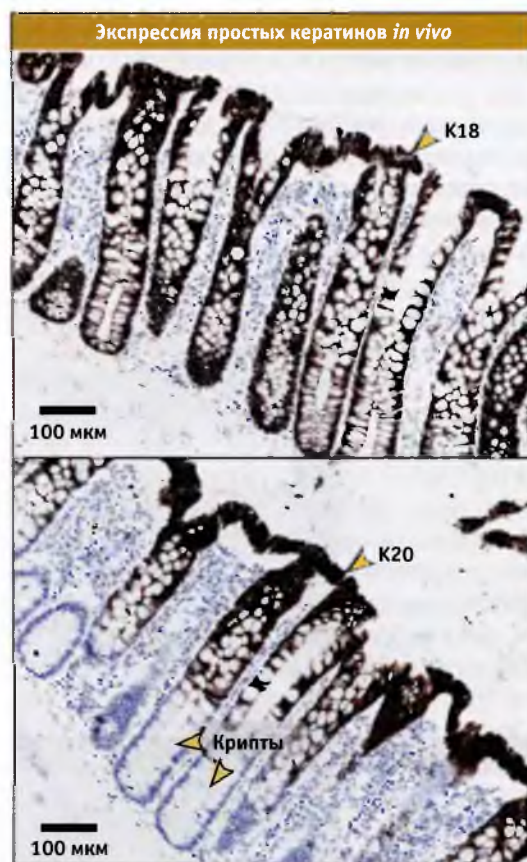


РИС. 9.9. Иммуногистохимическое окрашивание простых кератинов на срезе слизистой толстого кишечника. Локализация двух кератинов I типа, K18 и K20 определена с помощью двух моноклональных антител с последующим иммунопероксидазным выявлением. Кератины окрашиваются коричневым цветом на фоне голубой окраски гематоксилином. Первичный кератин K18 находится во всех клетках простого эпителия, в то время как K20 специфичен для определенных клеток желудочно-кишечного тракта. Как видно на препарате, его присутствие отмечено только в более дифференцированных клетках эпителия, по мере миграции клеток вверх от основания крипты. Фотография любезно предоставлена Деклан Ланни и Биржитт Лейн, Биологический факультет, Университет Данди

ся для диагностики различных патологических состояний. Наряду с первичными кератинами, известны, по меньшей мере, еще два простых кератина, K7 (близкий к K8 в основном содержится в клетках протоков желез) и K20 (близкий к K18, который содержится в отделах желудочно-кишечного тракта).

Барьерные кератины характерны для стратифицированного эпителия. К первичным, или основным, кератинам этой группы относятся K14 (тип I) и K5 (тип II), присутствующие в кератиноцитах базального слоя стратифицированного сквамозного эпителия, например эпителия кожи. Этот слой, состоящий из одного ряда базальных клеток, экспрессирующих K5/K14, представляет собой наименее дифференцированный тканевой компартмент, сохраняющий способность к пролиферации. В сложном железистом эпителии, наряду с простыми клетками, экспрессирующими K8/K18, находятся базальные клетки, экспрессирующие K5/K14 (рис. 9.8). В некоторых тканях базальные пролиферирующие клетки экспрессируют другие кератины, например K19, K15 и K6/K17.

Когда клетки выходят из базального слоя, они прекращают продуцировать K5/K14 и начинают экспрессировать вторую пару кератинов, специфичную для дифференцирующихся клеток (см. рис. 9.8). В эпидермисе это кератины K1 типа II и K10 типа I (рис. 9.10). Экспрессия вторичных кератинов в супрабазальных слоях клеток зависит от типа ткани (см. рис. 9.7 и 9.8). Один набор кератинов, представляющий собой изоформы K6, а также K16 и K17, проявляет свойства стрессорных белков эпидермиса, и их синтез индуцируется вскоре после раневых повреждений и воспалительного процесса. В других тканях эти «стрессорные» кератины экспрессируются постоянно, и этим тканям свойственна роль характерных индукторов воспаления.

Таким образом, пролиферативный компартмент (базальный слой клеток) многослойного барьерного эпителия характеризуется спектром синтеза кератинов отличным от дифференцирующегося компартмента (супрабазальных слоев). Для этих барьерных тканей выход клеток

из цикла тесно связан с остановкой синтеза первичных кератинов и с началом синтеза вторичных, специфичных для процесса дифференцировки. Кератины клеток супрабазального слоя обеспечивают большую тканевую упругость, и экспрессия нескольких вторичных кератинов может препятствовать делению клеток в митозе и, таким образом, несовместима с пролиферацией.

Третья группа «структурных» кератинов включает большое количество белков промежуточных филаментов, которые экспрессируются только в специализированных поддерживающих структурах, таких как волосы и ногти (рис. 9.5 и 9.6). К ним относятся кератины клеток волос или трихоцитов, образующих эти структуры, а также специализированные кератины, образующиеся в продуцирующих их эпителиальных клетках. Первичная структура этих двух типов структурных кератинов различна, и считается, что у позвоночных они представляют собой поздний продукт эволюции.

