

А.Фултон Цитоскелет.
Архитектура
и хореография клетки



«Мир»

**THE CYTOSKELETON.
CELLULAR ARCHITECTURE AND
CHOREOGRAPHY**

Alice Fulton

Department of Biochemistry
University of Iowa

LONDON NEW YORK
SHAPMAN AND HALL

**А.Фултон Цитоскелет.
Архитектура
и хореография клетки**

Перевод с английского
канд. биол. наук В. А. Розенблата



Москва «Мир» 1987

УДК 576.31
Ф96
ББК 28.05

Фултон А.

Ф96 Цитоскелет: Архитектура и хореография клетки:
Пер. с англ. — М.: Мир, 1987.—120 с., ил.

Книга Алисы Фултон (США) относится к серии кратких руководств, освещающих последние достижения по отдельным, быстро развивающимся направлениям исследования. Написанная на хорошем научном уровне и в доступной форме, книга отражает современное представление о цитоскелете.

Предназначена для научных работников, интересующихся проблемами биологии клетки в норме и патологии, а также для студентов и преподавателей биологических и медицинских вузов.

Ф 2001020000—121 131—87
041(01)—87

ББК 28.05

Редакция литературы по биологии

© A. Fulton 1984
This book was originally published in the
English language by Chapman and Hall Ltd,
London, UK

© перевод на русский язык, «Мир», 1987

От редакции

Книга американского цитолога Алисы Фултон охватывает широкий круг тем, имеющих отношение к цитоскелету. В ней последовательно рассматриваются молекулярный, структурный и функциональный аспекты этой проблемы: химия цитоскелетных белков, их распределение и взаимосвязь, а также распределение и взаимосвязь структурных элементов цитоскелета и его роль в том, что автор называет «хореографией клетки», т. е. в процессах упорядоченного, регулируемого перераспределения клеточных компонентов.

Книга полезна для всех биологов, интересующихся вопросами цитоскелета. Для тех, кто хочет познакомиться с этой проблемой более подробно, можно порекомендовать общие руководства, в которых цитоскелету и клеточной подвижности уделено много внимания: Хэм А., Кормак Д. Гистология. — М.: Мир, 1982—1983. Ченцов Ю. С. Общая цитология. — М.: МГУ, 1984. Албертс Б. и др. Молекулярная биология клетки. — М.: Мир, 1986—1987.

1. Введение

*Многочисленным коллегам,
чья великодушная помощь сделала эту книгу лучше;
Шелдону Пенману за микрофотографии,
а также тем многим, чьи любезные предложения
были отклонены только из-за недостатка места;
Кэрол Гэлбрейт, облегчившей написание этой книги
настолько, насколько было возможно;
и Тому, без которого этой книги вообще не было бы,
— моя благодарность.*

Броуновское движение в эукариотической клетке — признак ее гибели. Живая клетка определенным образом ориентирует свои органеллы и субклеточные частицы, и все в ней, что не покоится, находится в состоянии направленного движения, поддерживаемого за счет метаболизма. Каждому типу клеток присущи свой, специфический характер движения и своя, особая пространственная организация. С функциональной точки зрения цитоскелет и есть как раз совокупность тех структур, которые ответственны за пространственную организацию клетки.

Из чего же состоит цитоскелет? Для одних он лишь сеть, образованная промежуточными филаментами, либо микрофиламентами, либо микротрубочками. Для других — комбинация двух или трех таких фибриллярных систем и ассоциированных с ними белков. Вряд ли, однако, какая-либо одна система филаментов может претендовать на исключительное право называться цитоскелетом, так как между всеми тремя системами существуют многообразные взаимодействия.

Предыдущие определения цитоскелета являются скорее описательными, а не конструктивными. Операциональный подход к структурным основам пространственной организации состоит в том, чтобы ввести понятие цитоскелетного остова клетки и определить его как совокупность структур, сохраняющихся после экстракции клетки неионогенными детергентами. При соответствующих способах экстракции получающийся препарат цитоскелетного остова содержит все перечисленные системы филаментов. Цитоскелетный остов отличается весьма сложным строением, в нем сохранены многие элементы,

связывающие цитоскелет с ядерным матриксом и клеточной мембраной и не отраженные более узкими определениями, данными выше. Еще больше структур, отвечающих за пространственную организацию, включает в себя так называемый цитоплазматический матрикс, который виден после фиксации интактных клеток. В его состав входят и такие белки, связь которых с цитоскелетным остовом относительно кратковременна. Цитоплазматический матрикс содержит микротрабекулы — множество мелких гетерогенных структур, соединяющих элементы цитоскелетного остова друг с другом и с различными органеллами.

Между описанными понятиями нет резкой границы, они незаметно переходят друг в друга, и всякая попытка строго их разграничить приводит к трудностям того же рода, что и вопрос о том, нужно ли относить периферические мембранные белки к компонентам мембраны. Сказанное выше должно было лишь показать иерархию цитоскелетных структур.

Белки цитоскелета соединяются друг с другом специфичным для каждого типа клеток образом и формируют сложные, динамические, взаимодействующие между собой структуры. Эти структуры и отвечают непосредственно за согласованное поведение частей клетки. Вместе с тем объяснение такого поведения следует искать в отвечающих за него молекулах, механизмы пространственной организации клетки скрыты в химических свойствах цитоскелетных белков.

Литература

1. *Borgers M., De Brabander M.* (1975). *Microtubules and Microtubule Inhibitors*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
2. Капуччинелли П. Подвижность живых клеток. — М.: Мир, 1982.
3. Ciba Foundation Symposium (1973). *Locomotion of Tissue Cells*, Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
4. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, XLVI (1982). *Organization of the Cytoplasm*, Cold Spring Harbor Labs.
5. *Curtis A. S. G., Pitts J. D.* (1980). *Cell Adhesion and Motility*, Cambridge University Press, Cambridge.
6. *Dowben R. M., Shay J. W.* (1981). *Cell and Muscle Motility*, Plenum Press, New York.

7. *Dustin P.* (1978). *Microtubules*, Springer-Verlag, New York.
8. *Frederiksen D. W., Cunningham L. W.* (1982). *Methods in Enzymology, Structural and Contractile Proteins; Part B, The Contractile Apparatus and the Cytoskeleton*, Academic Press, New York.
9. *Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J.* (1976). *Cell Motility*, Cold Spring Harbor.
10. *Pearson M. L., Epstein H. F.* (1982). *Muscle Development: Molecular and Cellular Control*, Cold Spring Harbor.
11. *Roberts K., Hyams J. S.* (1979). *Microtubules*, Academic Press, London.
12. *Tanenbaum S. W.* (1978). *Cytochalasins: Biochemical and Cell Biological Aspects*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

2. Химия белков

В настоящее время белки, входящие в состав трех основных систем цитоскелетных филаментов, уже выделены и изучаются *in vitro*. Эти белки имеют общие свойства, отражающие функциональные возможности и характер взаимодействия рассматриваемых систем. И актин, и тубулин, и белки промежуточных филаментов могут быть *in vitro* деполимеризованы и реполимеризованы. Все они образуют наиболее экономичный тип структуры — филаменты. Эти филаменты полярны (их головные и хвостовые концы различаются химически) и, кроме того, имеют форму спирали. Спиральные образования содержат множество эквивалентных связывающих участков; благодаря этому оказывается возможным возникновение большого числа разнообразных структур, формирующихся в результате случайных взаимодействий, а не детерминированным путем, каким идет, например, сборка фагов [1]. Для всех рассматриваемых белков характерна множественность форм: так, есть несколько тканеспецифичных изоформ актина и тубулина. Тем не менее в эволюционном отношении они очень консервативны [2]. У белков промежуточных филаментов межтканевые различия выражены сильнее, а эволюционный консерватизм — слабее [3, 4]. Существуют, однако, антитела, реагирующие одновременно с промежуточными филаментами из *Drosophila* и млекопитающих. В регуляции и функционировании всех трех фибриллярных систем принимает участие кальций. Его высокоспецифичное регуляторное влияние на поведение цитоскелета осуществляется столь многими путями, что он может рассматриваться как связующее звено между «растворимыми» сигналами и конфигурацией цитоскелета. Все три типа филаментообразующих белков могут — как в форме филаментов, так и иначе — связываться с другими белками, и именно это избирательное связывание будет детально обсуждаться в настоящей главе. Разнообразное участие в таком связывании может принимать фосфорилирование белков — как самих филаментообразующих, так и ассоциированных с ними. Наконец, белки цитоске-

летных филаментов выделяются своей кислотностью; N-конец актина, C-конец тубулина, а также большинство белков промежуточных филаментов являются очень кислыми, но какую это может играть роль, остается пока неясным.

2.1. Актин и актин-связывающие белки

2.1.1. Полимеризация актина

Мономер актина (G-актин, 42 кДа) — глобулярный белок, имеющий участки связывания двухвалентных катионов и нуклеотидов. В физиологических условиях эти участки заняты магнием и АТФ. Полимеризация актина представляет собой многостадийный процесс, и для того, чтобы понять действие на нее актин-связывающих белков, нужно учитывать всю ее сложность [5]. Полимеризация представлена схематически на рис. 2.1. В результате полимеризации образуются филаменты (F-актин).

Мономеры актина могут соединяться друг с другом, образуя димеры и тримеры, но только тримеры достаточно стабильны, чтобы служить затравками для дальнейшей полимеризации. Сразу после образования затравки (вероятно, тримера) начинается рост полимера — элонгация. Этот процесс может идти на обоих концах филамента, но скорость его для одного и другого конца, как правило, неодинакова. Путем декорирования филаментов тяжелым меромиозином (образующим на филаментах структуры, похожие на наконечники стрел) может быть определена их полярность. На «оперенном» конце филамента (к которому обращены тупые концы стрел после декорирования миозином) элонгация идет быстро, а критическая концентрация полимеризации актина для этого конца ниже, чем для другого (в присутствии АТФ). «Заостренный» конец (к которому обращены наконечники стрел) растет медленнее и характеризуется более высокой критической концентрацией. Полимеризация сопровождается гидролизом АТФ, однако гидролиз не необходим для полимеризации, поскольку она так же хорошо идет и в присутствии негидролизуемых аналогов АТФ [5]. По мере удлинения филаменты могут фрагмен-

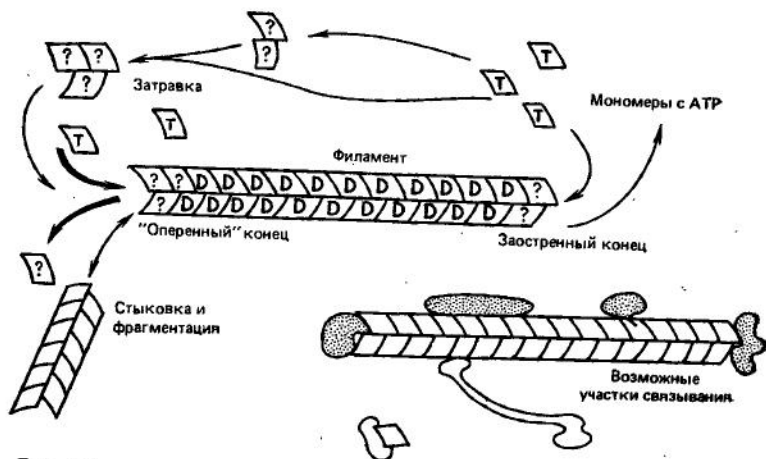


Рис. 2.1

тироваться в результате теплового движения; кроме того, они могут соединяться друг с другом конец в конец.

Таким образом, при полимеризации актина может в принципе иметь место несколько разных процессов: образование затравок (нуклеация), добавление мономеров к концам филаментов (элонгация), диссоциация мономеров на концах, фрагментация филаментов и их стыковка. К сожалению, когда в растворе актина идет полимеризация, большинство этих процессов протекает одновременно. Кроме того, каждый акт фрагментации филаментов приводит к образованию новых свободных концов, которые ведут себя как затравки. Поэтому для детального анализа какого-либо одного процесса необходимо тем или иным способом воздействовать на ход полимеризации, чтобы дискриминировать различные ее аспекты.

Выбор метода для оценки полимеризации также влияет на то, какая из ее сторон будет доступна изучению. Например, вязкость зависит от длины филаментов, но не от скорости обмена их субъединиц на концах. Тушение флуоресценции нечувствительно к длине филаментов и потому может быть мерой доли актина, включившегося в состав филаментов, но оно зависит от того,

происходит или не происходит обмен субъединиц [5]. При прямом измерении длины филаментов с помощью электронного микроскопа трудности создает их фрагментация (если не ограничиваться лишь короткими филаментами). Таким образом, для полного описания кинетических и равновесных характеристик полимеризации актина требуется обычно применение нескольких разных методов измерения.

2.1.2. Актин-связывающие белки

Есть пять основных мест, где может быть приложено действие актин-связывающих белков. Они могут связываться с мономером актина; с «заостренным», или медленно растущим, концом филамента; с «оперенным», или быстро растущим, концом; с боковой поверхностью филамента; и наконец, сразу с двумя филаментами, образуя поперечную сшивку между ними (рис. 2.1). В дополнение к пяти указанным типам взаимодействия актин-связывающие белки могут быть чувствительны или нечувствительны к кальцию. При таком разнообразии возможностей вряд ли покажется удивительным, что было обнаружено множество актин-связывающих белков и что некоторые из них способны к нескольким типам взаимодействия.

Белки, связывающиеся с мономерами, подавляют формирование затравок, ослабляя взаимодействие мономеров друг с другом. Эти белки могут уменьшать, но могут и не уменьшать скорость элонгации — это зависит от того, будет ли комплекс актина с актин-связывающим белком способен присоединяться к филаментам. Профилин и фрагмин — чувствительные к кальцию белки, взаимодействующие с актиновыми мономерами [6]. Оба нуждаются в кальции для связывания с актином. Комплекс профилина с мономером может надстраивать предсуществующие филаменты, а комплекс фрагмина с актином нет. Поэтому профилин в основном ингибирует нуклеацию, тогда как фрагмин подавляет и нуклеацию, и элонгацию. Из трех нечувствительных к кальцию взаимодействующих с актином белков два — ДНКза I и белок, связывающийся с витамином D [5], — функцио-

нируют вне клетки. Физиологическое значение их способности связываться с актином неизвестно. В головном мозге есть, однако, белок, который, связываясь с мономерами, деполимеризует актиновые филаменты; его деполимеризующее действие объясняется тем, что связывание мономеров приводит к снижению концентрации доступного для полимеризации актина [5].

«Оперенный», или быстро растущий, конец актиновых филаментов может быть блокирован так называемыми кепирующими белками, а также цитохалазином В или D. Блокируя точку быстрой сборки филаментов, кепирующие белки способствуют нуклеации, но подавляют элонгацию и стыковку филаментов конец в конец. Суммарный эффект состоит в появлении укороченных филаментов, это обусловлено как увеличением количества затравок, конкурирующих за свободные мономеры, так и отсутствием стыковки. Известно по меньшей мере четыре белка, действующих подобным образом в присутствии кальция: гельзолин, виллин, фрагмин, а также белок с мол. массой 90 кДа из тромбоцитов [5]. Все они способны сокращать обусловленную нуклеацией лаг-фазу при полимеризации очищенных мономеров и укорачивать уже образовавшиеся филаменты. Существуют также и нечувствительные к кальцию кепирующие белки. Так, белки с мол. массой 31 и 28 кДа из акантамебы и белок с мол. массой 65 кДа из тромбоцитов [6] оказывают свое действие независимо от присутствия или отсутствия кальция.

Еще одна точка, в которой возможно взаимодействие белков с филаментами, — это «заостренный», или медленно растущий, конец. Связывание белка в ней может инициировать нуклеацию и мешать стыковке филаментов. Оно влияет и на скорость элонгации, причем это влияние зависит от концентрации актина. При значениях последней в интервале между критическими концентрациями для медленно растущего и быстро растущего концов связывание белка с медленным концом будет увеличивать скорость элонгации за счет предотвращения потери мономеров на нем. Если, однако, концентрация актина превосходит большую из критических, связывание белка с медленным концом приведет к снижению

суммарной скорости элонгации вследствие блокирования одной из точек присоединения мономеров. Общим итогом указанных трех эффектов (стимуляции нуклеации, подавления стыковки и подавления элонгации) будет увеличение числа и уменьшение длины филаментов. Эти эффекты сходны с теми, которые вызывают белки, связывающиеся с «оперенным» концом. Вот почему для того, чтобы определить, к какому из двух классов относится данный белок, т. е. на какой конец филаментов он действует, нужно провести либо опыты по конкуренции этого белка с такими, которые связываются заведомо с быстрым концом, либо опыты с полимеризацией на предсуществующих затравках [5, 6]. В настоящее время лишь про один белок определенно известно, что он связывается с «заостренным», или медленно растущим, концом актиновых филаментов, а именно про акументин, содержащийся в больших количествах в макрофагах [7]. Возможно, что это справедливо и для бревина [6] — сывороточного белка, который вызывает быстрое снижение вязкости растворов F-актина, укорачивая филаменты без увеличения концентрации свободных мономеров. Ни бревин, ни акументин нечувствительны к концентрации кальция.

Четвертый тип связывания с актиновыми филаментами — это связывание с их боковой поверхностью без последующего сшивания их друг с другом. Присоединение белков к поверхности может как стабилизировать, так и дестабилизировать филаменты. Тропомозин связывается нечувствительным к кальцию образом и стабилизирует F-актин [5], тогда как северин и виллин, связываясь с актиновыми филаментами, «разрезают» их в присутствии кальция [5, 8].

Но, пожалуй, наиболее эффектными из актин-связывающих белков являются те, которые могут сшивать актиновые филаменты между собой и вызывать тем самым образование геля. Связываясь с F-актином, эти белки индуцируют обычно также и нуклеацию. По меньшей мере четыре сшивающих фибриллярный актин белка способны индуцировать гелеобразование в отсутствие кальция. Это α -актинин из тромбоцитов [5], виллин [6], фимбрин [9] и актиногелин из макрофагов [6]. Все они

превращают раствор F-актина в жесткий гель, способный препятствовать движению металлического шарика; добавление кальция приводит к растворению такого геля. Все четыре перечисленных белка являются мономерными. В случае виллина белковая молекула может быть разделена на отдельные домены: сердцевину, которая чувствительна к кальцию и способна связываться с актиновыми филаментами и кепировать их, и головку, которая нужна для сшивания филаментов в отсутствие кальция. Существуют также многочисленные нечувствительные к кальцию сшивающие белки. Два из них, филамин и актин-связывающий белок из макрофагов [6], являются гомодимерами, они состоят из длинных, гибких белковых субъединиц. Мышечный α -актинин — еще один нечувствительный к кальцию сшивающий белок [5]. Образовывать сшивки без помощи дополнительных белков способны также винкулин и белок высокой молекулярной массы из клеток линии ВНК. В то же время фасцин из морских ежей сам по себе может обеспечить формирование лишь узких, похожих на иглы пучков актиновых филаментов, а для того, чтобы вызвать гелеобразование, ему нужно содействие белка с мол. массой 220 кДа [6].

Семейство спектрина — одно из самых интересных в группе тех сшивающих белков, на которые кальций непосредственно не действует. Собственно спектрин — это тетрамер $(\alpha\beta)_2$, обнаруженный первоначально в мембранном скелете эритроцитов. $\alpha\beta$ -Димеры связываются друг с другом «хвост к хвосту», а головки молекул остаются свободными и могут взаимодействовать с олигомерами актина. α -Субъединица каждого димера может, кроме того, взаимодействовать с кальмодулином — кальций-связывающим белком, участвующим во многих регулируемых кальцием процессах. До сих пор неизвестно, какое действие оказывает связывание кальмодулина на активность спектрина. Спектриноподобные молекулы найдены к настоящему времени в клетках многих типов [10, 11, 12], так что правильнее будет говорить о семействе спектрина. α -Субъединица спектрина из эритроцитов имеет мол. массу 240 кДа. Иммунологически родственной ей белок с такой же мол. массой был обнаружен

в большинстве исследованных типов клеток. Мол. масса β -субъединицы спектрина из эритроцитов — 220 кДа. В комплексе с белком с мол. массой 240 кДа, реагирующим с антителами против α -спектрина, в клетках может обнаруживаться, однако, и субъединица с мол. массой 260 кДа (найдена в терминальной сети) или, например, 235 кДа (найдена в нервных клетках и клетках других типов). Эти родственные, дающие перекрестную иммунологическую реакцию комплексы были описаны сначала как самостоятельные белки и получили название TW260/240 и фодрина. Таким образом, подобно многим другим цитоскелетным белкам, белки семейства спектрина являются тканеспецифичными. То, что все эти белки содержат кальмодулин-связывающий домен, было установлено лишь недавно, и что из этого следует, еще предстоит понять.

Миозин — единственный из имеющих отношение к актину белков, способный генерировать механическую силу. Производимая им за счет АТФ механическая работа лежит в основе мышечного сокращения и обеспечивает, как полагают, натяжение, развиваемое фибробластами и другими клетками при контакте с внеклеточным матриксом. Взаимодействие миозина с актином очень сложно — настолько, что ему была посвящена отдельная книга в этой серии¹. Миозин производит работу путем циклического взаимодействия с актином. Миозин-ADP связывается с актиновыми филаментами, происходит изменение конформации миозина, сопровождающееся освобождением ADP, и затем АТФ, если он есть в растворе, замещает освободившийся из миозина ADP и индуцирует отсоединение актиновых нитей от миозина. После гидролиза АТФ может начаться следующий цикл. Кальций регулирует этот процесс в нескольких точках. В некоторых мышечных клетках он взаимодействует с тропонином, контролируя связывание тропомиозина с актином. Про такие клетки говорят, что в них регуляция осуществляется на уровне тонких нитей. В других мышцах кальций действует на молекулу миозина — либо прямо, либо активируя ферменты, фосфорилирующие ее легкие цепи.

¹ Бэгшоу К., Мышечное сокращение.— М., Мир 1985.

В некоторых немышечных клетках кальций регулирует сокращение на уровне сборки миофиламентов.

Взаимосвязь между разными классами актин-связывающих белков становится яснее, если рассматривать ее с точки зрения теории гелей, предложенной *Flory*. Эта теория утверждает, что при достаточно большой вероятности сшивок между полимерами формируется сшитая трехмерная сеть. Тем самым предсказывается существование «точки гелеобразования», в которой должен происходить резкий переход от раствора к гелю, отчасти сходный в математическом отношении с такими фазовыми переходами, как плавление и испарение; дальнейшее увеличение количества сшивок — за точкой гелеобразования — должно приводить лишь к изменению жесткости геля. Таким образом, белки, образующие поперечные сшивки, будут переводить вязкий раствор F-актина в состояние геля, а те белки, которые разрушают филаменты или вызывают увеличение их числа, станут растворять гель путем снижения средней длины полимеров, не сопровождающегося возрастанием количества сшивок: гель растворится, когда плотность распределения сшивок упадет ниже уровня, определяемого точкой гелеобразования. Миозин может взаимодействовать с гелем и вызывать его сокращение. Теория гелей оказывается полезной при сопоставлении свойств актин-связывающих белков разных классов и при разработке методов исследования их функций. Следует, однако, иметь в виду, что теория гелей рассматривает лишь изотропные структуры и сама по себе не учитывает топологических особенностей конкретных систем. Как станет ясно из дальнейшего, топология цитоскелета является чрезвычайно важной его характеристикой, которую теория гелей предсказать пока не может.

Для осмысленной интерпретации результатов химического исследования белков необходимо детальное знание условий внутри клетки, включая точную стехиометрию всех белков, имеющих отношение к изучаемым процессам, и такие регуляторные факторы, как pH, рСа, концентрация нуклеотидов, а также, по-видимому, фосфолипидный состав прилегающих мембран. В ситуации, когда белки могут в стехиометрии 1 : 500 эффективно

индуцировать явления, несущие черты резких кооперативных переходов, количественные предсказания становятся, очевидно, сомнительным делом.

2.2. Тубулин и сборка микротрубочек

Микротрубочки, подобно микрофиламентам, являются линейными полимерами. Они построены из молекул тубулина, представляющих собой $\alpha\beta$ -димеры. Как α -, так и β -тубулин имеют мол. массу около 55 кДа и могут содержать связанный GTP или GDP. В димере только тот нуклеотид, который связан β -тубулином, может обмениваться с GTP, присутствующим в растворе. Как и у актина, аминокислотная последовательность тубулина высококонсервативна. Пептиды α и β разошлись на ранних этапах эволюции эукариот, и последующие изменения уже не были столь существенными [13].

Полимеризация тубулина имеет много общего с полимеризацией актина. Молекулы соединяются и образуют затравку, от которой в обе стороны начинается рост полимера, сопровождающийся гидролизом связанного нуклеозидтрифосфата [13]. Критические концентрации полимеризации на двух разных концах микротрубочки неодинаковы, что в принципе делает возможным «проток» молекул тубулина вдоль микротрубочки (в тех случаях, когда концентрация свободного тубулина в растворе лежит в интервале между критическими концентрациями для концов) [14]. Фрагментация и соединение конец в конец могут, как и в случае актиновых филаментов, изменять численную концентрацию концов микротрубочек в препарате, не влияя на количество молекул, входящих в состав полимера.

На сборку микротрубочек влияют концентрация двухвалентных катионов и температура: она подавляется кальцием, ЭДТА и холодом. Гидролиз GTP не необходим для полимеризации, судя по тому что и негидролизуемые аналоги поддерживают ее на нормальном уровне; однако образующиеся при этом микротрубочки устойчивы к действию кальция.

Для тубулина разнообразие потенциально возможных путей полимеризации выше, чем для актина. *In vitro*

можно наблюдать образование нескольких разных полимерных форм тубулина, причем то, какие именно формы образуются, зависит от условий проведения полимеризации [13]. Полиморфизм продуктов полимеризации тубулина направил усилия исследователей на поиск факторов, способных стимулировать ее — зачастую в весьма нефизиологических условиях. В принципе тубулин-связывающие белки можно было бы классифицировать так же, как мы классифицировали актин-связывающие белки, т. е. по способности присоединяться к свободным молекулам тубулина, быстро растущему и медленно растущему концам микротрубочек и их боковой поверхности. Однако по причинам исторического характера большинство ассоциированных с микротрубочками белков изучалось либо с точки зрения их сополимеризации с тубулином, либо с точки зрения их способности стимулировать сборку микротрубочек. Как уже говорилось ранее по поводу микрофиламентов, то, что мы называем полимеризацией, складывается из нуклеации, элонгации, фрагментации и стыковки, и на каждый из перечисленных процессов при сборке микротрубочек могут влиять тубулин-связывающие белки. К этому надо добавить, что, поскольку затравки для сборки микротрубочек больше тех, какие нужны для сборки микрофиламентов, нуклеация при полимеризации тубулина особенно чувствительна к его концентрации. Действие всякого фактора, стабилизирующего затравку, будет проявляться главным образом в стимуляции нуклеации — независимо от того, является ли это его функцией *in vivo*. Имея все это в виду, перейдем к обсуждению ассоциированных с микротрубочками белков по отдельности.

2.2.1. Белки, ассоциированные с тубулином

Две основные группы белков, ассоциированных с микротрубочками (БМ), были первоначально идентифицированы по способности не отделяться от тубулина в циклах полимеризации — деполимеризации или оставаться связанным с этим белком при его очистке другими методами. Заметим, что способность оставаться постоянно связанным с тубулином нельзя считать адекват-

ным критерием специфичности взаимодействия с ним, поскольку тубулин — сильно заряженный белок и может вести себя как ионообменник. Однако белки этих двух основных групп были также обнаружены на микротрубочках в фиксированных неэкстрагированных клетках.