Последовательная экспрессия структурных кератинов особенно характерна для волосных фолликулов. Первая группа структурных кератинов экспрессируется в концентрических слоях эпителиальных трубочек внутреннего корневого чехла волосного фолликула. Эта структура становится очень прочной и формирует основную часть волоса. Вторая группа опорных кератинов (трихоцитов или клеток волоса) экспрессируется в основной части волоса, ногтях, некоторых опорных клетках поверхностных сосочков языка (что характерно для языка кошачьих), и в небольшом количестве в тимусе. Эти кератины трихоцитов отличаются высоким содержанием цистеина и пролина в головных и хвостовых доменах. Последнее позволяет им образовывать дисульфидные связи с белками, которые находятся в цитоплазме клеток волоса по мере дифференцировки и упрочения последних. Эти белки не входят в состав филаментарных структур и называются белками, связывающимися с кератином. Наличие дисульфидных связей приводит к образованию очень прочных структур, формирующих поддерживающую ткань.



рис. 9.10. Тканевая специфичность экспрессии кератина в коже. На срезах, окрашенных антителами к K7, простому кератину типа II, видны только секреторные клетки потовых желез (иммунопероксидазой окрашиваются в темно-коричневый цвет). Многослойный ороговевающий барьерный эпителий (эпидермис) не окрашивается антителами, и после окраски гематоксилином ядра имеют бледно-голубую окраску. Справа: срез плотного эпидермиса, окрашенный антителами на K10, тип I вторичный или тканеспецифичный кератин, экспрессирующийся в постмитотических супрабазальных клетках ороговевающих барьерных тканей. Базальный слой клеток не окрашивается антителами, и ядра окрашены в синий цвет. Фотография любезно предоставлена Деклан Ланни и Биржитт Лейн, Биологический факультет, Университет Данди

9.4 Мутации в кератинах снижают механическую прочность эпителиальных клеток

Основные положения

- Мутации в генах белков K5 или K14 приводят к кожной болезни, называемой врожденная пузырчатка (буллезный эпидермолиз)-EBS
- Тяжелые случаи EBS связаны с накоплением нефиламентарной формы кератина
- Многие другие заболевания, связанные с хрупкостью тканей, вызваны близкими мутациями в других кератиновых генах
- Болезни, вызванные повышенной хрупкостью клеток, подтверждают существование у кератиновых промежуточных филаментов тканеукрепляющей функции

В начале 1990-х гг. был достигнут существенный прогресс в нашем понимании функциональной роли промежуточных филаментов. К этому времени относится установление того факта, что мутации в кератине K5 или K14, которые экспрессируются в клетках базального слоя эпидермиса, служат причиной редкого наследственного кожного заболевания, известного под названием *буллезный эпидермолиз* (EBS). На существование связи между мутациями в кератинах и EBS указывают три группы данных:

- У мышей, в клетках которых экспрессируются рекомбинантные мутантные гены кератина отмечены изменения кожи, близкие к наблюдаемым при EBS
- Методом генетического анализа клеток, полученных от членов семей, страдающих наследственной формой EBS, идентифицирована мутация в K14
- Белковые агрегаты в клетках кожи, полученных от больных EBS, очень похожи на кератиновые агрегаты, образующиеся в митозе. Иммуногистохимическими методами и секвенированием ДНК в них обнаружен дефектный K5

Для больных EBS характерна очень чувствительная кожа, которая легко травмируется при чесании, растирании и даже при ходьбе. Когда кожа подвергается такого рода воздействиям, базальные клетки разрушаются, и между базальной мембраной и выстилающими слоями интактных эпителиальных клеток накапливается экссудат, который заполняет пузыри образующиеся на коже (). Если их не прокалывать, то они растут и распространяются по коже, однако обычно пузыри не оставляют после себя шрамов.

Клиническая тяжесть EBS широко варьирует и зависит от характера мутаций. Наиболее тяжелые случаи, которые характеризуются распространением пузырей даже при простом почесывании или потирании кожи,



Буллезный эпидермолиз (EBS) — заболевание, для которого впервые было показано, что оно вызвано мутацией в гене, кодирующем белок промежуточных филаментов, а именно в гене кератина K5 или K14. Фотография больного иллюстрирует характерные волдыри, возникающие на коже при незначительном ее раздражении: почесывании, растирании или при ношении тесной одежды. На врезке представлен срез диагностического биоптата кожи, взятого после растирания кожи резиновым ластиком: в базальном слое эпидермальных кератиноцитов видна полость, заполненная жидкостью, которая образовалась за счет разрыва клеток. Фотография любезно предоставлена Робинот А. Иди, Институт дерматологии Сент-Джонс, Больница Св. Томаса

связаны с мутациями в пептидах на границе со спиральными областями в кератине, которые участвуют в сборке филаментов (рис. 9.3 и 9.15). Более стертая картина заболевания, при которой пузыри образуются только на ногах и руках, где кожа раздражается сильнее, связана с мутациями в области стержневого домена или в деспирализованных участках, где изменения последовательности аминокислот, вероятно, играют менее критическую роль. Большинство мутаций, связанных с EBS, относятся к доминантному типу. Это значит, что только одна из двух копий гена ответственна за изменение фенотипа: подобно слабому звену цепи, дефект субъединицы может нарушить функционирование полимерного филамента. Таким образом, EBS может наследоваться при передаче только одной дефектной копии гена (от одного из родителей). Однако зарегистрированы несколько случаев заболевания рецессивной формой EBS, при которой дефектными оказываются обе копии гена. Обычно это характерно для K14-нулевых мутаций, и у больных с нулевыми мутациями в обеих копиях гена K14 на коже образуются пузыри. Удивительно, однако, что они могут жить вообще без белка K14. Установление связи между мутациями K5, K14 и EBS оказалось существенным прорывом в понимании роли промежуточных филаментов, поскольку было четко продемонстрировано, что кератиновые филаменты важны для придания клеткам ткани эпителия физической прочности. Когда нарушается целостность сети промежуточных филаментов, клетки становятся хрупкими и легко разрушаются при небольших физических воздействиях.

На основании известных данных по характеру экспрессии кератинов были проанализированы многие другие формы патологической чувствительности кожных покровов к физическим воздействиям. При этом было обнаружено, что по меньшей мере 25 отдельных клинических синдромов, характеризующих высокую чувствительность кожи, обусловлены мутациями по крайней мере в 19 кератиновых генах. Клинические проявления заболеваний, связанных с мутациями в различных кератинах, могут сильно варьировать в зависимости от типа клеток, в геноме которых они произошли. Например, мутации в K1 или K10 приводят к легкому разрушению всех слоев супрабазальных кератиноцитов, в то время как более поверхностные уплощенные пузыри образуются в результате мутаций во вторичном, поздно экспрессирующемся кератине K2. Мутации в нескольких кератинах, например в K9 (специфичном для клеток кожи ладоней и подошв) и K16, приводят к сильному огрубению кожи на этих местах. Патологическая чувствительность клеток супрабазального слоя эпителия полости рта и гениталий, связана с мутациями в белках K4 или K13, а также K16 и K6a. Другие кератиновые заболевания характеризуются фенотипом, который варьирует от сильного ороговения ногтей до образования пузырей на поверхности роговицы.

В отличие от большого набора мутаций в первичных кератинах K5 и K14, патологические мутации в генах кератинов, специфичных для дифференцированных кле-

ток, в основном обнаруживаются в последовательностях, примыкающих к спиральным участкам, т. е. в наиболее консервативных областях, где у всех кератинов мутации имеют разрушительные последствия. При патологиях, связанных с вторичными кератинами, мутации, эквивалентные тем, которые вызывают среднюю форму тяжести EBS редки, хотя они, конечно, встречаются в популяции. Это позволяет предполагать, что эффект мутаций во вторичных кератинах проявляется слабее. Наиболее вероятным кажется предположение о том, что супрабазальный кератиновый цитоскелет может укрепляться K5/K14 филаментами, сохранившимися от базальных клеток. Близкие по морфологической картине кожные заболевания также могут быть связаны с мутациями в белках, связывающихся с кератином, например, в плектине и в белках десмосомных и полудесмосомных контактов (см. 9.10 *Белки, которые ассоциированы с промежуточными филаментами, являются факультативными, а не основными*).

Структура простых эпителиальных кератинов K8 и K18 у позвоночных отличается высоким уровнем консервативности. Эти кератины необходимы для нормального развития, однако мутации в них редко вызывают развитие патологических состояний у человека. Дефицит K8 у мышей приводит к гибели из-за плацентарной недостаточности, причем K8 и K18 оказывают защитный эффект от различных стрессорных воздействий на клетки. Не исключено, что такую же роль эти кератины играют и в клетках человека. У человека в K8 и K18 не обнаружены тяжелые, разрушительные мутации (в последовательностях, примыкающих к спиральной области). Возможно, что эти мутации являются летальными. Обнаружены мутации «средней тяжести», причем они могут обуславливать риск возникновения многофакторных заболеваний, поражающих печень, поджелудочную железу и эпителий желудочно-кишечного тракта. Дефекты только в этих типах кератинов, совместимые с выживанием эмбриона, сами по себе могут не являться патогенными.

9.5 Белки промежуточных филаментов в нервной, мышечной и соединительной тканях часто ко-экспрессируются

Основные положения

- Некоторые белки промежуточных филаментов, относящиеся к типу III и IV, ко-экспрессируются в разных тканях
- Многие белки типа III и IV образуют друг с другом сополимеры
- Совместная экспрессия множественных типов белков промежуточных филаментов может маскировать эффект мутаций в белке, принадлежащим к одному из типов
- Десмин представляет собой необходимый белок мышц
- Виментин часто экспрессируется в одиночных клетках
- Мутации в генах белков типа III или IV обычно связаны с мышечными или неврологическими расстройствами, носящими дегенеративный характер