Одну группу БАМ составляют белки с высокой мол. массой (от 290 до 350 кДа), их присутствие характерно для микротрубочек головного мозга [15]. В другую группу входят белки с мол. массой между 55 и 70 кДа, обозначаемые буквой τ [16, 17]. БАМ высокой мол. массы, и τ -БАМ первоначально были описаны как белки, стимулирующие полимеризацию. Внешний вид микротрубочек, декорированных БАМ той или другой группы, и локализация этих белков в клетке говорят о том, что как БАМ высокой мол. массы, так и τ -БАМ связываются с боковой поверхностью микротрубочек. Их стимулирующее влияние на полимеризацию обусловлено, по-видимому, стимуляцией нуклеации — аналогично, надо думать, белкам, которые связываются с боковой поверхностью актиновых филаментов. На микротрубочках, декорированных БАМ высокой мол. массы, видны боковые выросты («ручки»), из-за чего эти микротрубочки выглядят опущенными. Боковые ручки могут контактировать с секреторными гранулами; АТР вызывает открепление гранул [18].

Несколько БАМ было идентифицировано в различных клетках с помощью иного метода, выявляющего связь белков с микротрубочками *in vivo* [19]. В их число входят белок с мол. массой 69 кДа, гомологичный τ -белкам, и белок с мол. массой 80 кДа, гомологичный по некоторым пептидам белку, имеющему мол. массу 69 кДа. Оба белка в той или иной степени фосфорилированы, причем чем выше степень их фосфорилированности, тем лучше они связываются с микротрубочками [19]. Это один из немногих случаев, когда фосфорилирование цитоскелетных белков ощутимо влияет на их сродство к цитоскелету.

В препарате микротрубочек обнаружена нуклеозиддифосфат—киназа; ее удельная активность в препарате может оставаться постоянной на протяжении трех циклов полимеризации [13]. Этот фермент не идентичен ни

одному из БАМ высокой мол. массы или τ -БАМ. Он способен фосфорилировать как GDP, так и ADP. Какой вклад вносит нуклеозид-дифосфат—киназа в функционирование микротрубочек, пока неизвестно.

Тубулин-L-тирозинлигаза — фермент, у которого имеются две изоформы. Тирозинлигаза катализирует посттрансляционное присоединение тирозина к С-концевому глутамату α -субъединицы тубулина. Описаны изменения в распределении как самого фермента, так и тирозилированного тубулина, однако функциональное значение этих изменений до сих пор неизвестно [13].

В препаратах микротрубочек, очищенных различными методами, присутствует сАМР-зависимая протеинкиназа. Эта киназа ассоциирована с БАМ-2; в присутствии сАМР и АТР она может фосфорилировать как БАМ-2, так и τ -БАМ [20]. Фосфорилирование этих белков, возможно, усиливает их стабилизирующее действие на микротрубочки или стимулирует их связывание с микротрубочками.

БАМ высокой мол. массы — БАМ-1 (~350 кДа) и БАМ-2 (~270 кДа) — дают при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия гетерогенную картину. БАМ-2 разделяется на два компонента, а БАМ-1 состоит по меньшей мере из трех компонентов. БАМ-1 содержит также полипептиды меньшего размера (называемые легкими цепями 1 и 2), которые имеют мол. массу приблизительно 30 и 28 кДа и присутствуют в соотношении 1:1. БАМ-1 распространен, по-видимому, более широко, чем БАМ-2; он обнаруживается как на микротрубочках интерфазных клеток, так и в митотическом веретене [21].

С микротрубочками может быть связан механохимический белок динеин, который во многих отношениях аналогичен миозину [22]. Состав динеина зависит от источника, из которого он выделен, и методов, применявшихся при выделении. Динеин из ресничек состоит примерно из 12 полипептидных цепей, в том числе трех цепей с мол. массой ~400 кДа, двух или трех цепей с мол. массой ~85 кДа и шести-восьми цепей небольшого размера. Динеин обладает стимулируемой микротрубочками АТР-азной активностью. Эта активность подавля-

ется ортованадатом. После некоторых воздействий динеин, сохраняя АТФ-азную активность, оказывается неспособным образовывать поперечные шивки между микротрубочками. Это означает, что, как и многие из белков, сшивающих актин, динеин имеет несколько связывающих доменов. Динеин может сшивать как дублеты микротрубочек из ресничек, так и одиночные микротрубочки, полученные при полимеризации очищенного тубулина из головного мозга. Сшивки разрушаются под действием АТФ. Динеин присоединяется к микротрубочкам ориентированным образом, так что путем декорирования микротрубочек очищенным динеином может быть определена их полярность.

По аналогии с актином можно представить себе, что для тубулина существуют белки, взаимодействующие с мономерами, и белки, кепирующие концы полимера. И хотя предсказать свойства таких белков совсем нетрудно, их существование остается в настоящее время гипотетическим. На присутствие в клетках неидентифицированных пока белков, связывающихся с концами полимера, указывает наличие в них центров нуклеации.

В отличие от актиновых филаментов, микротрубочки не образуют в клетке геля. Действие тубулин-связывающих белков проявляется главным образом в стабилизации микротрубочек и в образовании поперечных шивок, соединяющих микротрубочки друг с другом, а также с промежуточными филаментами и субклеточными органеллами, такими как секреторные гранулы. Изучение свойств этих белков, за исключением динеина и БАМ-2, находится еще в зачаточном состоянии.

2.3. Белки промежуточных филаментов

Третий из основных классов филаментов, для которых нам определенно известны структурные белки, — это промежуточные филаменты. Они имеют приблизительно 10 нм в диаметре, и обнаружены в большинстве клеток позвоночных. Структурные белки промежуточных филаментов были идентифицированы позже, чем структурные белки филаментов других классов; по этой причине об ассоциированных с ними белках известно срав-

нительно мало. Кроме того, для промежуточных филаментов характерен намного более широкий диапазон межтканевых различий в аминокислотной последовательности, что породило некоторые разногласия при установлении принадлежности различных белков той или иной разновидности этих филаментов.

Промежуточные филаменты всех типов обладают рядом общих свойств. Они спиральны, что при соответствующих способах окраски придает им вид периодических структур. Все они могут быть деполимеризованы и реполимеризованы *in vitro*, и для всех них в отличие от микротрубочек и микрофиламентов условия сборки *in vitro* оказались таковы, что их сборка и разборка в клетке, по всей вероятности, события редкие [23]. И наконец, для всех промежуточных филаментов была предложена одна, общая модель строения. Сначала предполагалось, что эти филаменты состоят из трехцепочечных сверхспирализованных структур, которые перемежаются неспиральными областями, образованными N-концевым, C-концевым или центральным неспиральным доменом белков филаментов [24]. Более поздний анализ, основанный на данных об аминокислотной последовательности нескольких таких белков, показал, что промежуточные филаменты представляют собой двутяжные структуры и что сверхспирализованные домены расположены в них не совсем так, как предполагалось по результатам протеолитического анализа [25]. Существенный вывод, к которому привели исследования обоих типов, состоит в том, что неспирализованные области очень чувствительны к протеолизу. Протеолиз некоторых из этих областей может вызывать разборку филаментов.

Белки промежуточных филаментов можно разделить на пять групп. Из-за небольших межвидовых различий между белками и чувствительности наблюдаемых значений их молекулярной массы к условиям проведения измерений эти семейства имеют по несколько названий. Эпителиальные клетки содержат обычно цитокератины — семейство кератиноподобных белков с мол. массой от 45 до 60 кДа. Нервные клетки содержат белки нейрофиламентов, мол. масса основных полипептидов этих филаментов равна 68, 145 и 220 кДа. В мышечных клет-

ках содержится десмин, или скелетин, с мол. массой приблизительно 53 кДа, в глиальных клетках — так называемый глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) с мол. массой примерно 55 кДа, а в клетках мезенхимального происхождения — виментин, или декамин, с мол. массой 58 кДа. Наблюдаемые значения молекулярной массы этих белков немного варьируют в зависимости от источника филаментов и электрофоретической системы, используемой для их анализа,

Все белки промежуточных филаментов были деполимеризованы и реполимеризованы *in vitro*. Десмин, виментин и ГФКБ образуют гомополимеры, содержащие полипептиды одного только вида. Белки нейрофиламентов состоят из трех разных полипептидов. В определенных условиях белок с мол. массой 68 кДа может полимеризоваться и в отсутствие белков с мол. массой 145 и 220 кДа. Однако получающиеся при этом гомополимеры имеют гладкую боковую поверхность — в отличие от нативных нейрофиламентов, поверхность которых выглядит опушенной [23]. Это означает, что белок с мол. массой 220 и, возможно, белок с мол. массой 145 кДа являются отчасти периферическими компонентами нативных филаментов и образуют на их поверхности боковые «ручки», видимые в электронный микроскоп. Эти структуры представляют особый интерес как возможные участки взаимодействия нейрофиламентов с различными белками и субклеточными частицами.

В семейство цитокератинов входит множество разных полипептидов. Эпителиальные ткани из разных частей тела различаются по спектру содержащихся в них цитокератинов [26]. До сих пор не удалось собрать промежуточные филаменты из какого-либо одного цитокератина, хотя различные комбинации двух или большего числа цитокератинов образуют филаменты *in vitro*. Благодаря такой ограниченной способности цитокератинов к полимеризации оказалось возможным продемонстрировать сополимеризацию цитокератинов с другими белками промежуточных филаментов. Были подобраны условия; в которых белки промежуточных филаментов не могут самостоятельно образовывать филаменты, и осуществлена сборка в гетерогенной смеси этих белков [27].

Как показал анализ аминокислотных последовательностей, белки промежуточных филаментов из разных тканей и из организмов разных видов являются близкородственными, причем межвидовые различия между белками филаментов из одной и той же ткани выражены менее, чем межтканевые различия между этими белками из одного и того же организма. Так, для десмина и виментина из свиньи степень гомологии их аминокислотных последовательностей составляет 64%, а для десминов, выделенных из свиньи и курицы, — 91% [28]. Таким образом, хотя разные белки промежуточных филаментов и имеют разные изоэлектрические точки и разные молекулярные массы, все пять семейств этих белков несомненно связаны общим происхождением. Близость их аминокислотных последовательностей проявляется, в частности, и в сходстве ультраструктуры всех промежуточных филаментов.

Благодаря такой картине сходства и различий между белками промежуточных филаментов оказалось возможным получить как тканеспецифичные антитела (реагирующие, например, с виментином из разных животных), так и антитела, узнающие домены, общие для многих белков промежуточных филаментов. С помощью антител широкой специфичности удалось продемонстрировать присутствие белков промежуточных филаментов в клетках *Drosophila*; как показывает этот результат, белки промежуточных филаментов являются по меньшей мере столь же древними, что и многоклеточные организмы [29].

Вследствие того что белки промежуточных филаментов различаются по химическим свойствам и, кроме того, малорастворимы, лишь немногие из ассоциированных с промежуточными филаментами белков изучены к настоящему времени. Среди них одним из наиболее интересных является активируемая кальцием протеаза, специфичная по отношению к промежуточным филаментам. Показано, что такая протеаза ассоциирована с виментином [30], нейрофиламентами [31] и десмином [32]. Присутствие протеазы на филаментах обеспечивает тесный контакт между ней и ее субстратом. Оптимальная концентрация кальция для активации протеазы,

специфичной к виментину, составляет 10 мкМ. Протеолиз приводит к быстрой разборке филаментов. Особый интерес описанная протеаза представляет по следующей причине: стабильность промежуточных филаментов *in vitro* такова, что кажется маловероятным, чтобы они были способны активно собираться и разбираться в физиологических условиях, так что деградация филаментов, возможно единственно доступный для клетки способ вызвать их разборку.

До сих пор удалось охарактеризовать только несколько белков, ассоциированных с промежуточными филаментами. Плектин — белок с мол. массой 300 кДа — был выделен из промежуточных филаментов клеток глиомы [33]. Он связан в этих клетках с виментином в соотношении приблизительно 1:20. Внутриклеточное распределение плектина отчасти совпадает с распределением промежуточных филаментов; плектин располагается, однако, не по всей длине этих филаментов. *In vitro* плектин может вызывать образование пучков виментиновых филаментов, из чего следует, что либо на каждый полипептид с мол. массой 300 кДа приходится по два участка связывания виментина, либо нативный плектин является димером или тетрамером.

Синемин — это белок с мол. массой 230 кДа, способный связываться и с десминовыми, и с виментиновыми филаментами [34]. Он был выделен из мышечных клеток, а также из эритроцитов птиц. Паранемин (280 кДа) ассоциирован с десминовыми и виментиновыми филаментами в скелетных мышцах птиц. Его содержание в мышцах особенно высоко на ранних стадиях развития и снижается на поздних; таким образом, он функционирует в клетках, по-видимому, лишь в течение непродолжительного времени [35]. И в виментиновых, и в десминовых филаментах паранемин обнаруживается независимо от того, связан ли с ними также синемин.

2.4. Белки, ассоциированные с несколькими системами филаментов

До сих пор мы рассматривали ассоциированные с филаментами белки так, как если бы каждый из них

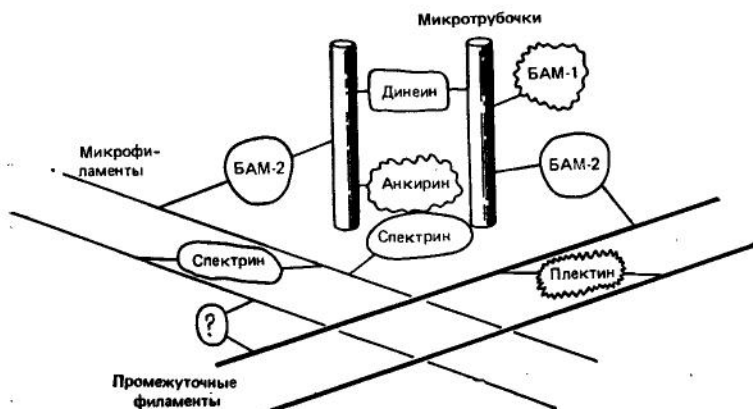


Рис. 2.2

взаимодействовал лишь с филаментами одного типа. Такой подход был использован во многих биохимических исследованиях, он оказался плодотворным при выделении и изучении свойств белков. Однако ни в структурном, ни в функциональном отношении системы филаментов не являются независимыми. Между филаментами разного типа бывают видны соединяющие их поперечные мостики, и одно только это уже указывает на существование таких белков, которые можно было бы в принципе идентифицировать по их способности сшивать филаменты двух разных классов. Как показали результаты последних исследований, некоторые хорошо известные белки полифункциональны. Многообразие возможных взаимосвязей между компонентами цитоскелета частично отражено на рис. 2.2. Так, БАМ-2, один из ассоциированных с микротрубочками белков высокой молекулярной массы, способный связываться с сАМР-зависимой протеинкиназой, взаимодействует также с промежуточными филаментами нервной ткани [36] и актином. Но удивительнее всего, наверное, то, что его взаимодействие с «чужими» филаментами может регулироваться АТФ. В присутствии АТФ под действием БАМ-2 возрастает вязкость смеси микротрубочек с нейрофиламентами, а с актином БАМ-2 может взаимодействовать и в отсутствие АТФ, если только в растворе есть сАМР.

Взаимодействие БАМ-2 с промежуточными филаментами и микрофиламентами нечувствительно к кальцию [22]. Вряд ли покажется удивительным, что у БАМ-2 имеется существенная гомология со спектрином, хотя некоторые домены этих белков без сомнения уникальны.

Еще один бифункциональный белок — анкирин. Он взаимодействует с актин-связывающим белком спектрином. Недавно было продемонстрировано также его взаимодействие с микротрубочками: очищенный анкирин эритроцитов связывался с микротрубочками, выделенными методом сборки — разборки из головного мозга [37]. С помощью антител к анкирину показано, что он в какой-то мере гомологичен БАМ-1. Молекулярная масса БАМ-1 является величиной того же порядка, что и молекулярная масса плектина (белка, связывающего промежуточные филаменты в пучки), так что возможность гомологии между БАМ-1 и плектином в настоящее время также не может быть исключена. Единственная пара фибриллярных систем, для которых пока не доказано существование связывающих их между собой бифункциональных белков, — это микрофиламенты и промежуточные филаменты. В присутствии сАМР БАМ-2 не может служить такой связкой, поскольку он взаимодействует либо с микрофиламентами (в растворе без АТР), либо с промежуточными филаментами (в растворе с АТР). Возможно, что эти две системы филаментов соединяются друг с другом только через микротрубочки или только при низких концентрациях сАМР. Конечно, слишком оптимистично надеяться на то, что мы уже исчерпали все разнообразие цитоскелетных белков в клетке: вероятно еще будут обнаружены новые белки, способные взаимодействовать с двумя или большим числом систем филаментов.

Другой тип бифункциональности обнаруживают белки, соединяющие фибриллярные системы с различными компонентами клеточной мембраны. Тубулин может быть ассоциирован с окаймленными пузырьками (покрытыми клатрином) [38], из чего, по-видимому, следует, что по крайней мере некоторые из таких пузырьков движутся в клетке по микротрубочкам. Кроме того, есть по меньшей мере две группы белков, обеспечивающих воз-

возможность взаимодействия между системой микрофиламентов и клеточной мембраной. Микрофиламенты могут присоединяться к мембране через спектрин, который связывается с анкирином, способным в свою очередь прикрепляться к мембранным белкам. Кроме того, микрофиламенты взаимодействуют с мембраной через винкулин, который связывается с метавинкулином — интегральным белком мембраны. Ввиду разнообразия мембранных белков и их способности к перегруппировке в мембране представляется вероятным существование и других белков-связок, соединяющих филаменты и мембрану.

2.5. Возможные белки микротрабекул

В отличие от микротрубочек, микрофиламентов и промежуточных филаментов для четвертого класса цитоматриксных структур пока не может быть указан какой-либо определенный образующий их белок. Эти структуры получили название микротрабекул. Они представляют собой гетерогенные, варьирующие как по длине, так и по диаметру отростки и связки, прикрепленные обычно к уплотнениям на различных компонентах клетки [22]. Из сказанного выше ясно, что многие из сшивающих филаменты белков могут, судя по их молекулярной массе и диаметру, претендовать на роль таких микротрабекул. Позднее, при обсуждении внутриклеточного движения частиц, мы приведем и другие доводы в пользу отождествления микротрабекул со сшивающими белками. Маловероятно, чтобы нам были известны уже все такие белки. Кроме того, может существовать класс белков, «сшивающих шивки», т. е. связывающихся не с самими филаментами, а с белковыми молекулами, прикрепленными к ним, — белки этого класса также были бы кандидатами на роль микротрабекул.

Замечательный новый кандидат на эту роль — белок спазмин, изменяющий свою конформацию под действием кальция. Первоначально спазмин был найден у простейших, где он служит механохимической основой сокращения. Когда кальций «перекачивается» из матрикса в специальные резервуары, спазмин релаксирует и клетка

удлиняется [39]. Впоследствии спазмин был выявлен с помощью иммунологических методов в жгутиковых клетках, а также вблизи центриолей в клетках млекопитающих. Если окажется, что спазмин или родственные ему белки действительно широко распространены как механохимические белки, функционирующие в отсутствие других систем филаментов, то это послужит убедительным аргументом в пользу того, что спазмин образует микротрабекулы.

2.6. Ковалентные модификации цитоскелетных белков

Многие цитоскелетные белки подвергаются после трансляции ковалентным модификациям. Одна из наиболее распространенных модификаций — фосфорилирование. В число белков, подвергающихся в той или иной степени фосфорилированию, входят фибронектин, филамин, тяжелые и легкие цепи миозина, винкулин, β -тубулин, виментин, α -актинин, десмин, α - и β -тропомиозин и спектрин [40, 41]. Большинство перечисленных белков фосфорилируется по серину и, в меньшей степени, по треонину. По тирозину из цитоскелетных белков фосфорилируются только винкулин, филамин и виментин; эти три белка, впрочем, присутствуют в значительных количествах лишь в трансформированных клетках, где они содержат от 2 до 20% фосфатных остатков [41]. В некоторых случаях роль фосфатных групп уже известна. Легкие цепи мышечного миозина в результате фосфорилирования активируются [42]. У двух видов простейших фосфорилирование вызывает диссоциацию тяжелых цепей миозина [43]. Многие из ассоциированных с микротрубочками белков после фосфорилирования начинают лучше связываться с микротрубочками [19]. Однако для большинства цитоскелетных белков ни функциональное значение фосфорилирования, ни его влияние на взаимодействие их друг с другом не известны.

Помимо фосфорилирования в белках обнаружены и другие ковалентные модификации. Так, тубулин после трансляции тирозилируется; кроме того, он может гликозилироваться. Актин подвергается двум ковалентным модификациям и содержит в итоге N-метилгистидин и

N-концевую ацетильную группу. Метилгистидин есть также и в молекуле миозина. В кальмодулине, миозине, а также в актине из *Acanthamoeba* имеется триметиллизин. Винкулин содержит в том или ином количестве ацильные группы; это могут быть боковые цепи с 16 атомами углерода. О функциональной роли этих модификаций почти ничего не известно. Весьма вероятно, что ковалентным модификациям подвергаются и многие другие цитоскелетные белки. Систематическое изучение модификаций, возможно, выявит такие закономерности, которые помогут понять функциональное значение этого явления.

Опираясь на достигнутое к настоящему времени понимание химических свойств белков цитоскелета, мы можем указать те направления, в которых особенно нужны дальнейшие исследования. Очевидно, что необходимо аккуратное определение стехиометрии цитоскелетных белков *in vivo*, поскольку некоторые из них, как известно, способны вызывать значительные эффекты даже в стехиометрии 1:500 [8]. Во-вторых, нужно измерить для этих белков константы связывания, чтобы можно было предсказывать, в каком соотношении они будут связываться при конкуренции за один и тот же связывающий участок. В-третьих, характеристики белков важно определить в физиологических условиях (при соответствующих рН, рСа, концентрациях нуклеозидтрифосфатов, ионной силе и т. д.). Например, F-актин, образовавшийся в растворе с высоким содержанием магния, ведет себя (и сам по себе, и в комплексе с другими белками) не так, как F-актин, образовавшийся в присутствии калия [5, 44]. Это может иметь физиологическое значение, поскольку, например, у амебы концентрация магния выше, а концентрация калия ниже, чем в большинстве клеток позвоночных. Возможно, что указанные две формы F-актина свойственны разным типам клеток. Далее, постоянное внимание необходимо уделять протеолизу. В некоторых случаях протеолиз является артефактом и может приводить к образованию таких белковых фрагментов, которые сохраняют связывающие свойства нативных белков и потому могут влиять на их поведение в исследуемой системе [6]. В других случаях, как, на-

пример, в случае протеазы, ассоциированной с промежуточными филаментами, протеолиз может быть действительно присущим живой клетке механизмом регуляции состояния цитоскелета. Полный перечень цитоскелетных белков, вероятно, можно будет составить, лишь уделяя постоянное внимание всем потенциально возможным связывающим участкам на филаментах, в том числе на их разных концах и боковой поверхности, и потенциальным сшивкам между системами филаментов. И последнее: взаимодействия между филаментами могут быть либо конститутивными, либо регулируемые, и лишь критическое внимание к физиологическим ограничениям для взаимодействий разного типа позволит оценить значение этих взаимодействий.

3. Архитектура цитоскелета

Общие для всех типов клеток принципы строения цитоскелета находят свое конкретное воплощение в формах, видо- и тканеспецифичных. Хотя структурные белки цитоскелета в большинстве своем высококонсервативны, специфические модификации набора вспомогательных белков делают возможной тонкую подгонку организации цитоскелета в соответствии с функциями различных типов клеток. Каждый тип клеток отличается своим, особым спектром цитоскелетных белков, присутствующих в определенном соотношении и специфическим образом расположенных.

Цитоскелетом определяются форма клетки, ее способность прикрепляться к другим клеткам и к субстрату, свобода ее передвижения, а также транспорт различных субстанций в клетку и из нее. При таком многообразии функций исследование структурных основ каждой из них в отдельности могло бы стать крайне трудной задачей, но к счастью, правильный выбор типа клеток для исследования позволяет отделить одни функции от других.

В дополнение к вариациям в строении цитоскелета у клеток разного типа, оно может изменяться и в одной и той же клетке. Некоторые из таких изменений являются реакцией на те или иные внешние стимулы и могут быть автономными или зависеть от синтеза белка или РНК, тогда как другие связаны с жизненным циклом клетки. Есть, кроме того, и такие изменения цитоскелета, которые становятся заметны лишь на протяжении развития многих поколений клеток.

3.1. Эритроциты

Из всех известных типов цитоскелета наиболее простым обладают эритроциты млекопитающих. Их цитоскелет представляет собой примембранную сеть из актина и спектрина, о которой было однажды сказано, что это «конструкция, похожая на сеть, сплетенную близоруким рыбаком» [45]. Было бы, наверное, ошибкой считать актин единственным структурным белком цитоскелета

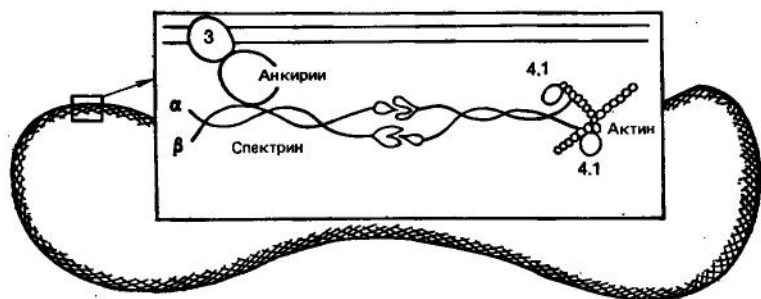


Рис. 3.1

эритроцитов: примерно на каждые пять молекул актина в нем приходится молекула спектрина. Актин в эритроцитах находится преимущественно в фибриллярной форме (в виде F-актина), судя по тому что с ним связан ADP, а не ATP. Концентрация мономерного актина в эритроцитах не меняется под действием цитохалазинов. У олигомеров, состоящих из 10—17 молекул актина, имеются участки, сходные по своему поведению с быстро растущим концом филаментов, а участков медленной сборки не обнаружено [46].

Образование сложной сети под мембраной эритроцитов оказывается возможным благодаря множественности связывающих участков на молекуле спектрина [47]. Присоединяясь к боковой поверхности актиновых протофиламентов, тетрамеры спектрина, построенные по принципу «голова к хвосту», могут сшивать олигомеры актина. На молекуле спектрина (на ее β -субъединице) есть, кроме того, участок связывания анкирина. Связываясь со спектрином и с одним из интегральных мембранных белков, так называемым компонентом 3, анкирин образует мостики между спектрино-актиновой сетью и мембраной. Комплекс актина со спектрином стабилизируется белком, известным как компонент 4.1; этот белок присоединяется к молекуле спектрина неподалеку от того ее конца, который взаимодействует с боковой поверхностью актиновых филаментов. Описанные взаимосвязи между молекулами показаны на рис. 3.1.

О роли взаимодействия цитоскелетных белков с мембранами можно судить по результатам следующих

экспериментов. Во-первых, частичное удаление спектрина из теней эритроцитов вызывает увеличение латеральной подвижности интегральных белков в мембране; это означает, что связь с цитоскелетной сетью налагает на поведение мембранных белков существенные ограничения. Во-вторых, антицитоскелетные препараты, такие, как цитохалазины, в определенной мере влияют на деформируемость эритроцитов [48]. Наконец, любое из известных воздействий, вызывающих отделение цитоскелета, и особенно спектрина, от мембраны эритроцитов, приводит одновременно к тому, что распределение липидов в мембране становится более равномерным; таким образом, цитоскелет участвует в поддержании асимметрии расположения липидов в мембранном бислое. Недостаток спектрина, возможно, является причиной такой болезни, как наследственный сфероцитоз.