Белки промежуточных филаментов человека, относящиеся к группам III–VI			
	Белок	Направление дифференцировки ткани	Компонент, участвующий в сборке (когда известен)
Тип III	Виментин	Широко распространен	Самосборка
	GFAP	Клетки астроглии	Самосборка
	Десмин	Все типы мышечных клеток	Самосборка
	Периферин	Периферическая нервная система; некоторые отделы ЦНС; поврежденные аксоны	Самосборка; NF-L
Тип IV	NF-H	Нейроны	NF-L
	NF-M	Нейроны	NF-L
	NF-L	Нейроны	Самосборка
	Нестин	Широко распространен: нейроэпителиальные стволовые клетки, глиальные клетки, мышцы	Тип III
	α-интернексин	Нейроны	Самосборка
	Синемин-α	Клетки мышц	Тип III
	Дезмуслин/синемин-β Синкоилин	Клетки мышц	Тип III, IV
Тип V	Ламин А	Ядра: многие типы дифференцированных клеток	Ламин А, С
	Ламин С1, С2	Ядра: многие типы дифференцированных клеток	Ламин А, С
	Ламин В1	Ядра: многие типы менее дифференцированных клеток	Ламин В
	Ламин В2, В3	Ядра: с ранних периодов развития	Ламин В
Тип VI	Филенсин/ CP115	Хрусталик глаза	CP49
	CP49/ факинин	Хрусталик глаза	Филенсин

Рис. 9.12. Белки промежуточных филаментов человека, объединенные в типы III–IV по принципу гомологии

На рис. 9.11 перечислены гомологичные некератиновые белки промежуточных филаментов, которые относятся к группам III–IV. В данном разделе мы рассмотрим белки промежуточных филаментов, относящихся к типам III и IV. Эти типы различаются по принципу гомологии по определенным последовательностям. К белкам III типа относятся десмин, виментин, фибриллярный кислый белок глиального происхождения (GFAP, фибриллы которого представлены на рис. 9.13) и периферин. Эти белки дифференциально экспрессируются в клетках соединительной ткани, мышц, в нейронах и некоторых других дифференцированных клетках. Их экспрессия индивидуально регулируется для каждого белка и тесно связана со специфическими процессами дифференцировки. Некоторые из этих белков одинаково экспрессируются в разных тканях, а другие могут образовывать друг с другом сополимеры. Однако они никогда не образуют таких комплексов с кератинами (тип I/II) или с ламинами (тип V). Так же как и для других белков промежуточных филаментов, мы пока точно не знаем, каким образом вариации в аминокислотной последовательности этих белков свя-

заны с их специфическими функциями в клетках различных типов, хотя мутации в них хорошо коррелируют с различными нарушениями в функционировании соответствующей ткани.

Десмин представляет собой белок, необходимый для функционирования клеток мышц всех типов (поперечнополосатых, сердечной и гладких); подобно кератину эпителиальных клеток, десмин обеспечивает упругость ткани при физических воздействиях. Десминовые филаменты проходят между точками скрепления сократительных структур (например, саркомер поперечнополосатых мышц). Эти места в клетках мышц являются сайтами приложения значительных механических усилий. Поэтому десмин можно рассматривать как белок, обеспечивающий устойчивость мышечных клеток к механическому воздействию. Такая точка зрения возникла после того, как оказалось, что ткани, в клетках которых десмин отсутствует или находится в мутантной форме, теряют способность противостоять механическим воздействиям. Десмин образует комплексы с другими белками типа III; в некоторых клетках он сополимеризуется также с белками типа IV (подробнее о мышечном



Рис. 9.13. Филаменты астроцитов спинного мозга, состоящие из глиального фибриллярного кислого белка (GFAP). По данным Eliasson, C., et al. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 23996–24006. © 1999 ASBMB. Фотография любезно предоставлена д-ром Милошем Пекны и д-ром Клас-Хенриком Бертольдсом, Сальгренска Академия, Гетеборгский университет

сокращении см. 8.21 *Миозин II участвует в мышечном сокращении*).

В отличие от десмина, который экспрессируется в тканях состоящих из плотных агрегатов клеток, таких как мышечная и эпителиальная, экспрессия виментина типична для клеток, которые функционируют изолированно, или в виде рыхло-связанных клеточных ассоциатов или слоев. В процессе развития виментин экспрессируется после кератинов и остается во многих мезенхимальных и соединительнотканых клетках взрослого организма, от фибробластов (см. рис. 9.1) до кроветворных клеток и клеток эндотелия сосудов, а также некоторых видов эпителия.

Астроциты и глиальные клетки представляют собой клетки центральной нервной системы, отличные от нейронов. Они необходимы для роста, дифференцировки и регенерации последних. Все астроглиальные клетки экспрессируют GFAP, который обычно экспрессируется вместе с виментином или белком нестином, относящимся к группе IV. Такая совместная экспрессия защищает клетки от последствий мутаций или утраты одного из генов. Эксперименты по двойному нокауту генов, проведенные на животных, показали, что эти промежуточные филаменты типа III необходимы для нормального функционирования астроцитов в центральной нервной системе. Эти клетки необходимы для заживления ран и развития устойчивости к осмотическому шоку. Для нормального функционирования астроцитам необходимо сформировать отростки, которые при отсутствии промежуточных филаментов несут различные дефекты.

Периферин, главным образом, экспрессируется в клетках периферической нервной системы. При формировании аксонами отростков они вначале синтезируют периферин и виментин; затем этот синтез сменяется экспрессией триплета белков нейрофиламентов (NF-L, NF-M, и NF-H). Впрочем, после повреждения нервной ткани экспрессия периферина быстро возобновляется. По-видимому, для нормального выполнения белком своих функций важен его уровень. Так, в экспериментах на

животных показано, что слишком высокое содержание периферина приводит к летальным последствиям, а его отсутствие — к утрате некоторых небольших сенсорных аксонов.