Как ни просто устроены эритроциты млекопитающих, даже на их примере ясно видна необходимость учитывать многообразие возможных взаимосвязей между цитоскелетными белками. Спектрин может функционировать так, как описано выше, только потому, что на каждом его мономере имеются участки связывания по меньшей мере для четырех белков. На сеть, состоящую из актина и спектрина, существенное влияние оказывает присутствие компонента 4.1. Наконец, степень доступности компонента 3 может изменяться в результате его связывания с различными гликолитическими ферментами [49]. Таким образом, для большинства белков цитоскелета нужно постоянно иметь в виду возможность взаимодействия не с одним, а с несколькими другими белками.

Эритроциты млекопитающих поддерживают свою форму с помощью цитоскелета, построенного на основе актина. Эти эритроциты обходятся без двух других систем филаментов, которые имеются в эритроцитах птиц и иных животных [50, 51]. По периферии всех эритроцитов, за исключением эритроцитов млекопитающих, проходит пучок микротрубочек — так называемый краевой пучок. Под электронным микроскопом видно, что микротрубочки в этом пучке соединены друг с другом поперечными шивками и что он окружает пару цент-

риолей. Холод вызывает разрушение микротрубочек краевого пучка, а когда температуру опять повышают, микротрубочки начинают восстанавливаться. Растут они при этом от центриолей (точнее, от перичентриолярного материала, окружающего центриолярные триплеты), никаких других центров сборки микротрубочек в эритроцитах не найдено. Удлинение микротрубочек продолжается до тех пор, пока они вновь не заполнят периферию эритроцита по всей его окружности.

Промежуточные филаменты в эритроцитах не-млекопитающих состоят из виментина — белка с мол. массой 52 кДа, обнаруженного во многих клетках мезенхимального происхождения. Филаменты покрыты белком с мол. массой 230 кДа, синеминном, расположенным вдоль них периодически. Сеть промежуточных филаментов не перекрывается с краевым пучком микротрубочек. Она ассоциирована, однако, с мембраной и в центральной части эритроцита простирается от одной его поверхности до другой, образуя вокруг ядра нечто вроде садка. Синемин, по-видимому, сшивает виментиновые филаменты друг с другом [52].

Эритроциты не-млекопитающих, как и эритроциты млекопитающих, содержат подмембранную сеть из актина и спектрин, причем последний, подобно спектрину млекопитающих, способен фосфорилироваться и связывать кальмодулин. Функциональное значение этих реакций — связывания спектрин с кальмодулином и фосфорилирования спектрин — не известно ни для той, ни для другой группы эритроцитов. Можно, однако, предположить, что у эритроцитов млекопитающих это рудиментарные реакции, являющиеся отголоском более сложных взаимоотношений между компонентами цитоскелета, свойственных содержащим ядро эритроцитам. Остается неясным и то, какие именно структурные особенности позволяют эритроцитам млекопитающих обходиться без двух фибриллярных систем, имеющих у всех других эритроцитов.

Хотя единственная функция цитоскелета в эритроцитах, по-видимому, заключается в поддержании их формы, он тем не менее подвергается изменениям в процессе созревания этих клеток [53]. Например, синтез та-

ких цитоскелетных белков, как компоненты 4.1 и 4.2, начинается лишь на самых последних стадиях созревания ретикулоцитов. Кроме того, в процессе эмбрионального развития меняется распределение синемина вдоль виментиновых филаментов. От стадии развития эмбриона зависит и взаимодействие α - и β -субъединиц спектрина, лимитирующим фактором для сборки спектрина является, по-видимому, наличие связывающих участков на мембране.

3.2. Тромбоциты

Тромбоциты — это безъядерные клеточные фрагменты, циркулирующие в кровяном русле и принимающие участие в образовании тромбов. Обеспечивая, как и у эритроцитов, постоянство клеточной формы, цитоскелет в тромбоцитах кроме того принимает участие в процессах изменения их формы и их прикрепления к различным поверхностям. Разнообразие форм, которые может принимать тромбоцит, невелико. Покоящийся тромбоцит — это дисковидный, симметричный клеточный фрагмент. Активация тромбоцита вызывает образование у него многочисленных филоподий; затем, если имеется подходящая поверхность, активированный тромбоцит расплывается на ней. Переход от стадии покоя к филоподиальной стадии до некоторой степени обратим, если же началось расплывание, предотвратить его завершение очень трудно [54].

В описанном двухстадийном процессе изменения формы тромбоцитов принимают участие две цитоскелетные системы [55]. У дисковидных тромбоцитов имеется краевой пучок микротрубочек, «прошитый» ассоциированными с микротрубочками белками. Кроме того, они содержат актин и многочисленные актин-связывающие белки, распределение которых при формировании филоподий и расплывании согласованным образом меняется. Все три состояния тромбоцитов показаны на рис. 3.2.

Детальное изучение перестроек цитоскелета тромбоцитов проведено методом иммунофлуоресценции [56]. Поведение тубулина в тромбоцитах сравнительно просто: на стадии покоя микротрубочки обнаруживаются



Рис. 3.2

лишь в составе краевого пучка, после активации упорядоченность их расположения нарушается и они перераспределяются, причем, по-видимому, пассивно, под действием системы микрофиламентов. Напротив, перераспределение актина и ассоциированных с ним белков носит весьма сложный характер. В покоящихся тромбоцитах актин, миозин, филамин и α -актинин обнаруживаются в гранулярном материале, представляющем собой большие и, вероятно, рыхлые агрегаты, тогда как тропомиозин распределен практически равномерно. Во время образования филоподий актин концентрируется в них по всей их длине, освобождая в какой-то мере центральный район тромбоцита. Тропомиозин и филамин также располагаются по всей длине филоподий, однако тропомиозин при этом уходит из центрального района, а филамин еще обнаруживается в нем (в виде рыхлой фибриллярной сети). В отличие от этих трех белков миозин и α -актинин занимают лишь проксимальную половину филоподий и по-прежнему присутствуют в центральной части тромбоцита — в виде гранулярного или рыхлого фибриллярного материала. Распластывание тромбоцита приводит к дальнейшему перераспределению рассматриваемых белков. Актин располагается теперь по краю тромбоцита; иногда видны также идущие к центру пучки актиновых филаментов, но в самом центральном районе актина сравнительно мало. Миозин обнаруживается преимущественно в центральной части тромбоцита; то же можно сказать и о тропомиозине, хотя распределение этих двух белков не вполне одинаково. В центральном районе локализуется и фибриллярно организован-

ный филамин. Напротив α -актинин из этого района в значительной мере вытесняется и концентрируется на периферии. Сказанное суммировано в табл. 3.1. Как распределены другие актин-связывающие белки, такие, как профилин и белок с мол. массой 90 кДа, неизвестно.

Таблица 3.1. Цитоскелет тромбоцита

Район	Дисковидный		Филоподиальный			Распластаный		
	1	2	1	2	3	1	2	3
Тубулин	++	-	-	-	+	±	-	спу- танный
Актин	гранулярный		++	++	±	+	++	±
Миозин	"		-	+	грану- лярный	±		+
α -Актинин	"		-	+	±	++		±
Филамин	"		+	+	±	±		+
Тропомозин	диффузный		++	++	-	±		+

С учетом описанной выше картины сложных и согласованных перестроек цитоскелета рассмотрим результаты биохимического изучения белков тромбоцитов. Кальций стимулирует фосфорилирование легкой цепи миозина [42] и связывание профилина с актином [5]. Кроме того, он подавляет образование α -актининовых сшивок между филаментами [5]. В то же время связывание филамина и тропомиозина с F-актином нечувствительно к кальцию [5]. На первый взгляд такой характер кальциевой чувствительности перечисленных реакций противоречит тому, что подсказывает интуиция, поскольку активация тромбоцитов сопровождается притоком в них кальция и возрастанием их рН. Некоторые из описанных перестроек цитоскелета можно было бы, однако, объяснить с помощью следующей схемы событий. В покоящихся тромбоцитах актин находится в комплексе с чувствительным к кальцию актин-связывающим белком. Когда концентрация кальция и рН внутри тромбоцита возрастают, профилин вызывает диссоциацию комплекса, и высвободившийся актин начинает полимеризоваться, причем стадия нуклеации осуществляется неким белком, либо нечувствительным к кальцию, либо активным только в присутствии кальция.

Согласно рассматриваемой схеме, этот нуклеирующий белок должен присутствовать в меньшем количестве, чем упомянутый ранее белок, связывающий актин. Как только в каких-нибудь растущих филаментах станет больше шести мономеров, к ним сможет присоединиться тропомиозин, и филамин начнет сшивать эти филаменты между собой. А после фосфорилирования легкой цепи миозина с актиновыми филаментами станет способен взаимодействовать и этот белок.

Некоторые из событий, постулируемых рассмотренной схемой, могут, как это уже установлено, иметь место в действительности. Так, наблюдаются приток кальция и изменение рН [54]. Профилин связывается с актином в присутствии кальция более прочно и может полимеризоваться на быстро растущем конце актиновых филаментов [5]. Немышечный тропомиозин связывается с шестью актиновыми мономерами в филаменте, а филамин, по-видимому, не взаимодействует с G-актином. Обнаружено также, что в покоящихся тромбоцитах актин находится в агрегатах диаметром 10—20 и длиной 20—40 нм — слишком больших для того, чтобы быть комплексами актина с профилином. Под действием кальция из таких агрегатов освобождается α -актинин.

Для дальнейшего обоснования схемы нужно было бы определить коэффициенты сродства между различными белками и комплексами при физиологических концентрациях кальция и значениях рН, не забывая при этом, что F-актин, образовавшийся в присутствии ионов кальция, отличается по своим биохимическим характеристикам от F-актина, полученного с помощью магния. Надо, впрочем, заметить, что даже обсуждаемая схема не может объяснить, почему никакие два белка не распределены одинаковым образом в активированных тромбоцитах. Вероятно, уже назрела необходимость в исследовании таких все еще не изученных факторов, как взаимодействие с фосфолипидным бислоем.

И последнее. Тромбоциты являют нам пример двухкомпонентного цитоскелета, в котором две системы филаментов никак не взаимодействуют друг с другом, если не считать вызываемой актиновой сетью деформации кольца микротрубочек; с другой стороны, они представ-

ляют собой отличную модель для изучения того, как множество ассоциированных с актином белков вовлекается в построение динамичной, высокоспециализированной системы микрофиламентов.

3.3. Фибробласты

Фибробласты формируют внеклеточный матрикс. Они делают ткань более плотной и принимают участие в заживлении ран. Фибробластоподобные клетки активно перемещаются в развивающемся эмбрионе и дают начало ряду мезенхимальных тканей. Таким образом, кроме обеспечения постоянства клеточной формы или ее однократного стереотипного изменения, кроме участия в распластывании клетки на субстрате, цитоскелет фибробластов должен выполнять еще и функции, связанные с активным движением, поляризацией клетки и генерированием натяжения. Отметим также, что поскольку фибробласты — эукариотические клетки, они способны к направленному перемещению веществ внутри клетки. Такое расширение списка функций отражается в усложнении организации цитоскелета.

Структура цитоскелета фибробласта существенным образом зависит от того, в какой фазе цикла и на каком субстрате он находится. Так, перестройка цитоскелета, наблюдающаяся при пересеве культивируемых клеток, сравнима с той, которая происходит по окончании митоза, в эмбриогенезе или при заживлении ран. Однако культивируемые клетки — значительно более удобный объект для наблюдения и экспериментов.

Округленный фибробласт отвечает на контакт с приемлемым субстратом формированием многочисленных филоподий. Эти тонкие, длинные отростки как будто ощупывают пространство вокруг фибробласта. Там, где они коснутся субстрата, может начаться процесс прикрепления к нему. Если образуется контакт с незакрепленной частицей, филоподия нередко прилепляется к ней и втягивается вместе с ней обратно. Как только число контактов клетки с субстратом становится достаточно велико, ее край как бы покрывается рябью; этот процесс и процесс образования филоподий могут сменять друг

друга. Актин на этой стадии обнаруживается в больших количествах в складках клеточного края и в толстых волокнах, пересекающих околядерное пространство [57]. По мере того как клетка продолжает распластываться, эти волокна перераспределяются и образуют во внутренних областях клетки сеть с ячейками в форме многоугольников. В течение последующих часов полигональная актиновая сеть перестраивается в так называемые волокна натяжения, и клетка приобретает характерный для интерфазного фибробласта вид.

Перераспределение тропомиозина происходит несколько иначе. На ранних стадиях, когда большое количество актина содержится в складках клеточного края и трансъядерных волокнах, практически весь тропомиозин диффузно распределен вокруг ядра. По окончании формирования полигональной сети тропомиозин обнаруживается уже в ней, отсутствуя, правда, в вершинах многоугольников. После перестройки сети тропомиозин располагается вдоль волокон натяжения с периодом приблизительно 1,5 мкм.

Еще один тип перераспределения демонстрирует α -актинин. На самых ранних стадиях этот белок, как и тропомиозин, распределен диффузно в центре фибробласта. Однако примерно через восемь часов он образует небольшие скопления, совпадающие с вершинами актиновых многоугольников. В местах расположения этих скоплений находятся так называемые фокальные контакты, т. е. те участки, где клетка приближается к субстрату на расстояние менее 15 нм. После завершения перестройки фибробласта α -актинин оказывается связанным с волокнами натяжения, располагаясь вдоль них с тем же периодом, что и тропомиозин (т. е. около 1,5 мкм), но в противофазе с ним, и, кроме того, концентрируется в складках мембраны на краю клетки.

В фибробластах встречаются и некоторые другие белки, ассоциированные с актином [50]. Миозин находят преимущественно в волокнах натяжения, более или менее в тех же местах, что и тропомиозин; он отсутствует в микроотростках клетки, складках клеточного края и фокальных контактах. Один из немногих белков, распределенных подобно актину, — филамин. Единствен-

ное место, где есть актин, но нет филамина — это самые кончики микроотростков. В свою очередь, филамин имеется в пространстве между волокнами натяжения, весьма вероятно поэтому, что он может быть ассоциирован в клетке не только с актином, но также и с другими белками.

Два актин-связывающих белка — фимбрин и винкулин — распределены в полностью распластанном фибробласте наиболее удивительно. Фимбрин (мол. масса 68 кДа) был первоначально выделен из микроворсинок. Небольшое количество этого белка есть в волокнах натяжения, но в основном он обнаруживается на периферии клетки: его много в складках клеточного края, микроотростках, микроворсинках и филоподиях [59]. В отличие от фимбрина, винкулин ассоциирован преимущественно с фокальными контактами; помимо того, немного винкулина диффузно распределено в центральной части клетки. Винкулин остается связанным с обращенной к цитоплазме поверхностью клеточной мембраны в точках фокальных контактов даже после того, как актин был тем или иным способом из фокальных контактов удален [60]. По этой причине винкулин считают одним из белков, расположенных в фокальных контактах наиболее близко к плазматической мембране.

Актин в фибробластах служит компонентом цитоскелетных структур, и каждая из них характеризуется своим спектром ассоциированных с актином белков. При всяком серьезном исследовании цитоскелета фибробластов возникает один и тот же настоящий вопрос: почему разные ассоциированные с актином белки локализуются в разных частях клетки? Для некоторых из этих белков ограничения в распределении, вероятно, могут быть обусловлены наличием у них дополнительной связывающей активности: для винкулина, например, это способность связываться с мембраной. Будет ли такое объяснение адекватным и во всех других случаях или придется дополнительно учитывать иные динамические взаимодействия, станет ясно лишь в ходе дальнейших исследований.

Вторая из основных фибриллярных систем фибробласта — это система микротрубочек. Микротрубочки

сходятся, как в фокусе, в районе центриолей, в центральной части клетки. Сразу после пересева клеток никакой сложной сети микротрубочек в них не видно. Однако со временем микротрубочки удлиняются, становятся изогнутыми и в конце концов достигают периферии клетки [61]. Микротрубочки имеются также в клетке во время митоза; кроме того, их находят в первичной ресничке, рудиментарной жгутикоподобной органелле. В интерфазе микротрубочки принимают участие в процессе поляризации клетки, от них зависит способность клетки формировать складки и филоподии лишь с одного края и осуществлять направленное движение. Микротрубочки нужны также для транспортировки материала для внеклеточного матрикса от аппарата Гольджи наружу.

Третью основную фибриллярную систему в фибробластах образуют промежуточные филаменты виментинового типа. Они заполняют, переплетаясь, центральный район клетки и тянутся по направлению к ее периферии. Распространение виментиновых филаментов по клетке после митоза происходит лишь вслед за восстановлением микротрубочек. Виментиновые волокна окружают ядро; кроме того, они вступают в тесный контакт с волокнами натяжения [62]. Хотя промежуточные филаменты фибробластов состоят в целом из виментина, по меньшей мере в одном случае — у фибробластов сердца — в филаментах достоверно обнаружено также небольшое количество десмина, белка, который находят обычно в мышечных клетках. По-видимому, десмин в сердечных фибробластах сополимеризуется с виментином при образовании промежуточных филаментов [63].

Для изучения локализации цитоскелетных белков применяются главным образом иммуноцитохимические методы. Надежность результатов, получаемых с помощью этих методов, зависит как от специфичности используемых антител, так и от доступности для антител изучаемого компонента цитоскелета. То, что на иммунофлуоресцентные методы исследования можно в целом полагаться, достаточно убедительно доказывается опытами, в которых путем микроинъекции вводили в клетки флуоресцентно меченные белки. Такие опыты были поставлены с α -актинином, винкулином, тубулином, белками, ас-

соцированными с микротрубочками, и актином. Однако ни в одном из опытов не было выявлено никаких новых структур, отличных от тех, в которых используемый для микроинъекции белок уже был обнаружен прежде методом иммунофлуоресценции. Это подтверждает специфичность иммунофлуоресценции, хотя, впрочем, и не исключает возможности существования таких структур, которые настолько плотны или стабильны, что в них не могут проникнуть ни антитела, ни экзогенные структурные белки.

Цитоскелет фибробластов можно исследовать с высоким разрешением с помощью электронного микроскопа. Некоторые из иммуоцитохимических методов были модифицированы для применения их в электронной микроскопии, что сделало возможным электронно-микроскопическое выявление отдельных белков. Дополнительные детали структуры удается выявить путем использования экстрагированных препаратов цитоскелета или надлежащим образом фиксированных целых клеток. Когда фибробласты экстрагируют раствором с невысоким осмотическим давлением, многие фибриллярные структуры сохраняются и могут быть идентифицированы иммуноферритиновым методом [64]. Видны актиновые филаменты, ассоциированные друг с другом, а также с микротрубочками и промежуточными филаментами. В дополнение к этим трем основным типам фибриллярных структур в таких цитоскелетных препаратах выявляются многочисленные гетерогенные нити, сшивающие филаменты трех основных систем между собой. В более мягких условиях, при экстракции клеток в присутствии защищающей их сахарозы, можно выявить еще более сложную сеть ([65], рис. 3.3). В такой сети нити расположены столь густо и имеют порой столь маленький диаметр, что различить их на обычных тонких срезах клетки не удастся. Наконец, совсем уже сложная картина, включающая тончайшие, изменчивые микротрабекулы, связанные как с филаментами основных типов, так и с внутриклеточными органеллами, наблюдается тогда, когда толстые срезы интактных клеток или прямо целые клетки, выращенные на подложках для электронной микроскопии, исследуются с помощью высоковольт-



Рис 3.3. Микрофотография цитоскелетной сети фибробласта (просвечивающая электронная микроскопия).

ных электронов. Увеличение сложности фибриллярных структур в результате мер по защите цитоскелета во время приготовления препаратов отражает, возможно, различия в продолжительности нахождения разных белков в составе цитоскелета. В самом деле, те белки, которые включаются в цитоскелет на короткое время (но достаточно часто), будут обнаруживаться в препарате лишь с помощью методов, обеспечивающих стабилизацию их связи с цитоскелетом, тогда как в случае значительной экстракции будут выявляться преимущественно те белки, для которых обмен с растворимой фазой клетки происходит редко.

3.4. Мышцы

Мышцы построены из мезенхимальных клеток, специализирующихся на сокращении. Структурная организация этих клеток определяется типом и силой сокращения, которое они должны осуществлять. Клетки глад-

ких мышц специализированы лишь немногим более, чем фибробласты, а скелетные поперечнополосатые мышцы состоят из клеток, организованных в высшей степени регулярно. Весь этот диапазон различий является очень древним: и гладкие, и поперечнополосатые мышцы имеются у всех животных вплоть до *Coelenterata*.

Гладкомышечные клетки, в наибольшей степени сходные по своему строению с фибробластами, представляют собой длинные тонкие веретенообразные клетки с одним, центрально расположенным ядром. Непосредственно у их клеточной мембраны расположены многочисленные плотные тельца, с помощью которых гладкомышечная клетка прикрепляется к другим гладкомышечным клеткам и внеклеточному матриксу. Эти плотные тельца богаты винкулином и служат местом прикрепления многих микрофиламентов и некоторых промежуточных филаментов. Пучки микрофиламентов располагаются в клетке крест-накрест; когда клетка находится в состоянии расслабления, они обладают двойным лучепреломлением, а при сокращении они образуют уже не столь правильно организованную сеть и двойное лучепреломление исчезает (рис. 3.4). Гладкомышечная клетка не обладает ярко выраженной системой толстых, миозиновых нитей; сборка толстых нитей в ней регулируется, вероятно, с помощью фосфорилирования легких цепей миозина, осуществляемого специальной киназой [42]. В гладкомышечных клетках взрослых особей имеются микротрубочки. Еще более выражена система микротрубочек в культивируемых гладкомышечных клетках: она сходна по своей организации с системой микротрубочек в фибробластах и состоит из длинных извитых нитей, радиально расходящихся из центральной части клетки [66]. Различия в строении фибробластов и гладкомышечных клеток обусловлены биохимической дифференцировкой клеток. Так, гладкомышечные клетки отличаются от фибробластов набором имеющихся у них изоформ актина. Существуют также специфичные для гладкомышечных клеток изоформы тяжелых и легких цепей миозина [67]. Весьма интересным примером биохимической гетерогенности самих гладкомышечных кле-

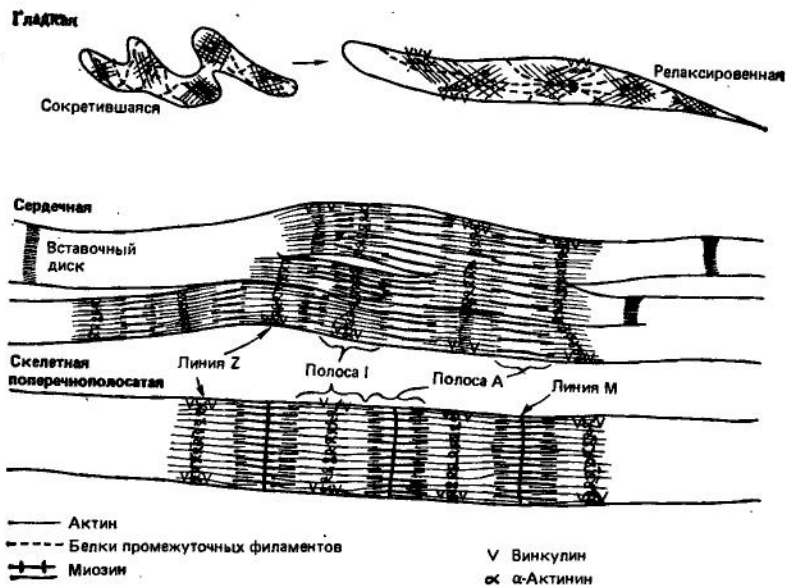


Рис. 3.4

ток являются различия в белках их промежуточных филаментов: гладкомышечные клетки могут содержать филаменты десминового типа (аналогично поперечнополосатым мышцам), или виментинового типа, или одновременно обоих типов. Такая двойственная экспрессия белков наблюдается как в первичной культуре клеток, так и *in situ*, во взрослой особи. Степень гетерогенности экспрессируемых белков промежуточных филаментов у разных гладкомышечных клеток взрослой особи неодинакова; возможно, что тип экспрессируемого белка определяется отчасти тем, в какой мере данная клетка вовлечена в процесс сокращения [68].

Значительно больше известно о цитоскелетной организации поперечнополосатых мышц: сердечной и скелетных. Эти мышцы сходны с гладкими в том, что большая часть их внутриклеточного пространства занята микрофиламентами и соответствующими вспомогательными структурами и что значительную долю их суммарного

клеточного белка составляют сократительные белки. И сердечная, и скелетные мышцы отличаются, однако, от гладких мышц более высоким уровнем организации. Тонкие нити располагаются в них координированно, «в фазе» друг с другом, области расположения тонких нитей перемежаются областями, занятыми толстыми, миозиновыми нитями. Тонкие нити оканчиваются на электроноплотных структурах, называемых Z-линиями (Z-дисками), а центры толстых нитей образуют линии М. Участок мышцы между двумя соседними Z-линиями носит название саркомера.

Клетки сердечной мышцы, как и гладкомышечные клетки, имеют одно ядро. Их микрофиламенты располагаются, однако, более упорядоченно, чем в гладких мышцах, хотя и не с такой высокой степенью регулярности, какая свойственна скелетным мышцам [69] (рис. 3.4). Упорядоченность проявляется уже на внутренней поверхности клеточной мембраны. Кортикальная сеть сердечномышечной клетки содержит β -спектрин и винкулин, располагающиеся рядами — по наружной кромке Z-линии [70, 71]. Ряды расположенных таким образом белков называются костамерами и образуют как бы ребра жесткости вокруг миофибриллы. Расстояние между костамерами изменяется вместе с длиной саркомеров во время сокращения. Еще одна высокоорганизованная структура на поверхности сердечных клеток — это вставочный диск, локализующийся в месте соединения клетки со следующей. При переходе от одной клетки к другой не происходит нарушения периодичности расположения саркомеров в миофибрилле: Z-линия заменяется двумя клеточными мембранами. Вставочный диск содержит α -актинин, актин и винкулин, вокруг которых концентрируется десмин [72].

Миофибриллы, образующие сердечную мышцу, ветвятся; каждая мышечная клетка контактирует через вставочные диски с несколькими клетками. Миофибрилла представляет собой ряд последовательно расположенных саркомеров. В Z-линиях центральные области содержат α -актинин и актин, эти области окружены десминовыми филаментами. Отходящие от Z-дисков тонкие нити состоят из сердечномышечного α -актина и покрыты сер-

дечномышечными формами тропонина и тропомиозина. Длина тонких нитей неодинакова, разница может достигать 0,6 мкм [69]. Тонкие нити перекрываются с толстыми, миозиновыми нитями, центры которых располагаются на линии М. Таким образом, большая часть внутреннего пространства сердечной клетки заполнена сетью актиновых и миозиновых филаментов; пространственная организация этой сети обеспечивает равномерное распределение натяжения между соседними клетками. Десминовые филаменты, присутствующие в сердечной мышце в заметном количестве, играют в ней такую же роль, как и в гладкомышечных клетках (тех, которые содержат много десмина): они, по-видимому, удерживают каким-то образом мышечные клетки друг возле друга, противодействуя натяжению, создаваемому самими этими клетками.

Из трех типов мышц скелетные поперечнополосатые мышцы обладают наивысшей степенью пространственной организации (рис. 3.4). Эта организация проявляется уже на клеточной поверхности: как и у клеток сердца, на внутренней поверхности мембраны скелетномышечных клеток имеются костамеры. Костамеры скелетных мышц содержат γ -актин, спектрин, белки промежуточных филаментов и винкулин; подобно костамерам сердечной мышцы, они располагаются вдоль Z-линий, сближаясь или удаляясь друг от друга при изменении длины миофибриллы [73, 74]. Отходящие от клеточной поверхности десминовые филаменты располагаются по краям Z-дисков и, по-видимому, связывают их с прилегающей сарколеммой. Десминовые филаменты лишь окружают центральные области Z-дисков, но не проникают в них. В состав центральных областей входит, как и в сердечной мышце, α -актинин, актин и, кроме того, Z-белок. На периферии Z-дисков присутствуют, помимо десмина, один из ассоциированных с промежуточными филаментами белков синемин, актин-связывающий белок филамин и небольшое количество спектринина [75, 76]. От Z-линий под углом 90° отходят тонкие нити, образующие полосу I, они состоят из α -актина, скелетномышечных форм тропонинов T, C и I и тропомиозина. Часть полосы I занимает линия N, со-

держущая небулин — очень большой миофибриллярный белок с мол. массой ~500 кДа [77].

С тонкими нитями перекрываются толстые, миозиновые нити, содержащие тяжелые и легкие цепи миозина и С-белок с мол. массой 140 кДа. Кроме связывания с миозином С-белок способен к чувствительному к кальцию связыванию с полосой I. Существует несколько изоформ С-белка. Разные формы найдены в большой грудной мышце и в широчайшей мышце спины [78]. Таким образом, как и с тяжелой цепью миозина, наблюдается специфичность изоформ С-белка по отношению к мышечным волокнам с разными физиологическими характеристиками. Гетерогенность по С-белку может, впрочем, обнаруживаться и в одном и том же волокне, и даже в пределах одного саркомера. Есть мышцы, в каждом саркомере которых присутствуют две формы С-белка. Центры толстых нитей располагаются по М-линии, которая содержит белок миомезин с мол. массой 165 кДа. Кроме того, в М-линии присутствует особая, мышечная форма креатинкиназы [79].

Организация миофибриллы и, возможно, косташеров должна, по-видимому, отвечать сократительной функции мышечных клеток. Это соображение отвлекает внимание исследователей от несократительных аспектов жизнедеятельности скелетных мышц. В мышечных клетках, однако, имеются помимо собственно сократительных и все другие органеллы, хотя их расположение и отличается от почти кристаллической упаковки саркомеров. Одна из наиболее интересных загадок, касающихся строения скелетных мышц, состоит в том, что, как показали опыты с антителами, специфичными по отношению к γ -актину, эта форма актина есть на митохондриях, но отсутствует в I-полосе саркомеров. γ -Актин обнаруживается также в субкортикальном слое клетки под плазматической мембраной [80].

Нужно отметить, что реальные скелетные миофибриллы не обладают такой кристаллической структурой, какую изображают на схемах. Регулярность мышцы является, скорее, статистической. Так, тонкие нити в одном и том же саркомере различаются по длине, причем размах колебаний может составлять 0,18—1,2 мкм [69].

Кроме того, ни Z-, ни M-линии не располагаются в мышцах взрослых особей с абсолютно строгой периодичностью. Таким образом, законы сборки сократительного аппарата мышцы не могут быть получены путем простой экстраполяции законов сборки бактериофагов: сборка в мышце не является строго линейным и детерминированным процессом с однозначно определенной конечной точкой, ее конечный результат — высокоупорядоченная, но не идеальная структура, и модели сборки саркомеров должны отражать этот факт.

Высокая степень регулярности строения мышц привлекла внимание к процессу их развития как к модели для изучения путей возникновения пространственной организации. Перераспределение некоторых мышечных белков во время развития мышц прослежено в деталях. Так, α -актинин в развивающихся скелетномышечных клетках расположен сначала так же, как в фибробластах и гладкомышечных клетках, т. е. в виде точечных скоплений вдоль волокон натяжения, а примерно на четвертый день, когда начинается формирование саркомеров, он обнаруживается в центральных областях Z-дисков. На ранних стадиях развития культивируемых мышечных клеток филамин тоже распределен, как в фибробластах, т.е. вдоль волокон натяжения; затем он на несколько дней исчезает, а потом появляется на периферии Z-дисков. В период исчезновения филамина происходит переключение его экспрессии: на ранних стадиях синтезируется белок, сходный с филамином фибробластов и гладких мышц или даже идентичный ему, а тот белок, который появляется позднее и локализуется на периферии Z-дисков, является уже другой, отличающейся по своим биохимическим свойствам формой филамина [81]. Десмин не обнаруживается в мышечных клетках до тех пор, пока они не перестают делиться и не начинают экспрессировать специфические мышечные белки. В одноядерных миобластиках десмин образуется лишь в небольшом количестве, синтез его происходит главным образом в многоядерных мышечных трубках. В течение первых нескольких дней после начала его экспрессии десмин выявляется в мышечных клетках в виде системы филаментов, сходной, например, с сетью

виментиновых филаментов в фибробластах, а примерно к восьмому дню — на день позже филамина и на несколько дней позже α -актинина — он появляется на периферии Z-дисков, и с этого момента его расположение становится согласованным с расположением саркомеров.

На всех стадиях развития мышцы содержат миозин. На самых ранних стадиях это, однако, цитоплазматическая, характерная для фибробластов форма миозина, и распределена она так же, как в фибробластах: в волокнах натяжения (с едва заметной прерывистостью) и по периферии клетки, в примембранном слое. Такое расположение сохраняется и в развивающихся мышечных трубках с той разницей, что волокна натяжения локализуются в трубках в основном на их концах. Середину же трубок занимает специфический мышечный миозин, который в зависимости от степени зрелости мышцы обнаруживается либо в виде не обладающих прерывистостью филаментов, либо в составе саркомеров [79, 82]. То, что одна и та же изоформа тяжелой цепи миозина действительно меняет свое расположение в мышцах эмбрионов по мере их развития, убедительно доказывается опытами с моноклональными антителами [83].

Для правильного развития мышцы важное значение имеют два несократительных белка. На протяжении всего развития в ней присутствуют тубулин и микротрубочки. Микротрубочки ориентированы обычно параллельно длинной оси развивающейся мышечной клетки, нарушение их функционирования отрицательно сказывается на мышечном развитии (к этому вопросу мы еще вернемся позднее). Другой несократительный белок развивающейся мышечной клетки — это виментин. В диффузно распределенном виде он сохраняется в клетке даже после начала формирования саркомеров и появления в них α -актинина. Характер распределения виментина в мышце остается, впрочем, предметом споров. Одна группа исследователей находит виментин в Z-дисках, причем примерно тогда же, когда в них есть и десмин [84]. Однако двум другим лабораториям обнаружить виментин в саркомерах не удается [85, 86].

Возможные источники указанного противоречия интересно проанализировать с точки зрения сильных и

слабых сторон иммунофлуоресцентного метода выявления белков. Положительный результат при иммунофлуоресцентном окрашивании объекта указывает на присутствие в нем одного или нескольких из следующих белков: 1) исследуемого антигена; 2) иммунологически родственного, но биохимически отличного антигена; 3) антигена, загрязнявшего препарат, использованный для иммунизации; 4) белка, являющегося сильным неспецифическим адсорбентом для любого антитела. Негативный результат окрашивания может быть обусловлен следующими причинами: 1) отсутствием антигена в окрашиваемом препарате; 2) недоступностью антигена для антител; 3) чрезмерно жесткими условиями окрашивания. К сожалению, не существует метода окрашивания, который полностью исключал бы возможность ложноположительных и ложноотрицательных результатов, ибо контрольные окрашивания, необходимые для обеспечения надежности выводов, сами подвержены влиянию перечисленных выше факторов. Учитывая сказанное, можно предложить следующие гипотезы для объяснения неоднозначности данных относительно распределения виментина в мышечном волокне: 1) Z-диски мышечных клеток — как в культуре, так и у взрослых особей — содержат специфическую мышечную форму виментина, поэтому исследователи, которые располагают антителами широкой специфичности, могут выявить виментин в Z-дисках, тогда как другие, использующие в своих опытах антитела, которые распознают только виментин фибробластного типа, — не могут; 2) Z-диски вообще не содержат виментина, а положительная иммунофлуоресцентная картина является результатом того, что используемые виментиновые антитела имеют некоторое сродство к десмину, либо обладают к Z-дискам сильным неспецифическим сродством, не скомпенсированным путем правильного выбора условий окрашивания; 3) мышцы, исследовавшиеся разными группами, отличались друг от друга по характеру их развития. Какой из этих вариантов имеет место в действительности, можно будет установить только путем обмена антителами и сопоставления условий, в которых проводилось окрашивание ими.

Мышечные клетки обладают специализированным

цитоскелетом, приспособленным для осуществления сокращения; сильно развитая система микрофиламентов заполняет в этих клетках все внутреннее пространство, а не только клеточный кортекс. Специализация достигается путем использования специфических мышечных изоформ белков и специфической организации их в клетках. В какой мере различия в организации обусловлены биохимическими различиями между белковыми компонентами, пока неизвестно. Ясно, однако, что в мышцах всех классов, включая и скелетные поперечно-полосатые мышцы, цитоскелет представляет собой динамичную, развивающуюся структуру, непрерывно перестраивающуюся в соответствии с предъявляемыми к ней требованиями.

3.5. Эпителиальные и эндотелиальные клетки

Эпителиальные клетки выполняют в организме разнообразные функции. Они образуют прочное водонепроницаемое покрытие на поверхности кожи, выстилают эластичным адсорбирующим слоем кишечник, формируют различные железы. В свете такого многообразия функций было бы удивительно, если бы оказалось, что все эпителиальные клетки имеют одинаковый цитоскелет. И действительно, как среди мышц разных типов мы видим прогрессирующую специализацию и расширение одной и той же цитоскелетной системы — волокон натяжения, точно так же и разные типы эпителиальных клеток могут быть в целом охарактеризованы степенью развитости в них одного или двух определенных компонентов цитоскелета: сети промежуточных филаментов и кортикальной системы микрофиламентов.

В некоторых отношениях клетки эпителия напоминают фибробласты. По мере их расплывания на субстрате между ними и поверхностью субстрата формируются фокальные контакты. Эти контакты обогащены α -актинином, и, как и в фибробластах, на них оканчиваются пучки микрофиламентов. Однако общая картина распределения пучков и фокальных контактов в эпителиальных клетках не такая, как у фибробластов: пучки в эпителиальных клетках короче, а фокальные контакты

располагаются в основном вдоль клеточного края и не так легко разрушаются [87].

Детальное строение волокон натяжения в эпителии исследовалось методом иммуофлуоресценции. Эти исследования показали, что у клеток эпителия, так же как у фибробластов, и межклеточные контакты, и участки прикрепления клеток к субстрату, и точки схождения волокон натяжения содержат α -актинин. Тропомиозин и α -актинин располагаются с некоторой периодичностью вдоль волокон натяжения, причем в эпителиальных клетках более тесно, чем в фибробластах [88]. Прерывистость расположения вдоль волокон натяжения характерна и для миозина [89]. Распределение миозина в клетке, как и распределение актина, зависит от ее функционального состояния. Во время распластывания в выпячиваниях поверхности клетки и складках клеточного края виден один актин, а у основания этих структур — актин вместе с миозином. Чем сильнее распластаны и менее подвижны эпителиальные клетки, тем меньше актина и миозина обнаруживается вне волокон натяжения [90].

Эпителиальные клетки обладают развитой системой микротрубочек, которые, как и у фибробластов, нередко контактируют с различными органеллами. От микротрубочек отходят нити диаметром 2—4 нм, многие из которых оканчиваются на пигментных гранулах и других структурах. При попытке отделить от сети микротрубочек связанные с ней гранулы результат зачастую достигается лишь после существенного разрушения клетки [91]. Для одного типа эпителиальных клеток была определена в интерфазе полярность микротрубочек. Оказалось, что у всех микротрубочек быстрорастущим является их дистальный конец [92]. Какое значение имеет этот факт для транспорта частиц одновременно в двух направлениях — от центра и к центру клетки, мы обсудим позднее.

Третья основная фибриллярная система — сеть промежуточных филаментов — в эпителии наиболее разнообразна и наиболее специализирована. Характерной чертой эпителиальных клеток является присутствие цитокератинов, из которых и построены их промежуточные филаменты. По молекулярной массе и типу внутриклет-

точного распределения цитокератины можно разделить по меньшей мере на семь основных классов. Цитокератиновые полипептиды — продукты разных генов, различия между ними не могут быть сведены к различиям в их процессинге [86]. До сих пор не найдено таких эпителиальных клеток, которые содержали бы цитокератины лишь одного класса: у всех имеется по меньшей мере два разных цитокератина, а у многих и больше. Набор цитокератинов, присутствующих в клетках, зависит от типа клеток, условий их роста, а также от стадии гистогенеза [86]. Из всех промежуточных филаментов первыми были обнаружены именно цитокератиновые филаменты, благодаря тому что они есть в трофэктодерме эмбрионов [93]. Дифференцировке эпителия *in vivo* сопутствует специализация набора цитокератинов. Так, кератины с мол. массой 50 и 58 кДа имеются только в многослойном эпителии, а кератины с мол. массой 56,5 и 65—67 кДа — лишь в кератинизированном эпидермисе. В то же время кератины с мол. массой 40, 46 и 52 кДа встречаются в различных типах эпителия [94]. Набор кератинов может быть неодинаковым даже у близко расположенных субпопуляций эпителиальных клеток. Например, у эпителия наружного корневого влагалища в волосяном фолликуле есть три общих кератиновых полипептида с межфолликулярным эпидермисом, однако нет трех других полипептидов последнего; кроме того, в нем имеется цитокератин с мол. массой 46 кДа, отсутствующий в межфолликулярном эпидермисе. Три особых цитокератина есть и в потовых железах, находящихся в непосредственной близости и от самих волосяных фолликулов, и от эпидермиса между ними. Таким образом, кожа состоит из множества микрообластей, различающихся как по морфологии, так и по характеристикам цитоскелета [95].

Набор цитокератинов варьирует в зависимости от условий, в которых культивируются клетки. Клонированные линии клеток эпителия молочной железы способны расти как в присутствии, так и в отсутствие гормонов. При росте в среде с соответствующими гормонами эти клетки образуют не очень плотный монослой, межклеточное пространство в котором пронизывают десмосо-

мальные мостики; цитокератиновые волокна, образуя сеть анастомозирующих пучков, тянутся по всему внутриклеточному пространству и оканчиваются на десмосомах. В культивируемых в присутствии гормонов клетках синтезируются те же четыре основных цитокератина, что и клетках *in situ*, и не синтезируется виментин. В том случае, когда клетки растут в среде, не содержащей гормонов, у них меняются набор экспрессируемых цитокератинов и морфология (десмосомы при этом по-прежнему образуются) и начинается синтез виментина [96]. Последнее наблюдение проливает свет на тот факт, что две известные линии эпителиальных клеток, HeLa и PtK, содержат и цитокератиновые, и виментиновые филаменты. В клетках этих линий, как и в культивируемых клетках эпителия молочной железы, виментиновые и цитокератиновые волокна переплетаются и анастомозируют друг с другом, но все же их расположение не совпадает. Эти клетки продолжают образовывать десмосомы, хотя и в меньшем количестве. После обработки этих клеток колхицином (для разборки микротрубочек) виментиновые филаменты образуют в них характерную структуру, охватывающую ядро, тогда как сеть кератиновых филаментов, хотя и несколько разрушенная, по-прежнему простирается по всей цитоплазме и прикрепляется к десмосомам; это может служить еще одним доказательством того, что сополимеризации двух типов белков промежуточных филаментов в рассматриваемых клетках не происходит [97]. Таким образом, присутствие цитокератинов является признаком, который может быть использован для идентификации эпителия; каждому виду эпителиальных клеток, характеризующемуся определенной функцией и локализацией, присущ и характерный набор цитокератиновых полипептидов.

Еще один основной тип цитоскелетных структур, в большей или меньшей степени свойственный эпителиальным клеткам, является продуктом дальнейшего развития и специализации кортикальной актиновой сети и связан с микроворсинками. Классический источник материала для исследования этого типа структур — кишечный эпителий, адсорбирующий питательные вещества и придающий механическую прочность стенке кишечни-

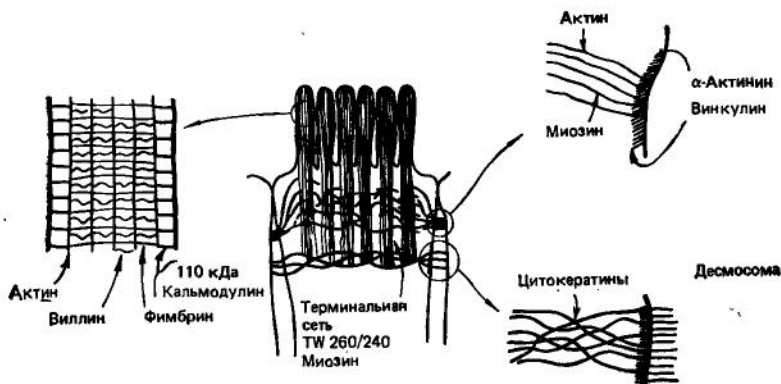


Рис. 3.5

ка. На обращенной в просвет кишечника поверхности клеток кишечного эпителия располагаются многочисленные микроворсинки, прикрепленные к так называемой терминальной сети (рис. 3.5). Сердцевину микроворсинки составляет актиновый пучок приблизительно из 20 филаментов, соединенных поперечными шивками друг с другом и с мембраной микроворсинки. Дистальный конец пучка актиновых филаментов кепирован, а своим проксимальным концом пучок проникает в терминальную сеть клетки. Структурными компонентами сердцевины микроворсинок служат, помимо актина, виллин (мол. масса 95 кДа) и фимбрин (мол. масса 68 кДа), сшивающие актиновые филаменты друг с другом, а также кальмодулин-связывающий белок с мол. массой 110 кДа, который, вероятно, сшивает пучок филаментов с мембраной [98].

Пучки микрофиламентов выходят из микроворсинок в терминальную сеть и прикрепляются к ней. Эта сеть состоит из филаментов, содержащих актин и тропомиозин, коротких толстых филаментов, образованных миозином, и тонких филаментов, содержащих белок из семейства спектрина. Этот спектриноподобный белок, получивший первоначально название TW260/240, имеет ту же α -субъединицу, что и собственно спектрин, однако другая его субъединица (мол. масса 260 кДа) не особенно похожа на β -спектрин. $\alpha\beta$ -Димеры формируют

тонкие, диаметром ~ 5 нм, нити, связывающие «корешки» актиновых пучков друг с другом и с плазматической мембраной. Еще один фибриллярный компонент терминальной сети — это переплетающиеся и анастомозирующие 10-нанометровые кератиновые филаменты, которые оканчиваются на десмосомах, расположенных вдоль боковых сторон клеток.

Описанная двойственность организации кортикальной актиновой сети свойственна не только клеткам кишечного эпителия. Еще один тип эпителиальных клеток, в которых с подмембранной сетью сочетаются «полуостровные» актиновые пучки, — это волосковые клетки улитки уха, от поверхности которых отходят так называемые стереоцилии. Каждая стереоцилия содержит сужающийся пучок актиновых филаментов, связанных поперечными мостиками друг с другом и клеточной мембраной. Некоторые из этих филаментов, выступая своими концами в основную часть клетки, образуют «корешки», которые прикрепляются к подмембранной сети, состоящей из актиновых микрофиламентов и тонких нитей диаметром 3—4 нм. Белок тонких нитей относится, вероятно, к семейству спектрина. Громкий звук вызывает в строении стереоцилий изменения, заключающиеся, по-видимому, в деполимеризации или фрагментации актиновых филаментов у основания стереоцилии — там, где филаменты выходят в кортикальную сеть, — и в снижении числа поперечных мостиков между актиновыми филаментами; следствием таких изменений является уменьшение жесткости структуры стереоцилий [99].

Анализ характера упаковки филаментов в стереоцилиях привел к более глубокому пониманию факторов, определяющих сборку спиральных структур. На продольных срезах стереоцилий ясно видно, что актиновые филаменты в каждой стереоцилии расположены строго координированно, «в фазе» друг с другом. В то же время на поперечных срезах упаковка филаментов выглядит менее жесткой. Причина нерегулярности в поперечной плоскости заключается в том, что спиральная структура имеет большое число эквивалентных связывающих участков. После образования какого-либо поперечного мостика место формирования следующего не фиксиру-

вано, напротив, для него существует несколько потенциальных участков связывания, и потому, за исключением систем с очень большим количеством мостиков, точное расположение мостиков предсказать нельзя. Образование всех возможных поперечных мостиков приводит к паракристаллической гексагональной упаковке филаментов. У животных степень упорядоченности упаковки изменяется по мере развития особи: на ранних стадиях филаменты расположены неупорядоченно, на более поздних стадиях чаще наблюдается их гексагональное расположение [1]. Существенно то, что неупорядоченность упаковки актиновых филаментов обусловлена исключительно их спиральностью. Вариабельность путей сборки характерна и для всех других спиральных структур, включая микротрубочки и промежуточные филаменты. Они имеют множество эквивалентных участков связывания формирующихся поперечных мостиков; вследствие этого их упаковку нельзя предсказать в деталях, и она описывается лишь статистически.

Несколько более сложный пример «полуостровной» структуры, поддерживаемой кортикальной сетью, демонстрирует эпителий сетчатки [100]. Внутренний и наружный сегменты палочек — отростков фоторецепторных клеток — содержат и микротрубочки, и микрофиламенты. По мере изменения условий освещения длина микрофиламентов изменяется. В состав цитоскелета наружных и внутренних сегментов палочек входят несколько кальмодулин-связывающих белков, один из которых, по-видимому, является α -спектрином. Палочка прикреплена к телу клетки посредством поперечных сшивок с сетью промежуточных филаментов, переплетающихся с мощными кольцевыми пучками микрофиламентов. Эта сеть, вероятно, содержит миозин, поскольку фрагменты ее, выделенные из клеток, в присутствии АТФ сокращаются и сокращение подавляется модифицированным миозином [101].

Эпителиальные клетки участвуют в формировании желез. Строение цитоскелета в клетках желез пока изучено недостаточно хорошо. Примером секреторного эпителия, уже отчасти охарактеризованного, могут служить клетки печени крысы, в которых найдены многочислен-

ные поперечные мостики между филаментами из β - и γ -актинов и цитокератиновыми филаментами. Указанные формы актина обнаруживаются вместе с десмосомами во фракции плазматических мембран [102].

Так как эпителиальные клетки обладают высокоорганизованным, характерным цитоскелетом, их часто используют в качестве объекта при разработке новых методов выявления цитоскелетных структур. Интактные клетки РтК были исследованы методом высоковольтной электронной микроскопии с предварительным высушиванием в замороженном состоянии или замещением в замороженном состоянии. В целом замороженные клетки выглядели под микроскопом примерно так же, как и клетки, фиксированные обычными методами [103]. В обоих случаях были видны многочисленные микротрабекулы, которые формировали анастомозы, ветвились, контактировали в цитоплазме с разнообразными фибриллярными элементами, а также прикреплялись к различным органеллам. Картина оставалась достаточно сложной и после кратковременной экстракции клеток бриджем (прямые биохимические данные о полноте такой экстракции отсутствуют). Несколько менее сложная картина наблюдается в том случае, когда для предотвращения осмотического шока в экстрагирующий раствор вводят сахарозу [22]. В препаратах, полученных без сахарозы, от цитоскелета остаются в основном лишь «голые» филаменты, многие из которых до некоторой степени разрушены [104]. Другой путь состоит в том, чтобы фиксировать клетки смесью глутарового альдегида, таниновой кислоты и сапонина. Такая смесь, по-видимому, обеспечивает частичную экстракцию плазматических белков во время фиксации и служит для цитоплазматических филаментов протравой, так что фибриллярные структуры становятся лучше видны даже на тонких срезах — преимущество, которое отчасти компенсирует неизбежное при таком способе обработки обрушение деталей структуры [105]. Трудность изучения филаментов на срезах ясно осознается при сравнении методик, включающих и не включающих освобождение образца от материала для заливки (рис. 3.6). Было предпринято несколько попыток выявить цитоскелетные

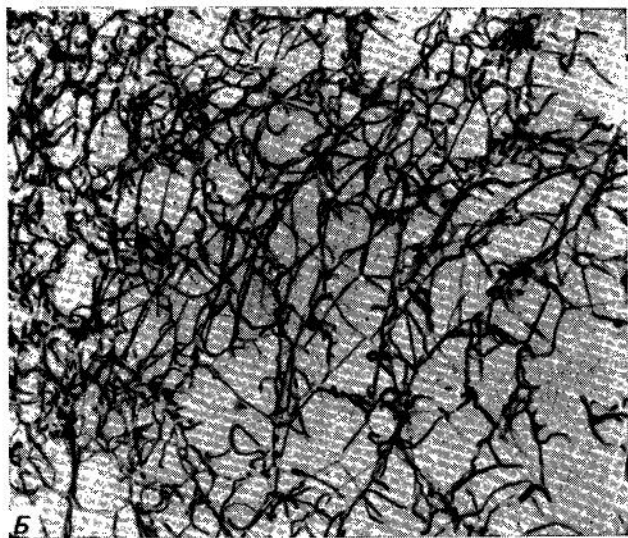
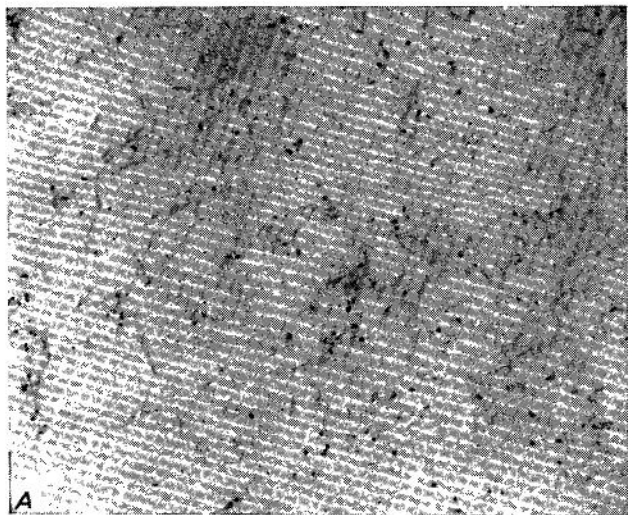


Рис. 3.6. Микрофотография коллагенового геля (просвечивающая электронная микроскопия): (А) — в присутствии, (Б) — в отсутствие заливочной среды; через заливочную среду фибриллы видны хуже.

структуры *in situ*, используя замороженные срезы интактного эпителия печени. Хотя структура клетки и нарушалась немного из-за образования кристаллов, картина строения десмосомальных мостиков и анастомозирующих филаментов вполне соответствовала той, которая наблюдалась при изучении строения этих цитоскелетных образований в культивируемых клетках [106].

Эпителиальные клетки различаются по степени развития цитоскелетных систем — сети промежуточных филаментов и кортикальной актиновой сети. Почему цитокератиновая сеть в этих клетках состоит как минимум из двух белков, до сих пор непонятно. Остается неясным и то, действительно ли миозин, столь часто обнаруживающийся в актиновой сети эпителиальных клеток, осуществляет сокращение *in vivo* или он просто поддерживает изометрическое натяжение.