В настоящее время гомологичный тип IV включает триплет белков нейрофиламентов низкой, средней и высокой молекулярной массы (NF-L, NF-M и NF-H), а также α -интернексин, нестин, синкоилин и синемин (см. рис. 9.12). В тканях большинство белков типа IV присутствуют в гетерополимерной форме, и гораздо более эффективно образуют сополимеры с белками типа III или другими белками, относящимися к типу IV. В зрелых нейронах, белки триплета нейрофиламентов почти всегда экспрессируются вместе, в то время как синкоилин и два продукта альтернативного сплайсинга синемина (α и β) преимущественно экспрессируются в клетках мышц и сополимеризуются с белками группы III. Согласно иммуногистохимическим данным, синкоилин и синемин, так же как и десмин, локализованы в мышечных клетках, в точках приложения нагрузки. Возможно, что эти белки промежуточных филаментов тоже обеспечивают устойчивость клеток к нагрузкам.

Необычайная длина аксональных выростов в нейронах (у нейронов седалищного нерва человека она может достигать 1 м) свидетельствует о важности поддержания соответствующего уровня экспрессии белков нейрофиламентов, необходимых для укрепления цитоплазмы. В процессе развития экспрессия нейрофиламентов происходит по сложной программе, которая включает одновременный синтез многих белков. Соответствующие профили накладываются и смещаются относительно друг друга. Таким образом, нейроны постоянно экспрессируют промежуточные филаменты. Первым экспрессируются нестин и виментин. (Подобно GFAP астроглии, при раневых повреждениях нейрональный нестин может экспрессироваться повторно.) По мере удлинения выростов, доминирующим становится синтез α -интернексина, который сменяется NF-L, и наконец, происходит экспрессия крупных белков нейрофиламентов. В

стабилизации сформировавшихся аксонов и нейритов важную роль играет триплет белков нейрофиламентов.

У нескольких белков, относящихся к группе IV, имеются длинные хвостовые домены, которые участвуют в организации каркасных структур цитоплазмы. В хвостовом домене NF-H присутствует ряд повторов, представляющих собой последовательность Lys-Ser-Pro, которая является сайтом фосфорилирования. Когда происходит фосфорилирование этих повторов, хвостовой домен приобретает высокий положительный заряд и ориентируется под прямым углом к оси филамента. Это способствует растяжению цитоплазмы аксона. У мышей число аксонов и их диаметр коррелирует с уровнем экспрессии белков нейрофиламентов. Большему диаметру аксона соответствует более быстрая проводимость нервного импульса, что является особенно важным фактором в эволюции крупных по размеру тел позвоночных.

Мутации в генах белков группы III связаны с развитием многочисленных патологических состояний, механизм которых в некоторых случаях удалось выяснить в экспериментах на животных. У человека мутации в генах GFAP связаны со смертельным нейродегенеративным заболеванием, болезнью Александра. В экспериментах на животных показано, что в отсутствие GFAP наблюдается аномальная реакция астроглии на повреждения, и астроциты не образуют цитоплазматических выростов. В десмине обнаружено много патологических мутаций, которые происходят в разных участках белковой структуры. У человека мутации в гене десмина связаны с дефектами сердечно-сосудистой системы, в особенности с развитием сердечной недостаточности на почве дилатационной кардиомиопатии, а также с некоторыми формами мышечной дистрофии. У мышей при отсутствии десмина стенки важнейших кровеносных сосудов становятся слишком мягкими и не могут поддерживать надлежащий уровень кровяного давления. Это вызывает растяжение уже ослабленного сердца, что приводит к дилатационной кардиомиопатии. При многих десминовых миопатиях в мышечных клетках обнаруживаются агрегаты этого белка, напоминающие кератиновые агрегаты, видимые в кератиноцитах больных с тяжелой формой EBS. С мутациями в виментине не связано ни одно из известных заболеваний, что, по-видимому, отражает его способность экспрессироваться вместе с другими белками филаментов.

Почти все мутации в белках нейрофиламентов, относящихся к типу IV, локализованы в головном или хвостовом домене. Они связаны с такими нейродегенеративными заболеваниями, как амиотрофный латеральный склероз, Charcot-Marie-Tooth типа 1 и 2E и болезнь Паркинсона. Большая длина цитоплазмы нейрона делает ее уязвимой к воздействиям различного рода, а не только к связанным с ее повышенной хрупкостью. Белки нейрофиламентов образуются в клетке и затем с помощью белковых моторов микротрубочек транспортируются по аксонам. Сплетения нейрофибрилл служат общим показателем нейродегенеративного процесса. Они представляют собой внутриклеточные скопления

нейрофиламентов, однако неизвестно, являются ли они причиной возникновения патологии. Эти сплетения могут возникать вследствие воздействий других факторов, влияющих на транспорт в аксонах, например такого, как нарушение функционирования микротрубочек. По сравнению с кератинами, при развитии заболеваний, мутации в белках нейрофиламентов гораздо труднее поддаются причинно-следственному анализу. «Кератинопатии» обычно проявляются при рождении или вскоре после него, в то время как большинство нейродегенеративных заболеваний развиваются поздно, что затрудняет проведение генетических исследований.