Эндотелиальные клетки, подобно клеткам эпителия, образуют слои. Однако функции этих двух типов клеток, равно как и физические условия, в которых эти клетки находятся вследствие определенной локализации в организме, довольно сильно различаются, что обуславливает существование значительных различий и между их цитоскелетами. Самое разительное отличие цитоскелета эндотелиальных клеток от цитоскелета эпителиальных клеток состоит в том, что в эндотелии промежуточные филаменты построены исключительно из виментина [86]. В культивируемых эндотелиальных клетках нередко имеются волокна натяжения, содержащие нормальный набор ассоциированных белков. В клетках *in situ*, однако, актин располагается преимущественно на периферии, в виде диффузной сети; волокна натяжения обнаруживаются лишь в эндотелии определенных участков артерий — по-видимому, там, где клетки подвергаются максимальному механическому воздействию. Волокна натяжения появляются в клетках также при регенерации эндотелия. Когда клетки распластываются и начинают перемещаться, чтобы заполнить область нарушения целостности эндотелиального покрова, в них формируется большое количество волокон натяжения, ориентированных в направлении раны. По мере заживления раны волокна натяжения ориентируются в соответствии

с направлением тока крови; они долго сохраняются и после того, как вся обнажившаяся при повреждении базальная мембрана будет покрыта эндотелием [107, 108].

Процесс распластывания эндотелиальных клеток начинается с распластывания фибробластов и эпителиальных клеток. В фазе начального прикрепления на поверхности клетки образуются филоподии, которые «исследуют» окружающее пространство. Собственно распластывание происходит после того, как большая часть клеточной поверхности окажется в контакте с субстратом. Когда клетка распластается достаточно сильно, микрофиламенты объединяются и формируют волокна натяжения, а микротрубочки распространяются от центра клетки в радиальном направлении. Как только система микротрубочек становится достаточно развитой и микротрубочки оказываются способны к латеральным взаимодействиям, вдоль них начинается радиальное движение различных органелл [109]. Впоследствии радиальная связь между органеллами и микротрубочками становится менее явной, из-за того что распределение микротрубочек в клетке делается более равномерным. К обсуждению вопроса о структурной основе внутриклеточного движения мы еще вернемся позднее.

3.6. Трансформированные клетки

Актиновая сеть в трансформированных клетках, как правило, малоупорядоченна [110, 111]. Трудно исключить и возможность того, что в двух других основных системах филаментов также имеются существенные дефекты. В некоторых случаях, однако, наблюдаются весьма специфические изменения компонентов цитоскелета. В клетках одной спонтанно трансформировавшейся линии, например, найден мутантный актин, а клетки, полученные в результате дальнейшей трансформации этой линии, оказались двойными мутантами по актину. Мутантный актин синтезировался в клетках с той же скоростью, что и нормальный, но хуже встраивался в цитоскелет [112]. Изменения могут затрагивать и белки, ассоциированные с актином: так, может понизиться содержание α - и β -тропомиозинов в клетках или возрасти

степень фосфорилированности винкулина. Когда температурочувствительный вирус трансформирует фибробласты, экспрессирующие цитоплазматические β - и γ -актины и в какой-то мере гладкомышечный α -актин, содержание последнего избирательно снижается — по-видимому, в результате уменьшения скорости его синтеза [113].

В эпителиальных клетках в результате трансформации вирусом изменяется расположение некоторых белков. Киназа $pp60^{src}$ локализуется в адгезионных бляшках — как в местах взаимодействия клетки с субстратом, так и в межклеточных контактах [114]. Благодаря такой локализации киназа оказывается в тесной связи с винкулином, у которого трансформация повышает степень фосфорилированности тирозина [41]. Актин и α -актинин также обнаруживаются в адгезионных бляшках трансформированных клеток, но в меньших количествах, чем у нормальных клеток. В результате трансформации снижаются, кроме того, число и размеры самих адгезионных бляшек. Так как киназа $pp60^{src}$ является вирусной формой одного из нормальных клеточных белков, ее расположение, по-видимому, отражает происходящие при трансформации изменения в организации нормальной клетки.

Трансформация нередко сопровождается дедифференцировкой клеток, вследствие чего в таких клетках могут уже не обнаруживаться специфичные для них изоформы многих цитоскелетных белков. Однако белки промежуточных филаментов, экспрессировавшиеся в исходной нормальной ткани, продолжают синтезироваться и после трансформации; к ним может при этом добавиться виментин. Такая устойчивость экспрессии белков промежуточных филаментов оказывается полезной для идентификации метастазов [115].

Степень трансформации клеток может быть оценена как морфологически, так и биохимически. Более детально этот вопрос будет рассмотрен позднее. Судя по разнообразию строения цитоскелета в трансформированных клетках, трансформация, вызванная вирусами, опухолевыми промоторами или другими агентами, может приводить к постепенному изменению какой-нибудь одной

системы филаментов или затрагивать несколько фибриллярных систем. Систематического анализа этих двух возможностей не проводилось.

3.7. Протисты

Эукариотический цитоскелет возник прежде, чем появились клетки животных, и если цитоскелет мышцы и цитоскелет эпителия мы могли рассматривать как «вариации на тему, уже прозвучавшую» у фибробластов, то точно так же цитоскелетные структуры большинства клеток животных можно было бы описать как видоизменение структур, встречающихся у одноклеточных протистов.

Микротрубочки и микрофиламенты, а также связанные с ними тонкие поперечные мостики широко распространены у протистов. Например, у фораминифер поглощение частиц пищи осуществляется с участием разветвленной сети, которая состоит из микротрубочек и тонких нитей диаметром 5 нм, не декорирующихся миозином [116]. Эта анастомозирующая сеть является особенно удачной моделью для изучения скачкообразного движения, подробно рассматриваемого ниже.

Различные амёбы служат объектом для изучения амёбоидного движения. Протисты легко выращивать, и благодаря этому оказывается возможным проводить очистку их белков, используя большие количества исходного материала. А некоторые из них, например *Physarum*, весьма удобны, кроме того, для морфологического изучения процессов сокращения и релаксации.

На ранних стадиях развития натяжения у *Physarum* в клетках видны параллельные пучки микрофиламентов, соединенных друг с другом короткими поперечными мостиками. По мере усиления натяжения между микрофиламентами появляются оптически плотные участки, содержащие, возможно, толстые миозиновые филаменты. Во время релаксации эти участки исчезают, а организация пучков микрофиламентов становится менее правильной. Сходные перестройки наблюдаются при изотоническом сокращении. Предполагается, что существенную роль в

них играет изменение степени агрегированности миозина [117].

Особенно удивителен протист *Naegleria gruberi*, у которого амёбонидные, перемещающиеся по поверхности субстрата клетки могут превращаться в свободно плывущие клетки, имеющие вытянутую, обтекаемую форму и снабженные жгутиками. Это превращение регулируется простыми физиологическими факторами и может происходить в популяции клеток синхронно. До описанной трансформации в клетках *Naegleria* функционирует в основном актиновая система (хотя во время митоза есть в них и микротрубочки), а после трансформации образуются охватывающая внутриклеточное пространство и определяющая форму клетки субкортикальная сеть микротрубочек и, кроме того (в двух жгутиках), обычные аксонемы типа «9+2». Таким образом, *Naegleria* представляет собой прекрасную модель для изучения перехода от функционирования одной цитоскелетной системы к функционированию другой и для изучения регуляции экспрессии цитоскелетных белков [118].

На клетках *Tetrahymena* реснички обнаруживаются постоянно — в отличие от жгутиков у *Naegleria*. Переменчивая форма этих клеток задается, по-видимому, расположенной под мембраной сетью, в состав которой входят микротрубочки. Эта сеть содержит также компоненты, сходные в антигенном отношении с белками промежуточных филаментов. Изучение регуляции формы и внутренней структуры *Tetrahymena* очень много дает для понимания механизмов локальной и глобальной регуляции пространственной организации клетки. К вопросу о регуляции у *Tetrahymena* мы еще вернемся позднее.

Клетки *Chlamydomonas* — удачный объект для исследования, так как хорошо изучены их ультраструктура и генетика. Они не слишком привередливы, и их можно выращивать в больших количествах. У *Chlamydomonas* есть и микрофиламенты, и микротрубочки. Микрофиламенты в *Chlamydomonas* наиболее выражены в отростках, образующихся во время спаривания. Эти отростки отходят от апикальной части клеток и соединяют спаривающиеся клетки друг с другом; они содержат пучок филаментов, декорирующихся тяжелым меромиозином.

Весьма вероятно, что роль актина в жизнедеятельности *Chlamydomonas* этим не исчерпывается. Микротрубочки в *Chlamydomonas* образуют подмембранную сеть, окружающую внутриклеточное пространство. Микротрубочки этой сети отходят от пары базальных телец, расположенных у основания жгутиков в апикальной части клетки. От базальных телец отходят также и аксонемные микротрубочки, образующие структуру «9+2». Основная масса данных о сборке аксонем получена именно на *Chlamydomonas*. Было идентифицировано и картировано множество мутаций, влияющих на подвижность *Chlamydomonas*. Аксонема представляет собой сложно организованную структуру, состоящую более чем из 50 белков. Сборка ее происходит, по-видимому, путем последовательного присоединения этих белков — подобно сборке бактериофагов. Многие из аксонемных белков совершенно необходимы для образования полноценной в функциональном отношении аксонемы. Мутации по некоторым аксонемным белкам могут препятствовать включению в формирующуюся аксонему целого ряда других белков. Но, пожалуй, самое замечательное — это то, что на эффективность функционирования таких ключевых белков влияет их фосфорилирование [119]. Исследование регенерации жгутиков *Chlamydomonas* позволило получить богатую информацию о регуляции активности тубулиновых генов [120].

Биохимические и морфологические исследования показывают, что микрофиламенты и микротрубочки широко распространены у протистов. Точные пределы распространения этих типов структур, равно как и пределы их возможной специализации, пока неизвестны. Ясно, однако, что и микротрубочки, и микрофиламенты появились до многоклеточных организмов. Промежуточные филаменты встречаются у протистов намного реже. В настоящее время белки, родственные в антигенном отношении белкам промежуточных филаментов многоклеточных, известны лишь у *Tetrahymena* и *Candida* [121]. На различие в выраженности системы промежуточных филаментов у протистов и многоклеточных может, вероятно, пролить свет тот факт, что у последних основной функцией этих филаментов является интеграция клеток в

ткани. Особенно это относится к цитокератиновым и десминовым филаментам. Впрочем, связь между расположением промежуточных филаментов и расположением микротрубочек и ядра в клетках указывает на возможность существования у промежуточных филаментов и иных функций, и может оказаться, что какие-нибудь предшественники промежуточных филаментов распространены у протистов не менее широко, чем актин и тубулин.

3.8. Растения

Процессы развития у растений и животных существенным образом различаются. Развитие у растений происходит путем размножения и увеличения в размерах *in situ*, без перегруппировки клеток, и, кроме того, у растений крайне велико значение клеточной стенки. По этим причинам может на первый взгляд показаться удивительным, что цитоскелет играет у них такую же ключевую роль, как и у животных. И тем не менее, несмотря даже на то, что растительным клеткам уделялось сравнительно мало внимания и что при экспериментальном исследовании их возникают определенные сложности, уже совершенно ясно, что тубулиновой и актиновой системам принадлежит центральная роль в организации цитоплазмы растений [122].

Актин растений известен главным образом своей связью с током цитоплазмы, который создается толстыми актиновыми тяжами, присоединенными к плазматической мембране. Эти тяжи представляют собой пучки микрофиламентов одинаковой полярности: у всех филаментов к мембране прикреплен «оперенный» конец. Как механизм течения цитоплазмы, точно не известно, но, по-видимому, в нем принимает участие миозин. Возможно, что актин помимо создания цитоплазматического тока выполняет и другие, пока неизвестные функции.

Исследования цитоскелета растений были сосредоточены в основном на микротрубочках, вероятно, потому, что их легче, чем другие цитоскелетные структуры, увидеть в электронный микроскоп. Появление подходящих иммунофлуоресцентных методов расширит круг струк-

тур, исследуемых в клетках растений [123]. Расположение микротрубочек в растительной клетке меняется на каждой стадии клеточного цикла. В интерфазе многочисленные микротрубочки лежат в кортикальной области под плазматической мембраной; нередко они параллельны целлюлозным микрофибриллам. Между микротрубочками и плазматической мембраной обнаружено множество поперечных мостиков, однако механизм влияния микротрубочек на ориентацию целлюлозных фибрилл все еще непонятен [124].

Перед профазой формируется так называемый пре-профазный пучок — широкая лента из сравнительно тесно расположенных кортикальных микротрубочек. По мере созревания препрофазного пучка все большее число микротрубочек собирается вместе, а количество микротрубочек в других частях кортекса уменьшается. В ядерной оболочке, с которой в интерфазе никакие микротрубочки не связаны, начинает при развитии препрофазного пучка обнаруживаться тубулин. Микротрубочки — в виде сети или радиально ориентированные — появляются в области между ядром и кортексом клетки. Некоторые из таких микротрубочек, по-видимому, соединяют препрофазный пучок с ядерной оболочкой. Препрофазный пучок обладает поразительным свойством: хотя он исчезает до окончания профазы, он предопределяет расположение плоскости клеточного деления [125].

В профазе большинство микротрубочек располагается вокруг ядерного материала. В дальнейшем, в ходе митоза, формируется веретено и осуществляются метафазное и анафазное перемещения хромосом. Существенное различие между митотическим аппаратом растений и животных состоит в том, что у растений в нем нет центриолей; кроме того, митотическое веретено растений имеет скорее бочкообразную, а не двухконусную форму.

В телофазе количество микротрубочек в веретене снижается. Они образуют фрагмопласт, который участвует в делении клетки, направляя формирование клеточной пластинки. Микротрубочки фрагмопласта появляются сначала в центре клетки, а затем происходит латеральное распространение фрагмопласта, до тех пор пока клеточная пластинка не сформируется полностью.

По завершении клеточного деления микротрубочки постепенно занимают кортикальное положение, характерное для микротрубочек интерфазной клетки. Участие микротрубочек и в ориентации целлюлозных фибрилл, механически определяющих возможную будущую форму клетки, и в образовании препрофазного пучка, задающего ориентацию плоскости клеточного деления, делает их роль в развитии растений ключевой. Весьма вероятно, что во всем этом принимает также участие и актин, но какое именно выяснить из-за технических трудностей пока не удастся.

У эукариотических клеток и внутренние процессы, и внешние функции зависят от цитоскелета. Как правило, специализация клеток проявляется в специализации цитоскелетных структур. Такая универсальность значения цитоскелета имеет для нас свои плюсы и минусы. С одной стороны, можно надеяться, что основные механизмы широко распространены и не подвергаются в большинстве эукариотических клеток существенным изменениям. Но с другой стороны, в качестве предмета исследования выбираются нередко высокоспециализированные клетки, белки которых модифицированы так, чтобы обеспечить, например, крайнюю степень эластичности, или сократимости, или стабильности, не свойственную большинству других клеток, и надо иметь в виду, что изучение такого рода специальных случаев приносит пользу лишь тогда, когда тщательно оценивается значение функциональных особенностей конкретной системы.

4. Хореография цитоскелета

4.1. Вещества, прямо или косвенно действующие на цитоскелет

Существует ряд препаратов, избирательно действующих на систему микротрубочек или систему микрофиламентов; они активны *in vitro* и способны специфически связываться с тубулином или актином в мономерном или полимерном состояниях. При изучении препаратов, действующих на эти две фибриллярные системы, выявляется немало параллелей. Так, и для микротрубочек, и для микрофиламентов известны препараты, связывающиеся с мономером и подавляющие сборку полимера; кроме того, для обеих систем существуют препараты, связывающиеся с полимером и увеличивающие его стабильность.

Первыми соединениями, для которых показано их действие на цитоскелет, были антимитотические препараты, и прежде всего колхицин. Колхицин, нокодазол (или онкодазол) и колцемид связываются с одним и тем же участком тубулинового димера [126]. Связывание повышает нуклеозидтрифосфатазную активность тубулина. Комплекс этих препаратов с димером связывается с быстро растущим концом микротрубочек и снижает скорость дальнейшего присоединения мономеров к этому концу. В результате критическая концентрация для этого конца повышается и достигает величины, характеризующей медленно растущий конец. Колхицин отсоединяется от тубулина медленно и, кроме того, неспецифически связывается с клеточными мембранами, в частности с переносчиками нуклеозидов. Нокодазол имеет по сравнению с колхицином то преимущество, что он более специфичен и его связывание более обратимо. Для выявления побочных эффектов колхицина в контрольных опытах используют люмиколхицин, потерявший под действием света способность связываться с тубулиновыми димерами, но характеризующийся тем же спектром неспецифического связывания. С участком связывания колхицина перекрывается участок связывания подофиллотоксина, действующего аналогично колхицину. С иным связывающим участком взаимодействуют винбластин и винкристин. Связываясь с тубулиновыми димерами,

винбластин вызывает их агрегацию и образование кристаллов; он подавляет полимеризацию тубулина, уводя его из раствора в агрегаты. В целом все эти вещества снижают скорость полимеризации, но не вызывают непосредственно разборки микротрубочек. Их действие на цитоплазматические микротрубочки проявляется лишь через несколько часов, хотя подавление образования митотического веретена наступает немедленно. В связи с тем что эти вещества действуют в основном на растущие микротрубочки, их влияние на разные типы микротрубочек в клетке оказывается различным. Так, микротрубочки жгутиков устойчивы к колхицину, а митотические микротрубочки чувствительны к нему.

Таксол связывается с тубулином стехиометрически, а не субстехиометрически. Он практически не связывается со свободным тубулином вне микротрубочек. Результатом действия таксола является увеличение стабильности микротрубочек и снижение концентрации свободного тубулина. В присутствии таксола полимеризация тубулина протекает без заметной лаг-фазы; все эффекты, вызываемые таксомом, обратимы [127].

Цитохалазины образуют группу веществ, обратимо связывающихся с актиновым мономером. Их связывание повышает нуклеозидтрифосфатазную активность актина. Комплекс актина с цитохалазином присоединяется к быстро растущему концу микрофиламентов и препятствует дальнейшей полимеризации на нем [128]. В результате действия цитохалазинов критическая концентрация для быстро растущего конца становится такой же, как и для медленно растущего конца. Цитохалазины устраняют лаг-фазу при полимеризации актина, что обусловлено, по-видимому, стабилизацией димеров или тримеров актина. Дальнейший рост от таких стабилизированных затравок характеризуется, однако, кинетикой, свойственной медленно растущему концу. Цитохалазин В обладает побочным действием: он подавляет транспорт глюкозы через клеточную мембрану; в то же время дигидроцитохалазин В и цитохалазин D не влияют на транспорт глюкозы [129]. Цитохалазин D обладает более высоким сродством к актину. Аналогично тому как таксол стабилизирует микротрубочки, фаллоидино-

вые препараты стабилизируют микрофиламенты. Фаллоидин и фаллацидин связываются с полимеризованным актином стехиометрически и обратимо снижают критическую концентрацию.

Таким образом, и для микротрубочек, и для микрофиламентов существуют вещества, избирательно блокирующие их полимеризацию или деполимеризацию. До сих пор ни для одной из этих систем филаментов неизвестно веществ, вызывающих быструю деполимеризацию, за исключением, пожалуй, мейтансина, способного быстро деполимеризовать микротрубочки *in vitro*. Однако мейтансин является алкилирующим агентом, и его действие на микротрубочки до некоторой степени необратимо и, возможно, неспецифично.

При использовании препаратов, действующих на цитоскелет, важно различать немедленные и поздние эффекты. Так, таксол и фаллоидин действуют на соответствующие филаменты, стабилизируя их, но позднее в живых клетках, обработанных этими препаратами, наблюдается образование пучков микротрубочек или микрофиламентов соответственно. Этот проявляющийся на поздних стадиях эффект подавляется ингибиторами метаболизма, что указывает на его зависимость от источников энергии. Образование пучков не происходит также в обработанном таксолом и фаллоидином изолированном цитоскелете. Ингибиторы сборки микротрубочек вызывают немедленное блокирование митоза, однако для разрушения ими цитоплазматических микротрубочек требуется от одного до нескольких часов. Деполимеризующее действие на цитоплазматические микротрубочки, как и образование пучков, зависит от источников энергии. Колхицин не деполимеризует микротрубочки в изолированном цитоскелете. Это указывает на то, что разборка микротрубочек в живых клетках является динамическим процессом, включающим в себя зависящую от энергии регуляцию на концах микротрубочек. Цитохалазины вызывают немедленное подавление образования складок клеточного края и формирования филоподий. Требуется, однако, продолжительное время, для того чтобы под действием цитохалазинов началось образование плотных фокусов и ветвящихся отростков клетки.

На ультраструктурном уровне также можно выделить немедленные и поздние эффекты цитохалазинов. У микрофиламентов свободные концы появляются сразу же после добавления этих соединений, однако скопления и пучки микрофиламентов образуются лишь через определенное время [130]. В изолированном препарате цитоскелета, обработанном цитохалазинами, обнаруживается повышенное число свободных концов, однако в нем не происходит образования скоплений филаментов, наблюдающегося в живых клетках. Агрегация микрофиламентов в клетке происходит, по-видимому, в результате требующего энергии процесса реорганизации актиновой системы на поздних стадиях действия цитохалазинов.

К сожалению, до сих пор неизвестно веществ небольшого размера, непосредственно действующих на промежуточные филаменты. В настоящее время единственным способом вызвать разборку промежуточных филаментов *in vivo* является микроинъекция в клетку определенных антител. Кроме того, ингибиторы микротрубочек вызывают со временем образование виментиновых и в некоторых случаях десминовых околядерных структур. Этот их эффект можно назвать поздним, поскольку указанные структуры начинают образовываться из промежуточных филаментов лишь тогда, когда микротрубочки уже полностью деполимеризованы.

Выраженным вторичным действием на цитоскелет и его организацию обладают многие химические соединения. Так, ингибиторы энергетического метаболизма, такие, как динитрофенол (ДНФ), приводят к разрушению волокон натяжения в течение примерно полутора часов [131]. Эти препараты препятствуют также образованию пучков микротрубочек и микрофиламентов под действием таксола и фаллоидина. Ингибиторы энергетического метаболизма подавляют, кроме того, деполимеризацию микротрубочек антитубулиновыми препаратами и вообще блокируют все требующие энергии стадии реорганизации цитоскелета. Неожиданным является то, что ингибиторы синтеза белка вызывают формирование околядерной виментиновой структуры [132]. Всякий агент, подавляющий белковый синтез (непосредственно или подобно интерферону или тепловому шоку), может при-

водить к перестройкам цитоскелета. Циклический АМР и сходные с ним препараты, активируя сАМР-зависимую протеинкиназу, влияют на фосфорилирование легких цепей миозина в мышечных клетках и фосфорилирование белков, ассоциированных с микротрубочками. сАМР может также влиять на фосфорилирование десмина в мышечных клетках [133]. Известно несколько кальмодулин-связывающих цитоскелетных белков, в том числе спектрин; следовательно, антикальмодулиновые соединения также могут действовать на цитоскелет. Так, вызываемая кальцием разборка микротрубочек в изолированном цитоскелете подавляется ингибиторами кальмодулина. Такая, вероятно, опосредуемая кальмодулином деполимеризация микротрубочек предотвращается белками, ассоциированными с микротрубочками. Бутират натрия, агент, используемый для ингибирования деацетилирования гистонов, также обладает разнообразным действием на цитоскелет; некоторые из вызываемых им эффектов проявляются в течение нескольких часов [134]. Обусловлено ли действие бутирата натрия ингибированием цитоскелетной деацетилазы или замещением каким-то образом ацетильных групп, неизвестно. Очевидно, что такие препараты, как веропамил, который подавляет накопление кальция клетками, могут вызывать самые разнообразные изменения цитоскелета.

Наконец, как это станет ясно позднее, ни одна из трех основных фибриллярных систем не является полностью независимой от двух других. Таким образом, поздние эффекты любого препарата могут быть непрямыми и опосредоваться не той фибриллярной системой, на которую они действуют непосредственно.

4.2. Регуляция формы и движения клетки

Для того чтобы дать полное описание всех типов формы и движения эукариотических клеток, потребовалась бы не одна книга. Некоторые важные моменты, однако, становятся ясны уже при рассмотрении трех основных типов клеточного движения. Анализ этих типов движения позволит понять также, каким образом форма клетки определяется характером ее движения.

Многие клетки способны плыть. Этот тип движения осуществляется с помощью жгутиков и ресничек — выступающих наружу придатков клетки, содержащих аксонему. Аксонема состоит из микротрубочек, организованных в так называемую структуру «9+2». Аксонема типа «9+2» широко распространена у эукариот, ее морфология высококонсервативна. Однако, несмотря на сходство ультраструктуры аксонем, жгутики и реснички разных организмов могут различаться по характеру осуществляемого ими движения, который определяется вспомогательными белками аксонем. Одни клетки, например *Chlamydomonas*, плывут «брассом»: во время рабочего хода почти прямой жгутик ударяет назад, а во время обратного — он изгибается так, чтобы минимизировать его поверхность, взаимодействующую с окружающей жидкостью. Другие клетки бьют жгутиками позади себя, толкая таким образом себя вперед. Наконец, у третьих имеются многочисленные короткие реснички, с помощью которых клетки могут плыть или, используя эти реснички как «ноги», передвигаться по поверхности. Во всех этих случаях движущая сила генерируется АТФазой динеином, который может обратимо образовывать поперечные мостики между наружными дублетами микротрубочек в аксонеме. Характер проявления этой силы определяется вспомогательными белками аксонемы: динеин обеспечивает скольжение одних дублетов вдоль других, а вспомогательные белки налагают ограничения на геометрию системы [135].

Форма большинства плавающих клеток определяется микротрубочками, расположенными обычно субкортикально, на небольшом расстоянии от клеточной мембраны. Такая подмембранная сеть микротрубочек расходится, как правило, от одной точки, например от пары базальных телец. В настоящее время, однако, точный механизм возникновения формы клеток, которые могут, например, быть асимметричными или представлять собой тела вращения, все еще не совсем понятен.

Для многих клеток, таких, как амёбы и макрофаги, характерно амёбоидное движение. В цитоплазме амёбы можно выделить несколько разных областей (вид амёбы сбоку показан на рис. 4.1). Эктоплазма — перифериче-



Рис. 4.1

ская часть цитоплазмы — лежит непосредственно под клеточной мембраной. Внутри расположена эндоплазма, которая является вязкоупругой и обладает двойным лучепреломлением. В передней части клетки имеется псевдоподия. Эндоплазма в этой части клетки превращается в эктоплазму — вероятно, в результате сокращения: эндоплазма и эктоплазма образуют здесь, по-видимому, один общий, непрерывный гель, и когда на периферии фронтальной эктоплазмы происходит сокращение, эндоплазма втягивается в нее. Прямые наблюдения подтверждают вязкоупругость эктоплазмы и эндоплазмы [136, 137]. Низкой вязкостью характеризуются в амёбной клетке лишь пограничная зона между экто- и эндоплазмой и небольшой район в хвостовой части, где превращение эктоплазмы в эндоплазму сопровождается кратковременным разжижением эктоплазматического материала.