9.6 Промежуточные филаменты ламины укрепляют ядерную мембрану

Основные положения

- Ламины представляют собой внутриядерные белки, формирующие ламину, которая выстилает ядерную мембрану
- Точки закоривания на мембране образуются при посттрансляционных модификациях ламин
- После фосфорилирования Cdk1 ламинные филаменты деполимеризуются, что позволяет разборку ядерной оболочки при митозе
- Для генов ламин характерен альтернативный сплайсинг

К типу V белков промежуточных филаментов относятся ламины, которые по ряду своих свойств существенно отличаются от белков цитоплазматических филаментов:

- Они локализуются внутри ядра (см. рис. 9.1)
- Для них характерен альтернативный сплайсинг
- Они подвергаются модификациям, которые обеспечивают им прикрепление к мембране
- Они обладают стержнеобразными доменами с крайне протяженными спиральными участками 1B (см. рис. 9.3). Эту особенность они разделяют с белками промежуточных филаментов беспозвоночных, и
- Для них характерен совершенной иной способ сборки филаментов, и они никогда не образуют сополимеров с белками промежуточных филаментов, не относящимися к типу V.

Ламины образуют прочную сеть филаментов на внутренней поверхности ядерной мембраны, где они взаимодействуют с набором специфических белков, включая белки, связывающиеся с ламинном, и рецептор ламина B. В результате такого взаимодействия образуется и поддерживается функциональное окружение ядра клетки. У млекопитающих три гена (LMNA, LMNB1 и LMNB2) кодируют синтез шести белков: ген LMNA в результате альтернативного сплайсинга образует три иРНК, соответствующие белкам A, C1 и C2 (известные под общим названием ламины A-типа). Ген LMNB1 кодирует ламин B, а иРНК ламина B2 в результате сплайсинга может

транслироваться в В2 или В3. Ламины В-типа экспрессируются во всех клетках, начиная с раннего эмбрионального периода, в то время как образование ламин А-типа ограничено более дифференцированными клетками. Например, базальные кератиноциты кожного эпидермиса экспрессируют только ламин В2, а по мере их дифференцировки одновременно начинают экспрессироваться ламины А-типа. Экспрессия ламин С2 и В3 и их гомологов у других позвоночных ограничивается герминативными клетками.

Белки филаментов ламины характеризуются значительными структурными отличиями от белков цитоплазматических промежуточных филаментов. Сборка их в филаменты также отличается от процесса, характерного для цитоплазматических филаментов (см. 9.8 *Субъединицы промежуточных филаментов обладают высоким сродством друг к другу и полимеризуются в механически прочные структуры*). У ламин спирализованный субдомен 1 содержит шесть гептад аминокислот (всего 42 остатка), которые отсутствуют в белках цитоплазматических филаментов позвоночных (см. рис. 9.3). Такой разницы в размерах стержнеобразных доменов ламин достаточно для предотвращения возможности их сополимеризации с белками других промежуточных филаментов. Длинные спирализованные субдомены 1 также обнаружены в белках промежуточных филаментов цитоплазмы у беспозвоночных, что рассматривается как веское доказательство того, что они являются достаточно «древними» в эволюционном плане. Поэтому считается, что ламины относятся к эволюционно наиболее древним формам промежуточных филаментов. Вероятно, создание механизма защиты хрупких нитей ДНК от разрывов явилось ранним и существенным шагом на пути эволюции сложных организмов.

Как показано на рис. 9.14, у клеток млекопитающих, в митозе, ядерная оболочка распадается, и для того, чтобы это могло произойти, ядерная ламина должна диссоциировать. В профазе происходит фосфорилирование в головных и хвостовых доменах ламин (см. рис. 9.3). Это осуществляется под действием митотической ки-

назы Cdk1 и приводит к разборке ламины. Хвостовые домены также содержат последовательности, которые специфически направляют ламины в ядро (сигнал ядерной локализации) и удерживают их там (мембранное заякоривание, которое отсутствует у ламин А-типа). В митозе ламины А- и В-типа ведут себя по-разному. Ламины В-типа во время всего митоза остаются связанными с фрагментами везикул ядерной мембраны, в то время как ламины А-типа распределяются по всей цитоплазме. В конце митоза, когда вновь формируется ядерная оболочка, ламины постепенно связываются с конденсированным хроматином. Ламины В-типа взаимодействуют с ядерной мембраной посредством посттрансляционной модификации липидов по местам расположения консервативных последовательностей на конце хвостового домена (рис. 9.3). В ламинах А-типа этот сайт удаляется при сплайсинге РНК или при посттрансляционном протеолизе. Таким образом, в большинстве клеток лишь В-ламин может непосредственно взаимодействовать с ядерной мембраной. Однако в генеративных клетках (сперматозоиды) С2 ламин обладает дополнительным механизмом заякоривания, который обеспечивает связывание его головного домена с ядерной мембраной. (Подробнее о клеточном ядре см. 5 *Структура ядра и процессы транспорта*; о делении клеток см. 10 *Митоз* и 11 *Регуляция клеточного цикла*.)