Эти процессы, по-видимому, регулируются в основном путем изменения концентраций свободного кальция и АТФ. В тех областях, где есть АТФ и большое количество кальция, происходит сокращение, а там, где много АТФ, но мало кальция, наблюдается релаксация; внутри эндоплазмы, вероятно, имеется ограниченное количество кальция и АТФ [137]. Благодаря такой региональной активности амёбная клетка может направленно перемещаться, при условии что определенные ее части прикреплены к субстрату. Без прикрепления клетка только колеблется и меняет форму, а направленного движения не происходит.

В движении рассматриваемого типа не принимают участия микротрубочки; многие амёбoidные клетки, по-видимому, нечувствительны к колхицину [138]. Форма амёбoidной клетки — результат локальной сократительной активности. Амёбoidное движение чувствительно к цитохалазину В. Движение макрофагов, например, цитохалазин В подавляет в концентрации всего лишь 10^{-7} М [139]. Ингибирование движения клеток цитохалазин вызывает гораздо быстрее, чем уменьшение средней длины микрофиламентов *in vitro*. Ингибирующее действие цитохалазинов на амёбoidное движение объясняется, вероятно, тем, что они конкурируют с определенными клеточными белками за связывание с быстро растущим концом микрофиламентов.

Движение амёбoidных клеток регулируется, по-видимому, клеточной мембраной. У лейкоцитов наиболее чувствителен к хемотаксическим факторам ведущий край; клетки неуклонно движутся по направлению к хемотаксическим сигналам. Для такого движения не требуется участия ядра или микротрубочек [140, 141]. Энуклеированные фрагменты лейкоцитов, не содержащие ни ядра, ни центриолей, ни микротрубочек, сохраняют способность к хемотаксису. Микротрубочки в интерфазных лейкоцитах служат для фиксации положения и ориентации различных клеточных структур, таких, как ядро или цитоплазматические гранулы.

Третий основной тип движения клеток можно было бы назвать зависящим от микротрубочек или фибробластoidным движением. Если понаблюдать за способной к такому движению клеткой после митоза или пересева в культуре (в процессе этих событий клетки принимают сферическую форму), то можно увидеть, как она проходит три стадии: стадию начального распластывания, стадию поляризации и стадию направленного движения. Порядок стадий может быть, по-видимому, только таким; клетка, неспособная распластываться, не может и поляризоваться, а клетка, которая не поляризуется, не может и перемещаться [142].

Строение фибробластов и эпителиальных клеток во время распластывания было уже нами рассмотрено выше. У распластывающейся клетки имеются филоподии,

складки клеточного края, выпячивания поверхности, и все эти образования могут прикрепляться к субстрату или другим клеткам и генерировать силу. Если происходит прикрепление к субстрату, клетка через сколько-то минут полностью расплывается. А если клетка контактирует с незакрепленными частицами, то она «очищает» пространство вокруг себя. Этот процесс может протекать лишь в среде с K^+ , Na^+ , Cl^- , а также Mg^{2+} или Ca^{2+} при нейтральном pH; кроме того, он требует присутствия источников энергии. Какие из трех указанных выше образований будут наблюдаться на клеточной поверхности, зависит от условий промывки и пересева клеток. Все три типа образований, а также процесс очистки пространства вокруг клетки от частиц чувствительны к цитохалазину В в концентрации 1 мкг/мл и нечувствительны к ингибиторам микротрубочек. Такой характер чувствительности к различным препаратам не вызывает удивления, так как эти три типа образований содержат микрофиламенты, но не содержат микротрубочек [143].

Клетки, очищающие субстрат вокруг себя, имеют форму круга. Для того чтобы клетка перестала быть круглой, должен начаться новый процесс — поляризация. Этот процесс подавляется ингибиторами сборки микротрубочек; поляризованная клетка в присутствии таких ингибиторов вновь округляется. Обработка клеток колхицином для предотвращения их поляризации вызывает еще один эффект: виментиновые и десминовые филаменты в них медленно образуют плотную, охватывающую ядро структуру. Когда образование такой структуры индуцируется антителами против промежуточных филаментов, клетки не деполаризуются [144]. Как и следовало ожидать, центр организации микротрубочек (ЦОМТ) ориентируется в клетке в направлении ее движения. При движении сразу многих клеток в «рану», сделанную в плотном монослое в культуре, видно, что ЦОМТ располагается в них ближе к ведущему краю. Как показывают опыты с антицитоскелетными агентами, правильное положение ЦОМТ является необходимым условием клеточного движения. При подавлении движения клеток цитохалазином В ориентация ЦОМТ в них

изменяется; с другой стороны, клетки, в которых переориентация ЦОМТ блокирована колцемидом, не движутся [145].

Как регулируется зависящий от микротрубочек тип движения, пока еще не совсем ясно, однако некоторые уже известные взаимосвязи представляются весьма существенными. Перемещение многих клеток легко может быть прослежено на субстрате, покрытом частицами золота: на таком субстрате движущиеся клетки оставляют за собой «дорожки». С помощью этого метода было показано, что основные актиновые пучки располагаются в клетке параллельно ее движению. В направлении движения ориентированы также ЦОМТ и первичная ресничка (если она есть в данной клетке) [46]. Хотя ориентация волокон натяжения согласуется с направлением движения, их количество в клетке обратно пропорционально скорости движения.

Некоторые особенности движения клеток могут быть объяснены лишь с помощью достаточно полной модели. Каждой линии клеток присущ свой характер движения (средняя скорость, средняя частота поворотов); вместе с тем ни у одной клеточной линии движение не является строго детерминированным [147]. Сестринские клетки, а также дочерние и родительские клетки нередко движутся сходным образом. Примерно в 60% случаев «дорожки», оставляемые сестринскими клетками линии ЗТЗ, идентичны или представляют собой зеркальное отражение друг друга. Наконец, когда движущаяся клетка сталкивается с другой клеткой и затем начинает двигаться от нее, новое направление движения часто симметрично прежнему.

Судя по всему, некоторые характеристики движения клетки не меняются даже после митоза, во время которого она округляется, тогда как ряд других характеристик движения определяется взаимодействием клетки с внешней средой. Некоторые существенные факторы внешней среды уже идентифицированы. Взаимодействие фибробластоидных клеток с субстратом, особенно с коллагеном, опосредуется фибронектином. Добавление этого белка в культуральную среду стимулирует распластывание трансформированных клеток, а также подвиж-

ность и трансформированных, и нормальных клеток [148]. Другой важный фактор — концентрация кальция: для подвижности большинства исследованных клеток присутствие кальция во внешней среде совершенно необходимо [149]. Какова роль кальция, неясно, поскольку филоподии и складки клеточного края в его отсутствие все-таки сохраняют подвижность.

Один из подходов к изучению регуляции клеточного движения состоит в том, чтобы удалять из клетки некоторые структуры и наблюдать затем, продолжают ли двигаться остальные. И микротрубочки, и микрофиламенты необходимы для зависящего от микротрубочек типа движения. Эффективный способ удаления промежуточных филаментов из цитоплазмы некоторых клеток — микроинъекция антител против виментина. Виментиновые филаменты образуют при этом окологерную структуру, сохраняющуюся более 24 часов. Тем не менее клетка не теряет ни нормальной формы, ни способности двигаться по субстрату, клеточные органеллы остаются на своих местах, и по-прежнему могут происходить митоз и цитокинез [144]. Неизвестно, сходны ли окологерные виментиновые структуры в сестринских клетках. Многие из перечисленных выше функций не требуют присутствия ядра. Фибробластоидные и эпителиальные клетки, энуклеированные с помощью цитохалазина, прикрепляются к субстрату, распластываются, приобретают форму, характерную для данной клеточной линии, осуществляют пиноцитоз и нормально движутся, причем у них, как и у интактных клеток, наблюдается явление контактного торможения движения [150]. Так же как и для клеток с окологерной виментиновой структурой, для энуклеированных клеток неизвестно, сохраняется ли у них сходство между «сестрами». Степень изъятия клеточных структур, необходимая для того, чтобы существенно ограничить разнообразие форм двигательной активности клеток и клеточных фрагментов, достойна удивления. Избирательное разрушение компонентов клетки цитохалазином позволяет получить небольшие клеточные фрагменты (от одного до нескольких микрон в поперечнике), называемые микропластами. Микропластам свойственно в высшей степени стереотипное двига-

тельное поведение; они образуют складки клеточного края, или выпячивания поверхности, или филоподии, и все это повторяется в течение нескольких часов без изменения. Отсюда следует, что для координированного поведения клетки необходимо нечто, осуществляющее интеграцию различных форм движения.

Описанный характер клеточной подвижности и изменения клеточной формы свойственны не только культивируемым клеткам. Изучение эмбрионов показало, что у клеток *in situ* происходят во время движения аналогичные изменения формы и что клеточное движение в культуре во многом отражает поведение клеток в естественных условиях. Предполагается, что легко воспроизводимое в культуре движение клеток в «адгезивном градиенте», т. е. в условиях возрастающей по мере перемещения клетки частоты ее прикрепления, играет существенную роль в морфогенезе эмбриона [151]. Если это действительно так, то клеточную подвижность и ее регуляцию следует отнести к важнейшим из факторов, определяющих процесс развития у животных.

Форма клеток, осуществляющих движение рассматриваемого типа, не является ни столь детерминированной, как форма свободно плавающих клеток, ни столь динамичной, как у амёбодных клеток. Различные системы филаментов находятся в этих клетках в непрерывном взаимодействии друг с другом и генерируют и их движение, и — в каждый данный момент — их форму. Взаимодействие между системами филаментов обнаруживается при ультраструктурных исследованиях. Как показывают эти исследования, все три основных типа филаментов контактируют друг с другом [64]. На существование в клетке интеграции на структурном уровне указывает также координированность ее поведения. В тот момент, когда тянущийся сзади узкий «хвост» движущейся клетки отрывается от поверхности субстрата, усиливается двигательная активность складок ее переднего края. В процессе укорочения «хвоста» можно выделить два компонента: во-первых, быстрый, не зависящий от источников энергии и, вероятно, эластический, во-вторых, медленный, требующий энергии и, по-видимому, являющийся сократительным.

В некоторых типах клеток взаимодействие между фибриллярными системами особенно доступно для экспериментального изучения. От тела клеток нейробласты отходят ветвящиеся нейриты. Процесс образования нейритов после митоза блокируется как нокодазолом, так и цитохалазином, из чего следует, что в этом процессе участвуют и микротрубочки, и микрофиламенты. Роль микрофиламентов в образовании нейритов может состоять в обеспечении их подвижности, судя по тому что при обработке клеток цитохалазином ретракции уже сформировавшихся нейритов не происходит. Нокодазол, напротив, вызывает их ретракцию. После вытягивания нейритов клетка сохраняет память о своей прежней форме: удаление ингибитора приводит к ее восстановлению. Процесс ретракции нейритов является кооперативным; если клетку обрабатывают одновременно нокодазолом и цитохалазином, нейриты не вытягиваются. При этом в них сохраняются промежуточные филаменты, которые во время ретракции (если затем ее все же вызвать) перемещаются к центру клетки [152]. Можно предположить, что перераспределение промежуточных филаментов, индуцируемое ингибиторами микротрубочек, зависит от взаимодействия промежуточных филаментов с микрофиламентами. Микротрубочки не способны поддерживать рост нейритов в отсутствие микрофиламентов; более того, без интактных микрофиламентов разрушение микротрубочек не вызывает ретракции. Промежуточные филаменты, судя по всему, взаимодействуют и с микротрубочками, и с микрофиламентами. Аналогичные взаимосвязи между этими тремя фибриллярными системами выявляются и во многих других типах клеток.

Для некоторых типов клеток удастся установить, какой вклад вносит в процесс генерации клеточной формы какая-либо одна система филаментов. Когда форма тромбоцитов подвергается изменениям, описанным выше, изменяются также локализация взаимодействующих с актином белков и связь актина с цитоскелетом. После активации тромбоцитов актин обнаруживается в составе цитоскелета вместе с миозином или актин-связывающим белком. Судя по результатам морфологических исследований, миозин и актин-связывающие белки располага-

ются в разных районах тромбоцита, и разные ингибиторы влияют на их локализацию по-разному. Если тромбоциты перед активацией их тромбином обрабатывают цитохалазином, гель из миозина и актина образуется в них нормально, однако актин-связывающий белок в состав цитоскелета не входит и филоподии не образуются. Напротив, при активации тромбоцитов форболмиристат-ацетатом образование филоподий происходит, но цитоскелет не содержит миозина. Хотя отдельные части тромбоцита различаются в функциональном отношении, в норме компоненты актиновой системы ведут себя при его активации согласованно [153].

4.3. Взаимодействие цитоскелета с плазматической мембраной и внеклеточным матриксом

Цитоскелет образует многочисленные контакты с клеточной мембраной; предполагается, что с цитоскелетными элементами взаимодействуют определенные мембранные белки. Согласно простейшей модели строения мембраны, в липидном бислое плавают мембранные белки — подобно айсбергам в липидном море. Если бы такая модель соответствовала действительности, подвижность липидов и белков можно было бы предсказать с помощью физической химии. Изучение клеток показывает, однако, что только поведение липидов отвечает предсказаниям. Существенная доля (10—80%) мембранных белков вообще не обладает латеральной подвижностью, а те белки, которые все-таки движутся, делают это в 10—100 раз медленнее, чем предсказано. Латеральная подвижность мембранных белков усиливается под действием факторов, нарушающих связь цитоскелета с плазматической мембраной, из чего следует, что многие мембранные белки взаимодействуют с цитоскелетом — либо непосредственно, либо через другие белки мембраны [154]. Характер взаимодействия мембраны с цитоскелетом может изменяться во время развития организма. В мышечных клетках на самых ранних стадиях развития холинорецепторы движутся свободно. Позднее доля неподвижных белков увеличивается за счет обра-

зования небольших скоплений или крупных кластеров. Полностью подвижная фракция легко экстрагируется детергентом, тогда как фракция неподвижных белков остается связанной с цитоскелетом даже после удаления растворимых белков и липидов [155].

Упорядоченное взаимодействие с определенными участками мембраны обнаруживают как микрофиламенты, так и микротрубочки. Большинство актиновых филаментов присоединяется к мембране своим быстро растущим концом. Взаимодействие микротрубочек с мембраной наблюдается у цитотоксических лимфоцитов. Эти «клетки-убийцы» ориентируются по отношению к мишени так, чтобы их ЦОМТ были обращены к месту контакта; в то же время согласованности в расположении ЦОМТ и таких мембранных структур, как кепы, не наблюдается [156].

В клетках может возникать и поддерживаться асимметричное распределение многих компонентов мембраны. Примером может служить образование кепов, которое изучено уже в деталях. Многие белки в отсутствие лиганда распределены в мембране дисперсно, после связывания лиганда они перераспределяются. Если исходно симметричную клетку обработать лигандом при 4°C, равномерность распределения рецепторов сохраняется. Если же затем поднять температуру до 20 или 37°C, рецепторы начнут объединяться в небольшие агрегаты. Этого не происходит у клеток в митозе. Образование агрегатов рецепторов может быть предотвращено высокими дозами мультивалентных лектинов (например, конканавалина А), связывающихся с белками клеточной мембраны [157]. В зависимости от типа рецептора и лиганда дальнейшая судьба агрегатов может быть двойкой. Кепы, индуцируемые некоторыми мультивалентными лигандами, образуются пассивно; они могут возникать в присутствии ингибиторов энергетического обмена и в отсутствие микротрубочек и микрофиламентов. Процесс формирования таких кепов занимает от получаса до часа; клетки после их образования сохраняют симметричную форму.

Быстрое образование кепов из комплексов лиганд — рецептор требует энергии и присутствия кальция во

внеклеточной среде. Клетки с такими кепами уже не остаются сферическими и симметричными. Под тем местом, где скапливаются комплексы лиганд—рецептор, располагаются актин, миозин, кальмодулин, α -актинин и киназа легкой цепи миозина [158]. Миозин в этом районе уже фосфорилирован, т. е. в большей степени готов к участию в сокращении. Цитохалазины подавляют быстрое образование кепов, а ингибиторы микротрубочек нет.

Простое объяснение описанных явлений состоит в том, что в клетках, активно образующих кепы, комплексы лиганд—рецептор втягиваются с помощью сократительного аппарата в район кепы. В других асимметричных клетках, например, во время фагоцитоза, хемотаксиса или цитотоксического действия под агрегатами комплексов лиганд—рецептор видны плотные скопления микрофиламентов. Образование таких скоплений, впрочем, само по себе еще не является достаточным условием для агрегации комплексов лиганд—рецептор: в передней части клеток во время хемотаксиса плотность микрофиламентов тоже очень высока, но комплексы лиганд—рецептор там не собираются вместе. Для объяснения всего этого можно предположить, во-первых, что на поверхности клетки возникает и движется, как волна, локальная деформация, в районе которой мембрана отличается по своим характеристикам, таким, как вязкость и поверхностное натяжение, от остальной клеточной мембраны, и, во-вторых, что разные мембранные белки реагируют на такую волну по-разному: на одни она никак не влияет, а другие захватываются волной и движутся вместе с ней по направлению к областям скопления подмембранных микрофиламентов, где затем связываются с этими филаментами. Волны действительно видны на поверхности клеток. Они возникают, вероятно, в результате генерируемого микрофиламентами сокращения. Высказанные предположения способны объяснить, почему процесс перегруппировки белков в мембране чувствителен к цитохалазинам и ингибиторам энергетического обмена [159]. Они указывают также на возможный механизм перегруппировки липидных компонентов мембраны.

Какая бы из предлагаемых моделей ни оказалась верна, ясно, что распределение белков в мембране может в результате связывания с лигандом изменяться и что это изменение осуществляется цитоскелетом посредством некоего механизма, требующего энергии. Ясно также, что такое перераспределение в мембране происходит координированно: несколько разных компонентов мембраны могут изменять свое положение в результате взаимодействий, в которых участвует лишь один из них. Наконец, диапазон возможных перестроек мембраны зависит от состояния клетки, он существенно ограничен во время митотического деления клеток, а также в клетках, у которых подвижность значительной доли мембранных белков подавлена [157, 159].

Движение на клеточной поверхности может служить различным целям. Осуществляемое в результате такого движения перераспределение компонентов мембраны может изменять сродство поверхностных рецепторов клетки к соответствующим лигандам. А вызываемая движением на поверхности перестройка цитоскелета может выполнять функции сигнала, идущего к внутренним областям клетки. Перегруппировка компонентов мембраны является необходимым первым шагом в процессах интернализации. Предполагается, что она играет роль и в прикреплении внешних объектов к клеточной поверхности. Кроме того, такая перегруппировка, вероятно, отвечает за движение частиц по поверхности клетки перед их интернализацией. Многие из указанных функций существенны для движения клеток во время эмбриогенеза и заживления ран; возможно, они имеют также отношение к регуляции экспрессии генов внеклеточным матриксом. Контакты клеток друг с другом и с внеклеточным материалом играют важную роль в эмбриональном развитии. Взаимодействие жесткого внешнего субстрата с белками клеточной поверхности влияет на внутреннюю организацию клеток. Многие типы клеток способны правильно дифференцироваться лишь в присутствии такого внеклеточного матрикса, с которым им свойственно контактировать в нормальных условиях [160]. Возможность продолжительной экспрессии специфических для дифференцирующихся клеток продуктов

зависит, по-видимому, от их контакта со специфическим внеклеточным матриксом. Механизм такого влияния матрикса на клетку пока непонятен. Некоторые аспекты взаимосвязи между экспрессией генов и цитоскелетом будут подробно обсуждены далее.

4.4. Внутриклеточное движение и транцитоз

Большинство внутриклеточных структур характеризуется определенным положением и определенными путями перемещения в клетке. Как ни велико разнообразие внутриклеточных движений, все они могут быть разделены на две категории. Центральный район клеток, содержащий микротрубочки и промежуточные филаменты, содержит также разнообразные клеточные органеллы. Некоторые из этих органелл, такие, как аппарат Гольджи или липидные капельки, занимают фиксированное положение, хотя время от времени оно может специфическим образом изменяться. Эндоплазматический ретикулум, лизосомы и митохондрии, напротив, довольно подвижны и легко деформируемы. Подвижность эндоплазматического ретикулума ограничена, тогда как лизосомы и митохондрии могут совершать в клетке разнообразные движения. С помощью специальной высококонтрастной микроскопии в центральном районе клетки выявляются также движущиеся в нем клеточные органеллы небольшого размера [161].

Движение органелл в центральной части клетки зависит от присутствия интактных микротрубочек, но обычно устойчиво к действию цитохалазинов. Органеллы движутся независимо друг от друга; две частицы, расположенные рядом, совершенно не обязательно совершают движение одного и того же типа [162]. Движение не подавляется ванадатом, когда его вводят в клетки путем микроинъекции [163]; в то же время ванадат подавляет его в клетках, мембрана которых сделана проницаемой [164]. Из этого следует, что механохимические белки, участвующие во внутриклеточном движении, не идентичны динеину жгутиков, но, возможно, сходны с ним. Движение органелл происходит прерыви-

сто: в течение короткого времени органелла движется, а затем резко останавливается. Такое прерывистое, скачкообразное движение можно отличить от броуновского по его кинетике [165]. Существенно, что положение частиц, не участвующих в скачкообразном движении, остается фиксированным. Движущиеся частицы нередко контактируют с микротрубочками, что указывает на прямое участие последних в движении. Единственный способ подавить скачкообразное движение в центральной части клетки — это поместить клетку в гипертоническую среду [162]; формирование складок клеточного края при этом ингибируется. Скачкообразное движение имеет место в растениях во время образования клеточной пластинки [166].

Наблюдение за скачкообразным движением позволяет выявить в нем эластический компонент. Индивидуальная частица после остановки начинает двигаться вперед намного быстрее, как если бы она подтягивалась сокращающимся матриксом [165]. Этот эластический компонент наиболее заметен в системах, в которых цитоплазматические частицы совершают циклическое движение [167]. В хроматофорах имеются пигментные частицы различного цвета, распределение которых контролируется клеткой. Оно изменяется путем агрегации пигментных гранул в центре клетки или диспергирования их по всему ее внутреннему пространству. Движение от центра к периферии является скачкообразным и зависит от источников энергии. Соответствующие стимулы могут вызвать согласованное движение гранул в направлении к центру, и такое движение не зависит от энергии. На микрофотографиях, полученных с помощью высоковольтного электронного микроскопа, в некоторых хроматофорах хорошо видна связь между пигментными гранулами и цитоскелетом. Гранулы контактируют с нерегулярной сетью, построенной из элементов различного размера; эти элементы называются микротрабекулами. Способность хроматофоров осуществлять всеохватывающее перемещение пигментных гранул в центральном направлении указывает на то, что эластические структуры в них высокоспециализированы и развиты сильнее, чем в других клетках.

Аналогичное внутриклеточное движение имеет место у самых разных типов клеток, включая клетки растений, протисты и клетки животных. Моделью для изучения движения этого типа *in vitro* может служить аксоплазма, выдавленная из аксона в правильно подобранный буферный раствор. Аксоплазматическая система может быть использована также для исследования многих свойств кортикального движения. Структуры, движущиеся в кортикальной, богатой микрофиламентами области, имеют обычно небольшой размер; в их число входят покрытые клатрином пузырьки, секреторные пузырьки и синаптические пузырьки. В кортикальной области все видимые пузырьки либо движутся, либо занимают фиксированное положение. Движение в кортикальной и центральной областях требует присутствия источника энергии, но не зависит от кальция. Кортикальное движение, как и центральное, включает в себя эластичский компонент; несмотря на то, что в кортикальной области основной фибриллярной структурой служат микрофиламенты, движение в ней устойчиво к действию цитохалазинов. Кортикальное движение является в основном однонаправленным и непрерывным — без остановок, наблюдаемых при движении в центральном районе. Поскольку это движение может происходить и после удаления плазматической мембраны, оно не зависит, очевидно, ни от мембранных белков, ни от потенциала действия. Однако, как и для перемещения в центральном районе, для него необходимо присутствие ориентированных филаментов; так, если структура аксоплазмы нарушена путем перемешивания, движение в ней становится неупорядоченным [168].

Определенные типы внутриклеточного движения включают в себя перемещение и между центральной и кортикальной областями, и через клеточную мембрану. Существуют две формы такого движения. Движение наружу происходит при экзоцитозе, и, в частности, при секреции. Секреция протекает в несколько стадий: она начинается с синтеза белков на грубом эндоплазматическом ретикулуме, затем они переходят с помощью аппарата Гольджи в секреторные гранулы, и, наконец, гранулы перемещаются к клеточной поверхности. Вы-

свобождение материала на поверхности может либо протекать непрерывно, либо происходить под действием определенных стимулов. Движение материала от грубого эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи определяется, по-видимому, микротрубочками, которые нужны для обеспечения координированности транспорта [169]. То, что микротрубочки действительно взаимодействуют с грубым эндоплазматическим ретикулумом, подтверждается образованием больших комплексов микротрубочек в ретикулуме под действием таксола [170]. Эти комплексы представляют собой, вероятно, скопление избыточных микротрубочек, индуцируемых таксолом; между микротрубочками в этих скоплениях видны поперечные мостики, аналогичные, вероятно, тем, которые присутствуют, хотя и в меньшем количестве, в клетках, не обработанных таксолом. Заключительные стадии секреции, происходящей под действием специфических стимулов, по-видимому, не зависят от микротрубочек. На этих стадиях пузырьки, расположенные в периферической цитоплазме, ассоциированы в основном с микрофиламентами, роль которых, возможно, состоит в том, чтобы препятствовать взаимодействию секреторных пузырьков с клеточной мембраной; на это указывает то, что цитохалазины в ряде случаев стимулируют секрецию [171].

Движение снаружи ко внутренним областям клетки может происходить тремя путями. Во время фагоцитоза клетка охватывает объект расплывающейся вокруг него мембраной [159]. Такое обволакивание объекта протекает обычно с участием микрофиламентов. Когда мембрана полностью охватит фагоцитируемую частицу, происходит слияние ее краев. Процесс фагоцитоза чувствителен к цитохалазину. При пиноцитозе образуются пузырьки диаметром 200—700 нм, в которые захватывается внеклеточная среда. Интенсивность пиноцитоза зависит от типа клетки. Пиноцитоз обеспечивает поступление питательных веществ и сигнальных молекул внутрь клетки. Как и фагоцитоз, он чувствителен к цитохалазинам [171]. Третий тип интернализации мы будем называть эндоцитозом. Это название использовалось нередко для всех трех типов движения внутрь клетки, но в на-

стоящее время так называют обычно лишь один из них, при котором образуются пузырьки диаметром 60—70 нм, покрытые клатрином. Эти пузырьки транспортируют интернализированный материал к лизосомам; по крайней мере начальная стадия такой интернализации устойчива к действию цитохалазинов, но пока неясно, влияют ли цитохалазины на перенос материала к лизосомам [171]. Все три описанных типа движения протекают обычно циклически и могут происходить с большой частотой. Таким образом, клетка имеет возможность возвращать интернализированные части мембраны назад к клеточной поверхности.

Наконец, последний тип внутриклеточного движения — это перемещение самих цитоскелетных элементов. В нейронах цитоскелет представляет собой вытянутую, линейную структуру, что делает возможным определение скорости его движения. В этих клетках наблюдаются две волны компонентов цитоскелета, мигрирующих по направлению от тела клетки; эти две волны хорошо различимы и носят название «медленного компонента *a*» и «медленного компонента *b*». С медленным компонентом *a* транспортируются микротрубочки и нейрофиламенты, а с компонентом *b* — актин и другие белки. Оба компонента транспортируют и белки, являющиеся, вероятно, цитоскелетными, и белки, которые считаются растворимыми, например енолазу и креатинкиназу [22]. Тот факт, что указанные ферменты переносятся той же транспортной системой, что и цитоскелет, указывает на возможность связи ферментов с элементами цитоскелета [22].