Выяснение механизмов взаимосвязи между мутациями ламин и возникновением определенных заболеваний представляет собой трудную задачу. Мутации в ламинах А-типа связаны с разнообразными генетическими нарушениями, которые затрагивают мышечную, нервную и жировую ткань. Эти нарушения варьируют от семейной парциальной липодистрофии (потеря жировой ткани из некоторых участков тела) до различных форм прогрессирующей периферической нейродегенерации (болезнь Charcot-Marie-Tooth типа 2В1) и прогерии. Как показывают эксперименты на культурах клеток, мутации, которые нарушают функции ламин или полностью их исключают, приводят к снижению прочности ядерной оболочки, которая становится неспособной поддерживать



РИС. 9.14. Иммунофлуоресцентное окрашивание ламина В в фибробластах на разных стадиях клеточного цикла. Ламин В локализуется в ядерной оболочке в интерфазе, однако в профазе, по мере его фосфорилирования, фрагментирует. В метафазе ламин В остается в диспергированном состоянии и в телофазе реассоциирует с хроматином, формируя новую оболочку вокруг каждого дочернего ядра, образующегося при цитокинезе. Фотография любезно предоставлена Джоном Коммоном и Биржитт Лейн, Центр молекулярной медицины, Сингапур

свою форму; у больных разбиваются спонтанные грыжи и пониженная устойчивость к механическим нагрузкам. У человека мутации в ламине В-типа не обнаружены, и, вероятно, они являются летальными, поскольку эти ламины экспрессируются в раннем эмбриогенезе во всех клетках. Однако мыши, в клетках которых экспрессируется укороченный, поврежденный вариант ламина В, характеризуются множественными дефектами развития, напоминающими многие патологии человека, связанные с мутациями в ламинах А-типа, которые вскоре после рождения оказываются летальными. Эта модель поможет прояснить механизмы развития некоторых болезней человека.

Исследование последствий нарушения функций некоторых белков оказывается чрезвычайно информативным для понимания белковых функций вообще, и, конечно, это, в частности, относится и к промежуточным филаментам. Разумеется, мы не можем утверждать, что в полной мере выяснили патогенез того или иного заболевания, однако в случае кератинов, десмина, GFAP и белков нейрофиламентов существует интуитивная связь между клиническими его проявлениями и повышенной травмируемостью клеток. Однако постоянно пополняющийся список разнообразных «ламинопатий» порождает вопрос, действительно ли все они связаны лишь со снижением эластичности клеток и тканей, имеющей первичную или вторичную природу. Конечно, на уровне клетки, многие типы физиологического стресса могут переходить в механический стресс. Так, например, воздействие химических соединений может вызвать увеличение осмотического давления. Наоборот, ламинопатии могут отражать ускоренную селективное удаление из ткани поврежденных клеток с первичной тканевой мишенью, определяемой другими, пока неидентифицированными факторами. В этой области предстоит выполнить еще много исследований.

9.7 Даже два разных белка филаментов хрусталика сохранили свою структуру в процессе эволюции

Основные положения

- Хрусталик глаза содержит два специфических белка промежуточных филаментов, CP49 и филенин, которые входят в VI группу гомологичных последовательностей
- Эти специфические белки промежуточных филаментов сохранили свою структуру в процессе эволюции позвоночных

Клеткам хрусталика глаза позвоночных свойственны крайне жесткие критерии программы дифференцировки, что необходимо для последующего правильного функционирования ткани. Клетки должны:

- Обладать достаточной упругостью и в то же время эластичностью, которая допускает аккомодацию хрусталика.

- Сохранять полную прозрачность для того, чтобы не затемнять хрусталик.
- Сохранять перечисленные качества на протяжении всей жизни организма.

В клетках хрусталика содержатся два специфических белка, которые образуют «филаменты типа бус». Такое название они получили за характерный профиль поверхности, видимый в электронном микроскопе (остальные промежуточные филаменты имеют гладкую поверхность). Эти белки называются CP49 (или факинин) и филенин. Они относятся к белкам VI типа. Оба белка имеют структурные характеристики, свойственные другим типам белков, однако их последовательности не гомологичны ни одной последовательности среди белков остальных групп. Одним из наиболее существенных различий является наличие у них «знаковой» последовательности, свойственной белкам промежуточных филаментов, а именно последовательности на конце спирального участка. У CP49 на конце стержнеобразного домена находится последовательность Tyr-His-Gly-Ile-Leu-Asp-Gly-Glu, в то время как у других белков промежуточных филаментов на этом месте присутствует консервативная последовательность Tyr-Arg-Lys-Leu-Leu-Glu-Gly-Glu.

Гены, кодирующие CP49 и филенин, сильно отличаются от генов, кодирующих другие белки промежуточных филаментов. Такое своеобразие этих генов дает им селективное преимущество перед соответствующими генами других клеток, поскольку высоко гомологичные белки хрусталика сохраняются у всех позвоночных. Последовательность, соответствующая CP49/факинину, обнаружена в геноме сродночелюстной рыбы *Fugu ribripes*, позвоночного организма, эволюционно очень далеко отстоящего от млекопитающих. Консервативность структуры проявляется даже у специфической последовательности, находящейся на конце спирального участка CP49/факинина.