Как же осуществляется регуляция внутриклеточного движения? Интерфазные микротрубочки имеют в основном одинаковую ориентацию, их быстро растущий конец направлен в сторону периферии клетки. Это исключает такие модели клеточного движения, в которых предполагается, что расположенные антипараллельно микротрубочки служат «рельсами» для движения в двух взаимно противоположных направлениях. Простейшее объяснение движения состоит, вероятно, в том, что движущиеся частицы могут как вступать, так и не вступать в контакт с системой микротрубочек, но всегда способны вза-

имодействовать с эластическими элементами, обнаруживаемыми между микротрубочками. Частицы, связанные с микротрубочками, будут двигаться по направлению к периферии, а частицы, не контактирующие с ними, будут либо оставаться неподвижными, либо втягиваться эластичными элементами назад, в центральные области цитоплазмы. К сожалению, до сих пор не предложено столь же простой модели для объяснения движения в кортикальной области клетки.

4.5. Митоз и сборка

Митоз — это, возможно, самая сложная загадка для тех, кто изучает пространственную организацию эукариотических клеток. За период всего в несколько минут в клетке происходит существенная реорганизация хромосомного материала и перемещение его в определенные точки внутриклеточного пространства. Скорость протекания митоза, его точность и, наконец, его важность в жизни клетки — все это привлекает к нему внимание исследователей. И те же самые черты митоза обуславливают, вероятно, трудность его изучения. У разных клеток митоз может принимать различные формы: разными могут быть скорость разделения хромосом, число и характер распределения микротрубочек, внутриклеточное расположение митотического веретена. Однако разумнее всего будет для начала предположить, что фундаментальные механизмы митоза если и не универсальны, то по крайней мере широко распространены. В самом деле, трудности изучения митоза достаточно велики и без того, чтобы останавливаться на многочисленных его особенностях у различных клеток.

В процессе митоза в клетке обычно происходит существенная перегруппировка ее элементов. Клетки в культуре могут округляться, почти полностью терять контакт с субстратом, лишаться волокон натяжения. Утрата волокон натяжения не является, по-видимому, результатом изменения фосфорилирования винкулина [172]. Во время митоза перестройке подвергается также система промежуточных филаментов. В некоторых клетках ви-

ментиновые филаменты формируют во время митоза структуру, окружающую ядерный материал; это сопровождается нередко усилением фосфорилирования виментина. Степень фосфорилированности виментина вновь снижается через 30 мин после начала распластывания клетки [173, 174]. По-другому происходит перестройка клеток, содержащих цитокератины. В некоторых из таких клеток цитокератины образуют тонкие протофиламенты или агрегаты, ассоциированные с цитоскелетом. В телофазе цитокератины вновь формируют пучки филаментов. Клетки по меньшей мере одного типа перестраивают аналогичным образом свои виментиновые филаменты. Таким образом, характер перестройки промежуточных филаментов зависит от типа клетки.

Самая сильная перестройка системы микротрубочек происходит в тех клетках, которые округляются в митозе. Развитая система микротрубочек разрушается в них, и вместо нее образуется состоящее из микротрубочек веретено деления. Веретено осуществляет разделение хромосом; объяснить его пространственную организацию и механические свойства с точки зрения биохимии крайне трудно [175—177].

В профазе хромосомы конденсируются и вовлекаются в скачкообразное движение в области между двумя центриолями и ассоциированным с ними материалом. Скачкообразное движение хромосом сопровождается аналогичным движением других частиц. Микротрубочки растут от полюсов митоза и имеют одинаковую полярность: с полюсами ассоциирован их медленно растущий конец, тогда как быстро растущий конец располагается дистально [178, 179]. Микротрубочки контактируют с кинетохорами хромосом. Лишь после того, как кинетохоры вступают в контакт с микротрубочками, идущими от обоих полюсов, хромосомы прекращают скачкообразное движение и становятся неподвижными. После фиксации таким способом положения всех хромосом из них образуется метафазная пластинка в экваториальной плоскости веретена. В это время другие частицы, присутствующие в данном районе, продолжают скачкообразное движение. Сразу после разделения сестринских хроматид начинаются два типа движения: 1) хромосомы:

приближаются к полюсам (анафаза А); 2) полюсы веретена удаляются друг от друга (анафаза В). Простой и ясной связи между этими формами анафазного движения нет; их регуляция осуществляется, вероятно, независимо. Анафазное движение продолжается до тех пор, пока хромосомы не достигнут полюсов; затем хромосомы собираются вместе и начинается формирование ядра.

Механика этого процесса остается загадочной. Скачкообразное движение хромосом в профазе не может осуществляться микротрубочками, которые в это время еще не контактируют с хромосомами. Более вероятно то, что скачкообразное движение хромосом опосредуется ядерным матриксом. Стабилизация в метафазе указывает, очевидно, на существование в это время равновесия действующих сил, т. е. что противоположные полюсы веретена оказывают одинаковое механическое воздействие на каждую отдельную хромосому. Интересно, что если с помощью облучения лазером нарушить связь метафазной хромосомы с одним из полюсов, она немедленно начнет двигаться к другому полюсу, к которому она по-прежнему прикреплена. Предлагаемые модели хромосомного движения в анафазе должны как минимум давать объяснение, во-первых, способности хромосом оставаться неподвижными в ожидании анафазы и, во-вторых, одинаковой полярности микротрубочек в полуверетене. Описанные результаты были получены сравнительно недавно, их объяснение представляет основную трудность для ряда ранних теорий анафазного движения. Простейшая модель, согласующаяся с этими результатами, предполагает, что механохимическим элементом, функционирующим в анафазе, является кинетохор, перемещающийся вдоль микротрубочек [180].

Некоторые из ранее предложенных моделей могут быть с большей или меньшей определенностью отвергнуты из-за того, что митотическое веретено не чувствительно ни к цитохалазину, ни к антимиозиновым антителам, ни к препаратам, избирательно действующим на актин [175]. В настоящее время с большей или меньшей степенью уверенности можно отклонить также все модели, постулирующие антипараллельную ориентацию микротрубочек в веретене.



Рис. 4.2. Микрофотография цитоскелетной сети клетки PtK, (просвечивающая электронная микроскопия), демонстрирующая ядерный матрикс во время митоза.

Многие процессы, происходящие во время митоза, требуют энергии. Ингибиторы метаболизма останавливают скачкообразное движение в прометафазе. Расхождение полюсов веретена явно зависит от источников энергии как *in vivo*, так и *in vitro*. Сообщалось о том, что движение хромосом к полюсам в препарате лизированных клеток не требует энергии [181], но, возможно, движение в таком препарате осуществлялось лишь эластическими элементами, судя по тому что оно было более медленным, чем в живых клетках. Роль в веретене элементов цитоскелета, отличных от микротрубочек, в настоящее время только начинает осознаваться. Характер расположения небольших фибриллярных элементов веретена указывает на возможность их участия в хромосомном движении (рис. 4.2).

Форма клетки зависит от находящихся в данный момент в полимеризованном состоянии элементов цитоскелета. Существуют два экспериментальных подхода к исследованию сборки интерфазного цитоскелета, но каждый из них имеет свои ограничения. Один состоит в том, что в клетки вводится путем микроинъекции флуоресцентно меченный белок, способный участвовать в сборке цитоскелетных структур *in vitro* [182—186]. Внутриклеточная локализация этого белка изучается затем с помощью световой микроскопии. Структуры, идентифицированные таким образом, почти никогда не бывают артефактом, поскольку они выявляются также методом иммуофлуоресценции. Метод микроинъекций страдает некоторыми недостатками. С его помощью можно идентифицировать только такие цитоскелетные структуры, у которых происходит обмен мономерами с растворимой фазой. Стабильные структуры, у которых не происходит заметного обмена в течение нескольких часов, таким методом выявить нельзя. Метод микроинъекций не позволяет также различить процессы сборки и обмена. После инъекции сначала видна диффузная флуоресценция, которая затем локализуется в определенных точках; такая картина равно согласуется и с предположением о том, что происходит сборка структур, способных к обмену, и с предположением о том, что инъецированный белок связывается с ограниченным числом связывающих участков. Различать эти возможности позволяет изучение кинетики процесса. Еще один недостаток рассматриваемого метода состоит в том, что на флуоресцентной картине размеры структур кажутся увеличенными по сравнению с действительными. Относительно результатов, получаемых данным методом, заметим также следующее: 1) выявляемые им структуры, как правило, не являются артефактом; 2) скорость, с которой выявляются структуры в опыте, отличается от скорости их формирования в клетке; 3) в некоторых случаях наблюдаемая картина зависит от типа клеток [184]; 4) определенное для микротрубочек направление сборки согласуется с тем фактом, что их быстро растущий конец является дистальным; 5) наиболее подвижная форма актина, которую можно обнаружить в клетках

этим методом, имеет большие размеры, чем актиновые мономеры, что указывает на отсутствие в клетке (или присутствие очень небольшого количества) свободного G-актина [186] (указанная форма может представлять собой олигомеры актина или актин, ассоциированный со специфическими белками).

Другой метод, обладающий соответственно иными недостатками, состоит в мечении клеток *in vivo* [^{35}S] -метионином и последующем изучении белков с помощью радиоавтографии или биохимически. Значительная доля меченых цитоскелетных белков обнаруживается в составе цитоскелета в районе полирибосом; со временем расположение этих белков меняется, при условии что продолжается белковый синтез [65]. В крупных и симметричных клетках белки перемещаются в виде волны в направлении к центру аналогично медленному транспорту в аксоне [22]. С помощью мечения цитоскелета *in vitro* показано, что многие из белков связываются с ним нечувствительным к пурамицину образом еще до полного завершения трансляции [187]. Поскольку при применении этого метода клетки экстрагируют в течение нескольких минут, те цитоскелетные белки, обмен которых происходит быстрее, не будут обнаруживаться в соответствующих цитоскелетных структурах.

4.6. Цитоскелет и экспрессия генов

Между цитоскелетом и экспрессией генов взаимосвязь двоякая, синтез самих цитоскелетных белков в клетке также регулируется. В процессе эмбрионального развития происходит смена изоформ белков всех трех основных систем филаментов. Механизм регуляции спектра изоформ пока неясен.

Кратковременная, «текущая» регуляция генов цитоскелетных белков доступна экспериментальному изучению на культивируемых клетках. Свободный тубулин, вероятно, обменивается в клетке с полимерными структурами, и можно предположить, что активность его генов определяется уровнем свободного тубулина. Агенты, вызывающие увеличение концентрации свободного тубу-

лина, подавляют его синтез, а те агенты, которые переводят его в полимерное состояние (в микротрубочки или паракристаллы), синтез стимулируют [188, 189]. Изменение синтеза тубулина сопровождается изменением уровня мРНК, однако активность генов в ядре, как показали исследования, при этом не изменяется [190].

Экспрессия актиновых генов зависит от формы клетки. У клеток ЗТ6 в суспензии синтез белков подавляется, особенно сильно при этом снижается синтез актина. После возвращения клеток на субстрат в них восстанавливается нормальная интенсивность синтеза белков. На ранних стадиях распластывания наблюдается даже некоторое перепроизводство актина [191]. Изменение синтеза актина имеет место и при продолжительном действии на клетки цитохалазина D. Через сутки инкубации с цитохалазином возрастают как абсолютное содержание актина в клетке, так и относительная скорость синтеза актина. Этот эффект вызывается такими дозами цитохалазина, которые у распластаных и у суспендированных клеток индуцируют образование различных ветвящихся отростков [192].

Регуляцию уровня цитоскелетных белков в клетке можно изучать также, прослеживая судьбу этих белков после их синтеза. У мышечных клеток скорость кругооборота миофибриллярных белков обратно пропорциональна интенсивности сокращения. Клетки, сокращение которых подавлено, характеризуются более высокой скоростью кругооборота таких белков, как α -актинин, тропонин С, специфическая мышечная форма легкой цепи миозина и α - и β -тропомиозин. Отсутствие сократительной активности избирательно влияет на специфические мышечные белки и не влияет на виментин, десмин и немускульные β - и γ -актины. Изменение уровня мышечного белка в клетке может достигаться увеличением скорости его деградации без изменения экспрессии генов [193]. Для многих мышечных белков экспрессия изоформ прямо зависит от характера иннервации мышцы. На синтез по крайней мере некоторых белков промежуточных филаментов влияет также пространственная организация клетки. В суспендированных клетках синтез виментина почти полностью

подавлен, а после помещения клеток на субстрат он возвращается к нормальному уровню [194].

Изменения могут затрагивать одновременно две системы филаментов, причем эти изменения могут быть как одинаковыми, так и противоположными по направлению. Преадициты способны менять свою форму от фибробластической до почти сферической. Этот процесс сопровождается значительным снижением синтеза β - и γ -актина, виментина, α - и β -тубулина. Уменьшение скорости синтеза белков является результатом снижения уровня доступной для трансляции РНК. Координированные изменения экспрессии генов цитоскелетных белков характерны не только для многоклеточных организмов. Жгутиковая амёба *Naegleria* может превращаться из аморфной, перемещающейся по субстрату клетки в клетку с двумя жгутиками, имеющую обтекаемую форму. Это превращение сопровождается снижением скорости синтеза актина и увеличением скорости синтеза тубулина и других компонентов аксомеры [118].

Влияние цитоскелета на экспрессию различных генов может осуществляться непосредственно либо через несколько промежуточных процессов. И микрофиламенты, и микротрубочки влияют на реакцию клеток ЗТЗ на сигналы, инициирующие синтез ДНК. Способность клеток реагировать на сыворотку и пять других факторов роста обратимо подавляется низкими концентрациями дигидроцитохалазина В [195]. Этот препарат не снижает транспорта глюкозы или тимидина, так что вызываемое им подавление синтеза ДНК не является следствием дефицита питательных веществ. Микрофиламенты не влияют на инициацию синтеза ДНК у трансформированных клеток, судя по тому что два разных вызывающих трансформацию агента делают клетки нечувствительными к цитохалазину.

Изменение системы микротрубочек может влиять на скорость роста клеток, причем эффект зависит от состояния, в котором находятся клетки. При низкой плотности клеток в культуре агенты, вызывающие деполимеризацию микротрубочек, оказывают на клетки ингибирующее действие, тогда как при высокой плотности культуры они стимулируют синтез ДНК в клетках. Эффект, вызывае-

мый изменением системы микротрубочек, зависит также от типа клеток. Клетки линии ЗТЗ менее чувствительны к ингибиторам (при низкой плотности), чем эмбриональные клетки в первичной культуре. Стимуляция синтеза ДНК в плотной клеточной культуре подавляется таксом; таксол может предотвращать митогенное действие широкого круга стимулов [196].

Кроме описанных эффектов, связанных с определенными системами филаментов, возможны разнообразные изменения экспрессии, обусловленные изменением клеточной формы. Так, интенсивность митотического деления клеток в культуре коррелирует с их высотой. В плотном монослое, где клетки расположены намного более тесно, чем в редкой культуре, высокие клетки слабее реагируют на стимуляцию сывороткой и другими ростовыми факторами. Изменение высоты клеток может вызывать изменения и скорости размножения клеток, и их чувствительности к сыворотке [197].

У некоторых линий клеток влияние на экспрессию генов могут оказывать изменения клеточной формы, обусловленные изменением адгезивности клеток к субстрату. Так, в определенных условиях в хондроцитах начинается синтез специфических продуктов, хотя интенсивность синтеза белка в целом не изменяется [197]. Аналогично если заставить преадипоциты округиться, у них индуцируется дифференцировка. Наиболее сильный эффект, по-видимому, вызывает открепление клеток от субстрата. Взаимодополняющее влияние формы клеток и внеклеточной среды на экспрессию белков хорошо видно на примере клеток молочной железы. Эти клетки растут на поверхности или внутри коллагенового геля, который служит для них естественной внеклеточной средой. Форма клеток молочной железы коррелирует с характером их дифференцировки. Когда клетки растут на плоском субстрате, у них не происходит морфологической дифференцировки и они не вырабатывают белков молока. На флолирующем коллагеновом геле (отделенном от жесткой подложки) видны два типа клеток: кубоидные клетки, находящиеся в контакте с культуральной жидкостью и способные синтезировать липиды в ответ на пролактин, и другие, содержащие большое число микрофила-

ментов и напоминающие миоэпителиальные клетки молочной железы. Клетки, полностью погруженные в гель, формируют структуры, сходные с полыми протоками [198].

Диапазон взаимосвязей между цитоскелетом и экспрессией генов станет яснее при сравнении нормальных и трансформированных клеток. Однако сказанное выше уже показывает, что эти взаимосвязи имеют место все время и во всех клетках. Цитоскелет влияет на спектр, а в некоторых случаях и на чувствительность белков, расположенных на клеточной поверхности, включая рецепторы. С другой стороны, связь мембранных рецепторов с растворимыми факторами среды и взаимодействие мембранных белков с внеклеточным матриксом могут влиять на организацию цитоскелета. Таким образом, в принципе оказывается возможной обратная связь между цитоскелетом и внеклеточным пространством. Внеклеточный матрикс играет исключительно важную роль в экспрессии дифференцированного фенотипа. Как мы видели выше, на некоторые из регуляторных эффектов может непосредственно влиять конфигурация цитоскелета. Роль внеклеточного матрикса, возможно, заключается в изменении состояния цитоскелета, который в свою очередь прямо или через какие-то промежуточные процессы воздействует на экспрессию генов.

4.7. Трансформация

Хотя трансформация клеток представляет собой сложный процесс, некоторые соображения относительно нее все же могут быть высказаны. В доброкачественной опухоли строение клеток почти или совсем не изменено, а их взаимодействие с внеклеточным матриксом изменено очень мало. В злокачественной опухоли строение клеток существенно нарушается, так что связь опухолевых клеток с исходной для них тканью устанавливается нередко с трудом. Изменение опухолевой клетки может состоять в изменении именно ее организации, поскольку известно, что в опухолевых клетках сохраняются промежуточные филаменты того типа, который характерен

для исходной ткани. Опухолевые клетки способны к инвазии и просто «игнорируют» окружающий их внеклеточный матрикс. Это показывает, что матрикс для опухолевых клеток является не столь важным, ограничивающим их поведение фактором, как для нормальных. Заключительной стадией малигнизации является образование метастазов: клетки отрываются от исходной опухоли, распространяются по организму и формируют колонии в различных тканях.

Многочисленные аналогии с описанным поведением клеток в опухоли можно найти в поведении культивируемых клеток. Трансформация клеток в культуре может проявляться в продукции активатора плазминогена, снижении зависимости клеток от сыворотки или потере контактного торможения роста и движения. Последний феномен называют также ингибированием роста и движения, зависящим от плотности. Нормальная клетка при контакте с другой клеткой прекращает движение в прежнем направлении и начинает двигаться назад. Если непосредственно рядом с клеткой имеется так много других, что обратное движение невозможно, клетка округляется. При такой плотности клеток рост культуры нередко вообще прекращается. Трансформированная же клетка не только не поворачивает назад, наткнувшись на другую, но, напротив, проползает под или над ней, не меняя направления движения. Размножение трансформированных клеток менее чувствительно к локальной плотности культуры. Потеря зависимости от прикрепления к субстрату *in vitro* — свойство, которое сильнее всего сближает культивируемые клетки с опухолевыми клетками в организме. Клетки, растущие в суспензионной культуре, почти во всем сходны с клетками, образующими опухоли у животных. Перечисленными выше свойствами необязательно обладают все трансформированные клетки. Наиболее обычный порядок событий при опухолевой трансформации состоит в том, что сначала снижается зависимость клеток от сыворотки, а затем — зависимость от прикрепления к субстрату; путем соответствующего отбора можно, однако, получить клеточные линии, требующие для роста сыворотки, но не требующие прикрепления к субстрату [199].

Как в организме при переходе от доброкачественных опухолей к злокачественным мы наблюдаем значительные изменения в строении клеток, так и различные культивируемые клетки образуют ряд, в котором их строение прогрессивно нарушается, по мере того как изменяются их биохимические характеристики. При трансформации вирусом нормальных эмбриональных фибробластов мыши можно видеть, например, как клетка из хорошо распластанной и имеющей большое количество пучков филаментов превращается в более круглую, содержащую меньше волокон натяжения и характеризующуюся менее упорядоченными взаимоотношениями с другими клетками. Чем больше степень трансформации клетки, тем меньше влияет на биохимические процессы в ней отсутствие прикрепления к субстрату. Так, у нормальных эмбриональных фибробластов при переносе их в суспензию синтез ДНК, РНК и белка резко подавляется; на промежуточных стадиях трансформации в суспензированных клетках некоторые нормальные процессы (например, синтез гетерогенной ядерной РНК) продолжают, а трансформированные вирусом клетки способны и синтезировать белки, и делиться в суспензии [200]. В тех клетках, в которых при помещении их в суспензионную культуру процессы синтеза прекратились, синтез белка возобновляется при возвращении их на субстрат сразу после прикрепления, а синтез РНК и ДНК начинается лишь при распластывании; таким образом, различные процессы, протекающие в клетке, по-разному зависят от ее прикрепления к субстрату и пространственной организации [201].

Утрата волокон натяжения и нарушение всей организации клетки вызываются многими трансформирующими агентами. Микроинъекция очищенной src-киназы в клетку приводит к разрушению волокон натяжения в течение 30 мин, что указывает на существенную роль дезорганизации цитоскелета на ранних этапах трансформации [202]. У индивидуумов, предрасположенных к определенным формам рака, организация волокон натяжения нарушена в клетках до того, как они действительно заболеют [203]. Все это указывает на определяющую роль нарушений цитоскелета в процессе трансформации.

На организацию цитоскелета может влиять и ряд других агентов. Опухолевые промоторы, такие, как фибробластин или протеазы с той же специфичностью, что и у плазмина, могут индуцировать дезорганизацию цитоскелета, аналогичную описанной выше. В то же время, если вызвать изменения в структуре цитоскелета, это еще не приведет к устойчивой трансформации клетки [204]. Это означает, что хотя нарушение цитоскелетной организации коррелирует с трансформацией, само по себе оно еще недостаточно для обеспечения стабильности трансформированного состояния.

На важную роль изменений цитоскелета в трансформации указывает и ряд свойств поверхности трансформированных клеток. У многих трансформированных клеток обнаруживается сравнительно мало фибронектина — возможно, вследствие секреции ими активатора плазминогена. Кроме того, поверхность многих трансформированных клеток устойчива к действию конканавалина А, изменяющего поверхность нормальных клеток. Поскольку фибронектин необходим для миграции клеток и опосредует многие эффекты, вызываемые внеклеточным матриксом, эти результаты показывают, что изменения, характерные для трансформации, происходят на границе между цитоскелетом и плазматической мембраной.

Все это вместе взятое позволяет сделать следующие обобщения. Изменения организации цитоскелета коррелируют обычно с увеличением степени трансформации; во многих случаях дезорганизация цитоскелета обнаруживается раньше, чем другие признаки трансформированного состояния клетки. Однако сами по себе изменения цитоскелета, даже вызванные опухолевыми промоторами, еще недостаточны для трансформации; отсюда следует, что для полной трансформации необходимо нарушение еще каких-то регуляторных механизмов клетки. Наконец, морфология трансформированных клеток может быть в какой-то мере нормализована путем, например, добавления в среду экзогенного фибронектина, при этом внутренняя организация клетки и ее поведение также часто становятся более нормальными.

Наибольшее количество данных о сравнительной организации цитоскелета нормальных и трансформирован-

ных клеток касается актиновой сети, и особенно волокон натяжения. Организация системы микротрубочек также может нарушаться при трансформации, но эти нарушения труднее обнаружить, поскольку все факторы, препятствующие распластыванию клеток, влияют также на степень развитости системы микротрубочек в них. Кроме того, округлившиеся клетки с трудом поддаются изучению методом иммунофлуоресценции. С этими оговорками можно предположить, что трансформированные клетки все же содержат сеть микротрубочек, но имеющую по необходимости более «округлую» конфигурацию, чем в полностью распластанных клетках.

На роль промежуточных филаментов в трансформации указывают следующие два наблюдения. Нормальная клетка, обработанная цитохалазином, состоит из длинных тонких ветвящихся отростков, отходящих от круглой центральной части. В отростках имеется большое количество промежуточных филаментов. Такие отростки не образуются под действием цитохалазина у клеток, трансформированных вирусом [205]. Так как цитохалазин подавляет образование филоподий и складок клеточного края, описанные отростки должны возникать в результате особого типа взаимодействия с субстратом, предполагающего образование связи между промежуточными филаментами и клеточной мембраной. Другое поразительное наблюдение состоит в том, что воздействия, изменяющие форму клетки, могут влиять на способность трансформированных клеток к метастазированию. Клетки меланомы, когда они имеют сферическую форму, метастазируют очень активно, а после дня, проведенного в условиях, стимулирующих распластывание, их метастатическая активность снижается, причем это не является, по-видимому, результатом просто селекции клеток [194]. Отсутствие химических препаратов, избирательно действующих на промежуточные филаменты, затрудняет проверку того, действительно ли трансформация и промежуточные филаменты имеют непосредственное отношение друг к другу. Приведенные наблюдения показывают, однако, что какую-то роль в экспрессии трансформированного фенотипа промежуточные филаменты все же играют.

Нормальные клетки содержат тонко регулируемый цитоскелет и обладают способностью адекватным образом взаимодействовать с внешней средой, и в частности с внеклеточным матриксом. У трансформированных клеток и цитоскелет, и взаимодействие с внеклеточной средой нарушены. Характер этих нарушений и механизм их возникновения постепенно становятся понятными.

Многое уже известно о химических свойствах цитоскелетных белков. По мере того как проясняются потенциальные направления взаимодействий в цитоскелете, обнаруживаются все новые и новые цитоскелетные белки, и свойства этих белков изучаются как в физиологических, так и нефизиологических условиях. И все же наших нынешних знаний о цитоскелетных белках недостаточно для объяснения архитектуры цитоскелета.

Архитектура цитоскелета зависит от типа клеток, степени их дифференцировки и условий роста. Цитоскелет большинства клеток организован анизотропно и асимметрично; это динамичная, способная непрерывно изменяться структура. Спонтанная сборка в клетке из растворимых компонентов кажется вероятной лишь для немногих цитоскелетных элементов (например, для центриолей), в большинстве же случаев происходит постоянная перестройка уже существующих структур. Высокий уровень пространственной организации цитоскелета, функциональное значение существования различных изоформ цитоскелетных белков и, наконец, механизм регулируемых перестроек цитоскелета — все это призвана объяснить химия белков, и все это еще ждет своего объяснения.

К настоящему времени накоплено множество данных о расположении цитоскелетных белков в клетках разного типа. Наше знание архитектуры цитоскелета, однако, еще не позволяет разобраться в том, что можно было бы назвать хореографией клетки, т. е. в движении ее различных компонентов клетки во времени и пространстве. А вместе с тем такое движение и позволяет клетке поддерживать собственное существование, расти и делиться, и именно его необходимо понять, хотя очевидно, что на этом пути нас ждут еще большие трудности, чем при изучении архитектуры и химии белков цитоскелета.

Литература

1. DeRosier D. J. et al. *Nature*, **287**, 291—296 (1980).
2. Clarke M., Spudich J. A. *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 797—822 (1977).
3. Osborn M., Weber K. *Cell*, **31**, 303—306 (1982).
4. Geisler N., Weber K. *EMBO J.*, **1**, 1649—1656 (1982)
5. Korn E. D. *Physiological Rev.*, **62**, 672—737 (1982).
6. Schliwa M. *Cell*, **25**, 587—590 (1981).
7. Southwick F. S., Hartwig J. H. *Nature*, **297**, 303—307 (1982).
8. Yamamoto K. et al. *J. Cell Biol.*, **95**, 711—719 (1982).
9. Glenney J. R. et al. *J. Biol. Chem.*, **256**, 9283—9289 (1981).
10. Repasky E. A. et al. *Cell*, **29**, 821—833 (1982).
11. Glenney J. R., Jr. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4002—4005 (1982).
12. Levine J., Willard M. J. *Cell Biol.*, **90**, 631—643 (1981).
13. Timasheff S. N., Grisham L. M. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 565—591 (1980).
14. Wegner A. J. *Mol. Biol.*, **131**, 839—853 (1976).
15. Sherline P., Schiavone K. *Science (Wash. D. C.)*, **198**, 1038—1040 (1977).
16. Weingarten M. D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1858—1862 (1975).
17. Cleveland D. V. et al. *J. Mol. Biol.*, **116**, 207—225 (1977).
18. Suprenant K. A., Dentler W. L. *J. Cell Biol.*, **93**, 164—174 (1982).
19. Pallas D., Solomon F. *Cell*, **30**, 407—414 (1982).
20. Theurkauf W. E., Vallee R. B. J. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3284—3290 (1982).
21. Vallee R. B., Davis S. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1342—1346 (1983).
22. The Cytoplasmic Matrix and Integration of Cellular Function, *J. Cell Biol.*, **9**, 1, part 2.
23. Geiser N., Weber K. *J. Mol. Biol.*, **151**, 565—571 (1981).
24. Steinert P. M. *J. Mol. Biol.*, **123**, 49—70 (1978).
25. Geisler N., Weber K. *EMBO J.*, **1**, 1649—1656 (1982).
26. Osborn M., Weber K. *Cell*, **31**, 303—306 (1982).
27. Steinert P. M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3692—3696 (1981).
28. Geisler N., Weber K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4120—4123 (1981).
29. Walter M. F. et al. *J. Cell Biol.*, **97**, 223a (1983).
30. Nelson W. J., Traub P. *FEBS*, **161**, 51—57 (1981).
31. Day W. A. J. *Ultrastruct. Res.*, **70**, 1—7 (1980).
32. Azanza J.-L. et al. *Biochem. J.*, **183**, 339—347 (1979).
33. Wiche G. et al. *J. Cell Biol.*, **97**, 887—901 (1983).
34. Granger B. L. et al. *J. Cell Biol.*, **92**, 299—312 (1982).
35. Breckler J., Lazarides E. *J. Cell Biol.*, **92**, 795—806 (1982).
36. Bloom G. S., Vallee R. B. J. *J. Cell Biol.*, **96**, 1523—1531 (1983).
37. Davis J., Bennett V. J. *J. Biol. Chem.*, **257**, 5816—5820 (1982).
38. Pfeffer S. R. et al. *J. Cell Biol.*, **97**, 40—47 (1983).

39. Amos W. B. In: *Molecules and Cell movement* (eds. S. Inoué and R. E. Stephens), Raven Press, New York, 1975.
40. McKeithan T. W. et al., *J. Cell Biol.*, **96**, 1056—1063 (1983).
41. Sefton B. M. et al. *Cell.*, **24**, 165—174 (1981).
42. Adelstein R. S., Klee C. B. In: *Calcium and Cell Function*, Academic Press, New York, 1980.
43. Spudis J. A. et al. *CSH Symp. Quant. Biol.*, **46**, 553—561 (1982).
44. Craig S. W., Ko C. G. *Fed. Proc.* **41**, 1421 (1982).
45. Tilney L. G., Detmers P. J. *Cell Biol.*, **66**, 508—520 (1975).
46. Pinder J. C., Gratzer W. B. *J. Cell Biol.*, **96**, 768—775 (1983).
47. Branton D. et al. *Cell*, **24**, 24—32 (1981).
48. Nakashima D., Beutler E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 935—938 (1979).
49. Gillies R. J. *Trends in Biochem. Sci.*, **7**, Feb., 41—42 (1982).
50. Blikstad I., Lazarides E. *J. Cell Biol.*, **96**, 1803—1808 (1983).
51. Bartelt D. C. et al. *J. Cell Biol.*, **95**, 278—284 (1982).
52. Granger B. L., Lazarides E. *Cell*, **30**, 263—275 (1982).
53. Blikstad I., Lazarides E. *J. Cell Biol.*, **96**, 1803 (1983).
54. Carroll R. C., Cox A. C. *Surv. Synth. Path. Res.*, **2**, 21—33 (1983).
55. Gonnella P. A., Nachmias V. T. *J. Cell Biol.*, **89**, 146—151 (1981).
56. Debus E. et al. *Eur. Cell. J. Biol.*, **24**, 45—52 (1981).
57. Lazarides E. *Cell Motility*, **3**, CSH Conf. on Cell Proliferation, 347—360, 1976.
58. Heggenes M. H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3883—3887 (1977).
59. Bretscher A., Weber K. *J. Cell Biol.*, **86**, 335—340 (1980).
60. Avnur Z. et al. *J. Cell Biol.*, **96**, 1622—1630 (1983).
61. Weber K. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 459—463 (1975).
62. Henderson D., Weber K. *Exp. Cell Res.*, **129**, 441—453 (1980).
63. Ip W. et al. *J. Cell Biol.*, **96**, 401—408 (1983).
64. Schliwa M., van Blerkom J. *J. Cell Biol.*, **90**, 222—235 (1981).
65. Fulton A. B. et al. *Cell*, **20**, 849—857 (1980).
66. Travo P. et al. *Exp. Cell Res.*, **139**, 87—94 (1982).
67. Sobieszek A. In: *Biochemistry of Smooth Muscle*, 413—443 (1977).
68. Osborn M. et al., *Different.*, **20**, 196—202 (1981).
69. Traeger L., Goldstein M. A. *J. Cell Biol.*, **96**, 100—103 (1983).
70. Pardo J. V. et al. *J. Cell Biol.*, **97**, 1080—1088 (1983).
71. Nelson W. J., Lazarides E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 363—367 (1983).
72. Tokuyasu K. T. et al. *J. Cell Biol.*, **96**, 1736—1742 (1983).
73. Pardo J. V. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1008—1012 (1983).
74. Craig S. W., Pardo J. V. *Cell Motility*, **3**, 449—462 (1983).
75. Tokuyasu K. T. et al. *J. Cell Biol.*, **96**, 1727—1735 (1983).
76. Lazarides E. et al. *CSH Symp. Quant. Biol.*, **46**, 351—378 (1982).
77. Wang K., Williamson C. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3254 (1980).
78. Reinach F. C. et al. *J. Cell Biol.*, **96**, 297—300 (1983).
79. Wallimann T. et al. *J. Cell Biol.*, **96**, 1772—1779 (1983).
80. Pardo J. V. et al. *Cell*, **32**, 1093—1103 (1983).
81. Gomer R. H., Lazarides E. *Cell*, **23**, 524—532 (1981).

82. Fallon J. R., Nachmias V. T. J. Cell Biol., 87, 237—247 (1980).
83. Bader D. et al. J. Cell. Biol., 95, 763—770 (1982).
84. Gard D. L., Lazarides E. Cell, 19, 263—275 (1980).
85. Bennett G. S. et al. Different., 12, 71—82 (1978).
86. Osborn M. et al. CSH symp. Quant. Biol., 46, 413—429 (1982).
87. Wehland J. et al. J. Cell Sci., 37, 257—273 (1979).
88. Sanger J. W. et al., J. Cell Biol., 96, 961—969 (1983).
89. Herman I. M., Pollard T. D. J. Cell Biol., 88, 346—351 (1981).
90. Herman I. H. et al. J. Cell. Biol., 90, 84—91 (1981).
91. Frixione E. Cell Biol., 96, 1258—1265 (1983).
92. Euteneuer U., McIntosh J. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 372—376 (1981).
93. Franke W. W. et al. Different., 15, 7—15 (1979).
94. Tseng S. C. G. et al. Cell 30, 361—372 (1982).
95. Moll R. et al. J. Cell Biol., 95, 285—295 (1982).
96. Schmid E. et al. J. Cell Biol., 96, 37—50 (1983).
97. Henderson D., Weber K. Exp. Cell Res., 132, 297—311 (1981).
98. Mooseker M. S. Cell, 35, 11—13 (1983).
99. Tilney L. C. et al. J. Cell Biol., 86, 244—259 (1980).
100. Nagle B. W., Burnside B. J. Cell Biol., in press.
101. Owaribe K., Masuda H. J. Cell. Biol., 95, 310—315 (1982).
102. Hubbard A. L., Ma A. J. Cell Biol., 96, 230—239 (1983).
103. Porter K. R., Anderson K. L. Eur. J. Cell Biol., 29, 83—96 (1982).
104. Schliwa M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4329—4333 (1981).
105. Maupin P., Pollard T. D. Cell Biol., 96, 51—62 (1983).
106. Jahn W. Eur. J. Cell Biol., 20, 301—304 (1980).
107. Gabbiani G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2361—2364 (1983).
108. Selden S. C., III et al. Cell Physiol., 108, 195—211 (1981).
109. Ausprunk D. H., Berman H. J. Tissue and Cell, 10, 707—724 (1978).
110. Pollak R. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 994—998 (1975).
111. Edelman G., Yahara I. Proc. Natl. Sci. USA, 73, 2047—2051 (1975).
112. Leavitt J. et al. Cell, 28, 259—268 (1982).
113. Witt D. P. et al. J. Cell Biol., 96, 1766—1771 (1983).
114. Shriver K., Rohrschneider L. J. Cell Biol., 89, 525—535 (1981).
115. Osborn M., Weber K. Lab. Invest., 48, 372—394 (1983).
116. Travis J. L., Allen R. D. J. Cell Biol., 90, 211—221 (1981).
117. Nagai R. et al. J. Cell Sci., 33, 205—225 (1978).
118. Fulton C., Lai E. Y. In: Microtubules in Microorganisms (eds. P. Cappucinelli and N. R. Morris), 235—256 (1982).
119. Huang B. et al. J. Cell Biol., 88, 80—88 (1981).
120. Minami S. A. et al. Cell 24, 89—95 (1981).
121. Soll D. R. In: The Microbial Cell Cycle (eds. T. Nurse and E. Strieblova), CRC Press Inc., Boca Raton, FL. (1984), in press.
122. Lloyd C. W. The Plant Cytoskeleton, Academic Press, New York, (1982).
123. Wick S. M. et al. J. Cell Biol., 89, 685—690 (1981).
124. Hordham A. R. et al. Planta (Berl.), 149, 181—195 (1980).

125. Wick S. M., Duniec J. J. *Cell Biol.*, **97**, 235—243 (1983).
126. Dustin P. *Microtubules*, Springer-Verlag, Berlin, (1978).
127. Horwitz S. B. et al. *CSH Symp. Quant. Biol.*, **46**, 219—226 (1982).
128. Flanagan M. D., Lin S. J. *Biol. Chem.*, **255**, 835—838 (1980).
129. Atlas S. J., Lin S. J. *Cell Biol.*, **76**, 360—370 (1978).
130. Schliwa M. *J. Cell Biol.*, **92**, 79—91 (1982).
131. Bershadsky A. D. et al. *Exp. Cell Res.*, **127**, 421—427 (1980).
132. Sharpe A. H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7267—7271 (1980).
133. Lazarides E., Gard D. L. In: *Gene Regulation* (ed. B. W. O'Malley), Academic Press, New York, 343—358, (1982).
134. Kruh J. *Mol. Cell. Biochem.*, **42**, 65—82 (1982).
135. Huang B. et al. *Cell*, **28**, 115—124 (1982).
136. Allen R. D. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**, 379—396 (1960).
137. Allen R. D. Taylor D. L. In: *Molecules and Cell Movement* (eds. S. Inoué and R. E. Stepheus), Raven Press, New York, pp. 351—378 (1975).
138. Bhisey A. N., Freed J. J. *Exp. Cell Res.*, **64**, 419 (1971).
139. Cheung H. T. et al. *Exp. Cell Res.*, **111**, 95—103 (1978).
140. Malawista S. E., Chevance A. DeB. *J. Cell Biol.*, **95**, 960—973 (1982).
141. Zigmond S. H. et al. *J. Cell Biol.*, **89**, 585—592 (1981).
142. Goldman R. D. *J. Cell Biol.*, **51**, 752—762 (1971).
143. Albrecht-Buehler G., Lancaster R. M. *J. Cell Biol.*, **71**, 370—382 (1976).
144. Gawlitta W. et al. *Eur. J. Cell Biol.*, **26**, 83—90 (1981).
145. Gottlieb A. I. et al., *J. Cell Biol.*, **96**, 1266—1272 (1983).
146. Albrecht-Buehler G. *Cell*, **12**, 333—339 (1977).
147. Albrecht-Buehler G. *Cell*, **11**, 395—404 (1977).
148. Ali I. U., Hynes R. O. *Cell*, **14**, 439—446 (1978).
149. Moore L., Pastan I. *J. Cell Physiol.*, **101**, 101—108 (1979).
150. Goldman R. D. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 750—754 (1973).
151. Steinberg M. S., Poole T. J. In: *Developmental Order: Its Origin and Regulation*, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 351—378 (1982).
152. Solomon F., Magendantz M. *J. Cell Biol.*, **89**, 157—161 (1981).
153. Carroll R. C. et al. *Cell*, **30**, 385—393 (1982).
154. Webb W. W. et al. *Biochem. Soc. Symp.*, **46**, 191—205 (1982).
155. Prives J. et al. *J. Cell Biol.*, **92**, 231—236 (1982).
156. Geiger B. et al. *J. Cell Biol.*, **95**, 137—143 (1982).
157. Edelman G. M. *Science*, **192**, 218—226 (1976).
158. Bourguignon L. Y. W. et al. *J. Cell Biol.*, **95**, 793—797 (1982).
159. Oliver J. W., Berlin R. D. *Intl. Rev. Cytol.*, **74**, 55—94 (1982).
160. Bissell M. J. et al. *J. Theor. Biol.*, **99**, 31—68 (1982).
161. Allen R. D. et al. *Cell Motility*, **1**, 291—302 (1981).
162. Buckley I. K. *Tissue and Cell*, **6**, 1—20 (1974).
163. Buckley I., Steward M. *Cell Motility*, in press.
164. Forman D. S. et al. *J. Neurosci.*, **3**, 1279—1288 (1983).
165. Berlinrood M. et al. *J. Cell Sci.*, **11**, 875—886 (1972).
166. Bajer A., Allen R. D. *J. Cell Sci.*, **1**, 455—462 (1966).
167. Schliwa M. *Methods in Cell Biology*, **25**, 285—312 (1982).

168. *Brady S. T. et al.* Science, **218**, 1129—1131 (1982).
169. *Busson-Mabillot S. et al.* Cell Biol., **95**, 105—117 (1982).
170. *Tokunaka S. et al.* Different., **24**, 39—47 (1983).
171. *Tanenbaum S. W.* Cytochalasins: Biochemical and Cell Biological Aspects, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, (1978).
172. *Rosok M. J., Rohrschneider L. R.* Mol. Cell Biol., **3**, 475—479 (1983).
173. *Franke W. W. et al.* Cell, **30**, 103—113 (1982).
174. *Evans R. M., Fink L. M.* Cell, **29**, 43—52 (1982).
175. *Rickett-Heape J. D. et al.* Cell, **29**, 729—744 (1982).
176. *McIntosh J. R.* In: Developmental Order: Its Origin and Regulation (ed. S. Subtelny), Alan R. Liss, Inc., New York, 77—115 (1982).
177. *Inoué S., Ritter H.* Molecules and Cell Movement, Roven Press, New York, (1975).
178. *Telzer R. B., Haimo L. T. J.* Cell Biol., **89**, 373—378 (1981).
179. *Euteneuer U. et al.* J. Cell Biol., **97**, 202—208 (1983).
180. *Pickett-Heaps J. D., Spurck T. P.* Eur. J. Cell Biol., **28**, 77—82 (1982).
181. *Cande W. Z.* Nature, **304**, 557—558 (1983).
182. *Glacy S. D. J.* Cell Biol., **96**, 1164—1167 (1983).
183. *Feramisco J. R.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 3967—3971 (1979).
184. *Keith C. H. et al.* J. Cell Biol., **88**, 234—240 (1981).
185. *Burridge K., Feramisco J. R.* Cell, **19**, 587—595 (1980).
186. *Kreis T. E. et al.* Cell, **29**, 835—845 (1982).
187. *Fulton A. B., Wan K. M.* Cell, **32**, 619—625 (1983).
188. *Ben-Ze'ev A. et al.* Cell, **17**, 319—325 (1979).
189. *Cleveland D. W. et al.* Cell, **25**, 537—546 (1981).
190. *Cleveland D. W., Havercroft J. C. J.* Cell Biol., **97**, 919—924 (1983).
191. *Farmer S. R. et al.* Mol. Cell Biol., **3**, 182—189 (1983).
192. *Tannenbaum J., Godman G. C.* Mol. Cell Biol., **3**, 132—142 (1982).
193. *Crisona N. J., Strohmman R. C. J.* Cell Biol., **96**, 684—692 (1983).
194. *Raz A., Ben-Ze'ev A.* Science, **221**, 1307—1310 (1983).
195. *Maness P. F., Walsh R. C., Jr.* Cell, **30**, 253—262 (1982).
196. *Wang Z.-W., Rozengurt E. J.* Cell Biol., **96**, 1743—1750 (1983).
197. *Folkman J., Moscona A.* Nature, **273**, 345—349 (1978).
198. *Hauptle M.-T. et al.* J. Cell Biol., **96**, 1425—1434 (1983).
199. *Powers S. et al.* CSH Conference on Cell Proliferation, **9**, 243—258 (1982).
200. *Wittelsberger S. C. et al.* Cell, **24**, 859—866 (1981).
201. *Ben-Ze'ev A. et al.* Cell, **21**, 365—372 (1980).
202. *Maness P. F., Levy B. T.* Mol. Cell Biol., **3**, 102—112 (1983).
203. *Nicholson N. B. et al.* International Cell Biol., 1980—1981, Springer-Verlag, Berlin, 331—335.
204. *Rifkin D. B. et al.* Cell, **18**, 361—368 (1979).
205. *Menko A. S. et al.* Mol. Cell Biol., **3**, 113—125 (1983).

Предметный указатель

- Аксонема 69, 78
Активатор плазмिनогена 105, 107
Актин 13, 27, 30, 45, 47, 59, 70, 108
— структура 33—34, 68—69, 94, 99
— функции 9—11, 43, 65, 86, 101—102
F-Актин 10, 34
G-Актин 40, 100
 α -Актин 30
 β -Актин 62, 101—102
 γ -Актин 50—51, 60, 101—102
 α -Актинин, структура 38—40, 42, 44, 49—50, 52—53, 55—56, 88
— функции 14—15, 101
Актиногелин 14
Акументин 14
Амёбодное движение 67, 78, 80
сАМР-зависимая протеникиназа 21, 27, 77
Анафаза 97
Акирин 28—29, 34
Аппарат Гольджи 44, 90, 93
- Белок(и), актин-связывающие 12, 14—15, 37, 85—86
— ассоциированные с микротрубочками см. БАМ
— глиальный фибриллярный кислый (ГФК) 24
— кепирующие 13, 87
— комплексы TW 260/240 16, 59
— нейрофиламентов 23—25, 27
— промежуточных филаментов 9, 22, 24—25, 66, 68, 104
— синтез 76, 100, 106
Бревин 14
Бутират 77
- Веропапил 77
Виллин 13—14, 59
Виментин, структура 24, 36, 44, 48, 54, 58, 64, 66
— функции 25, 30, 53, 76, 81, 83, 95—96, 101, 101, 102
Винбластин 73
Винкрестин 73
Винкулин 15, 29—31, 43—44, 47, 49, 66, 95
Внеклеточный матрикс 41, 44, 89—90, 104—105, 107
Волокна натяжения 43, 52—53, 56, 82, 108
— формирование 42, 64—65
— функции 76, 95, 106
- Гельзолин 13
Гены, экспрессия 100—102, 104
- Десмин, структура 44, 48—49, 53—54
— функции 24—25, 30, 52, 76—77, 81, 101
Десмосома 58, 60, 62
Десмосомальные мостики 57—58, 60, 62, 64
Декамин см. Виментин
Дигидроцитохалазин 74, 102
Z-Диски 49—50, 52—54
Динеин 21—22, 78, 90
ДНКза I 12
- Интерферон 76
- Кальмодулин 15, 31, 36, 59, 61, 77, 88
Кальций 9, 12, 29, 39—40, 51, 77, 79, 83, 87
Киназа рp60^{src} 66, 106
Кинетохоры 96
Клатрин 28, 92, 94
Клетка(и), выпячивание поверхности 56, 81, 84
— поляризация 44, 80—81
— прикрепление к субстрату 105—106
— распластывание 41, 56, 64—65, 80, 82, 106, 108
— растений 70, 92
— скачкообразное движение

- 91, 96—98
 — складки края 41, 56, 75, 81, 83—84, 108
 — трансформированные (трансформация) 65—66, 68, 82—83, 104—109
 — фокальные контакты 42—43, 55
 — эмбриональные фибробласты 41, 47, 52, 55, 83, 106
 — эндотелиальные 55, 64—65
 — эпителиальные 55, 64, 83
 Колхицин 58, 73, 75, 80—81
 Колцемид 73, 82
 Компонент 3 34
 Контактное торможение 83, 105
 Костамеры 49
 Креатинкиназа 51, 94
 Coelenterata 47
- Лизосомы 90, 94
 Лимфоциты 87
 Люмноколхицин 73
- Мейтансин 75
 Метавинкулин 29
 Метастазы 66, 105, 108
 Метод высоковольтной электронной микроскопии 45—46, 62, 91
 — иммуофлюоресценции (флюоресценция) 11, 37, 44—45, 54, 70, 99, 108
 — микроинъекций 44, 83, 99, 106
 Микроворсинки 43, 58—59
 Микропласты 83
 Микротрабекулы 7, 29, 45, 62, 91
 Микротрубочки 20, 43, 53, 83
 — структура 23, 35, 37, 40, 44—45, 47, 53, 56, 61, 67—71, 78
 — функции 30, 36, 68—69, 71—74, 80, 83, 85, 87, 90—91, 93—97, 108
 Микрофиламенты 6, 41, 47, 83
 — структура 23, 47—49, 55, 60—61, 67—68
- функции 28, 69, 73—76, 83, 85, 87, 93, 102
 Миозин, структура 31, 38, 42, 53, 56, 59, 61, 88
 — функции 16, 30, 47, 51, 64, 68, 77, 85—86
 Миофибриллы 50—51
 Митоз 44, 74—75, 82—83, 87, 89, 95
 Митохондрии 51, 90
 Мышцы 45—51, 53, 101
- Небулин 51
 Нейриты 85
 Нейроны 94
 Нокодазол 73, 85
 Нуклеозиддифосфаткиназа 20—21
Naegleria gruberi 68, 102
- Онкодазол см. Нокодазол
 Органеллы 56, 62, 64—65, 90—91
- Паранемия 26
 Пиноцитоз 83, 93
 Подофиллотоксин 73
 Плектин 26, 28
 Полимеризация 18—20, 24, 40
 Преадиоциты 102
 Препрофазный пучок 71
 Протеаза, активируемая кальцием 25
 Протисты 67, 69—70, 92
 Профилин 12, 39—40
- Саркомера 49, 51—52
 Северии 14
 Сегменты палочек (эпителия сетчатки) 61
 Секреция 92
 Сиамин 26, 36
 Спазмин 29—30
 Спектрин 15—16, 28, 30, 33—36, 49, 60—61, 77
 Стереоцили 60
- Таксол 74—76, 93
 Тропомиозин 14, 16, 30, 38, 40, 42, 50, 59, 65, 101
 Тропонин 16, 50, 101

- Тубулии, структура 37, 44, 53, 71
 — функции 9, 18, 28, 30, 69—70, 73—74, 100—102
 Тубулии-L-тирозинлигаза 21
Tetrahymena 68—69
- Фагоцитоз 88, 93
 Фаллоидин 75
 Фасцин 15
 Фибронектин 30, 82, 107
 Филаменты, промежуточные
 — структура 6, 22—23, 36, 47, 55—57, 61, 64, 69, 90, 104
 — функции 28, 66, 70, 76, 85, 95, 108
 Филамин 15, 30, 38, 40, 42—43, 52
 Филоподии 37, 41, 43, 65, 73, 80, 83—84, 86, 108
 Фимбрин 14, 43, 59
 Фодрин 16
 Фосфорилирование 30, 36, 39, 66, 77, 88, 96
 Фрагмины 12—13
Physarum 67
- Хемотаксис 80, 88
 Хроматофор(ы) 91
Chlamydomonas 68—69, 78
- Центриоль(и) 30, 35—36, 43—44, 80
 Цитокератины 23—24, 56—58, 62, 64, 96
 Цитоскелет 6, 33, 35, 40—41, 89, 91, 100, 107, 109
 Цитохалазин(ы) 13, 35, 74, 76, 80—81, 83, 85—86, 88, 90, 92—94
- Эмбриогенез *см.* Эмбриональное развитие
 Эмбриональное развитие 41, 89, 100
 Эндоплазма 79
 Эндоплазматический ретикулум 90, 93
 Эндоцитоз 93
 Эритроциты 33, 35—36
- Ядерный матрикс 7, 97

Содержание

От редакции	5
1. Введение	6
2. Химия белков	9
2.1. Актин и актин-связывающие белки	10
2.2. Тубулины и сборка микротрубочек	18
2.3. Белки промежуточных филаментов	22
2.4. Белки, ассоциированные с несколькими системами филаментов	26
2.5. Возможные белки микротрабекул	29
2.6. Ковалентные модификации цитоскелетных белков	30
3. Архитектура цитоскелета	33
3.1. Эритроциты	33
3.2. Тромбоциты	37
3.3. Фибробласты	41
3.4. Мышцы	46
3.5. Эпителиальные и эндотелиальные клетки	55
3.6. Трансформированные клетки	65
3.7. Протисты	67
3.8. Растения	70
4. Хореография цитоскелета	73
4.1. Препараты, прямо или косвенно действующие на цитоскелет	73
4.2. Регуляция формы и движения клетки	77
4.3. Взаимодействие цитоскелета с плазматической мембраной и внеклеточным матриксом	86
4.4. Внутриклеточное движение и транзитоз	90
4.5. Митоз и сборка	95
4.6. Цитоскелет и экспрессия генов	100
4.7. Трансформация	104
Литература	110
Предметный указатель	115

МОНОГРАФИЯ

Алиса Фултон

**ЦИТОСКЕЛЕТ. АРХИТЕКТУРА
И ХОРЕОГРАФИЯ КЛЕТКИ**

Научный редактор М. Р. Погосбекова
Мл. науч. редактор Н. Ю. Плавинская
Художник Ю. Лисовский
Художественный редактор А. Я. Мусни
Технический редактор А. Ю. Фомичева
Корректор Т. П. Пашковская

ИБ № 6035

Сдано в набор 1.04.86. Подписано к печати 23.10.86. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага книжно-журнальная. Печать высокая. Гарнитура литературная. Объем 1,88 бум. л. Усл. печ. л. 6,30. Усл. кр.-отт. 6,41. Уч.-изд. л. 6,04. Изд. № 4/4659. Тираж 5 500 экз. Зак. 1226. Цена 75 коп.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.