Белки клеток хрусталика проявляют особые свойства в силу ряда причин. Во-первых, они обеспечивают развитие максимально прозрачного хрусталика. Во-вторых, поскольку хрусталик должен функционировать в течение всей жизни организма, его полимерные структуры должны обладать исключительной биохимической устойчивостью с тем чтобы не допустить деградации белков и изменений их структуры, которые могут привести к нарушению его физических или оптических характеристик и к утрате функции. Считается, что специфические последовательности и морфологические особенности CP49 и филенина каким-то образом способствуют поддержанию свойств этих белков. В экспериментах на животных с измененным характером экспрессии белков филаментов хрусталика показано развитие последовательных нарушений функционирования хрусталика глаза. Также показано, что доминантные мутации в CP49 являются причиной развития ранней семейной катаракты у человека.

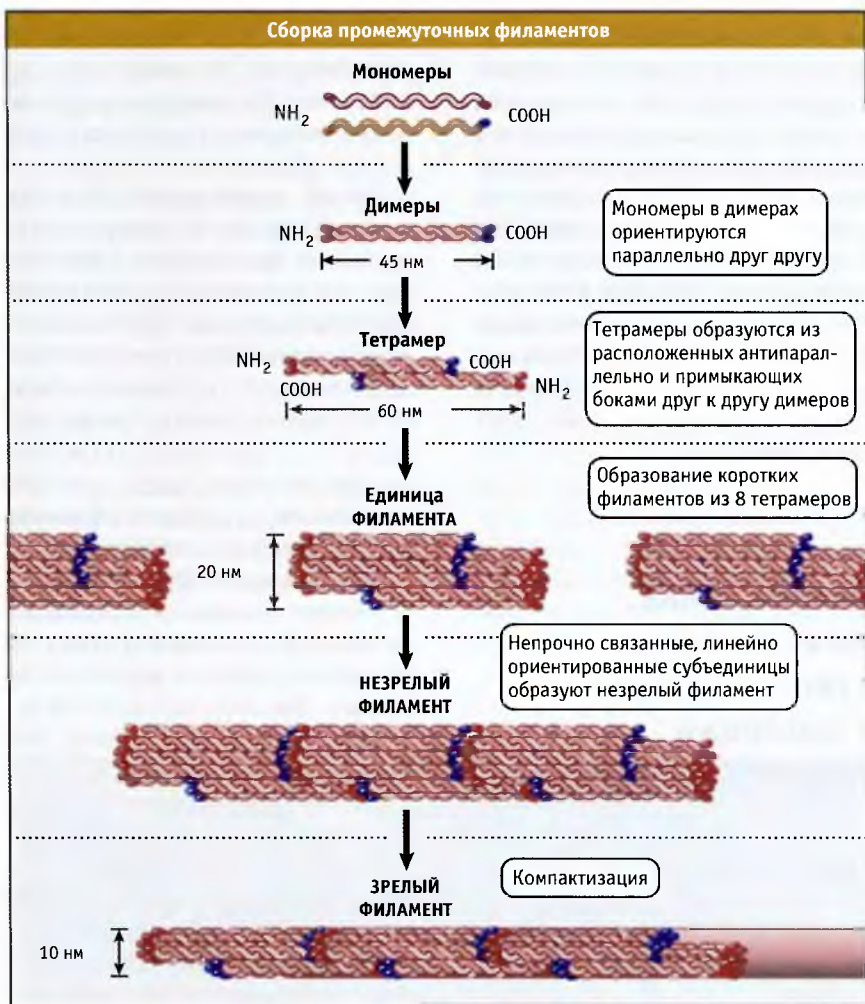
9.8 Субъединицы промежуточных филаментов обладают высоким сродством друг к другу и полимеризуются в механически прочные структуры

Основные положения

- *In vitro* сборка промежуточных филаментов происходит быстро и не требует участия дополнительных факторов
- Во всех белках промежуточных филаментов в центральной части присутствует протяженный α -спирализованный стержневой домен, который необходим для формирования димеров
- Сборка из антипараллельных тетрамеров определяет неполярную природу цитоплазматических промежуточных филаментов
- Сеть промежуточных филаментов является более прочной по сравнению с актиновыми филаментами или микротрубочками, и при нагрузке ее прочность усиливается

В настоящее время на основании данных анализа аминокислотных последовательностей и степени гомологии, а также сведений о биохимических свойствах и кристаллической структуре фрагментов накапливается информация о строении белков промежуточных филаментов.

Первая стадия сборки промежуточных филаментов состоит в образовании суперспирализованных димеров за счет взаимодействия α -спирализованных концевых доменов (). Альфа-спираль является наиболее распространенным элементом вторичной структуры белков и впервые была обнаружена именно у белков промежуточных филаментов. У белков промежуточных филаментов α -спирали очень длинные. Для приобретения устойчивости в цитоплазме стержнеобразный домен должен образовать суперспираль с α -спирализованным стержневым доменом другого белка промежуточного филамента. Необходимость такого взаимодействия



Современная модель сборки промежуточных филаментов из мономерных белков. Образование димеров происходит очень быстро и является необходимым условием предотвращения деградации белка. По-видимому, тетрамеры являются минимальными по величине агрегатами *in vivo*. Для простоты неспирализованные домены не показаны. Последовательности на границе спирализованных и стержневого доменов обозначены красным (со стороны N-концевого участка) и синим цветом (со стороны С-концевого участка)