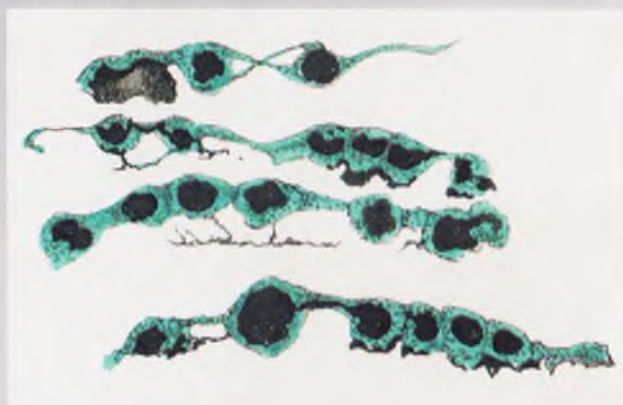


Л.И. Корочкин



БИОЛОГИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

Издательство Московского университета

Л.И. Корочкин

БИОЛОГИЯ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ (генетический аспект)

*Рекомендовано Отделением биологии УМО
по классическому университетскому образованию
в качестве учебника для студентов
биологических специальностей*



Издательство
Московского университета
2002

УДК 575.1/.24; 573
ББК 28.04
К 66

Федеральная целевая программа
“Культура России” на 2002 г.
(подпрограмма “Поддержка полиграфии
и книгоиздания России”)

Рецензенты

Кафедра генетики Новосибирского государственного
университета (зав. кафедрой академик РАН *В.К.Шумный*);
доктор биологических наук, профессор *В.А.Голиченков*

Корочкин Л.И.

К 66 Биология индивидуального развития (генетический аспект): Учебник. — М.: Изд-во МГУ, 2002. — 264 с.
ISBN 5-211-04480-0

В учебнике впервые в России (и в зарубежной литературе) представлена полная информация о достижениях современной экспериментальной эмбриологии на базе молекулярногенетических исследований, в том числе о механизмах, лежащих в основе индивидуального развития, эмбриональной индукции и клонирования животных. Книга показывает также вклад отдельных ученых в проблему онтогенеза; особое внимание уделено российским исследователям, их приоритетным разработкам и основанным ими научным школам. Учебник написан по программе лекций, читаемых автором на биологических факультетах Московского и Новосибирского университетов.

Для студентов и аспирантов, изучающих биологию, генетику, эмбриологию, молекулярную биологию и др., а также для научных сотрудников, занимающихся проблемами онтогенеза.

УДК 575.1/.24; 573
ББК 28.04

ISBN 5-211-04480-0

© Издательство Московского
университета, 2002 г.

Предисловие

В последние годы наметился значительный прогресс в области биологии индивидуального развития. Немало способствовало этому внедрение методов молекулярной биологии и молекулярной генетики, позволившее раскрыть тонкие механизмы эмбриональной индукции, функционирования гомеозисных генов, наметить пути исследования перехода от гена к признаку.

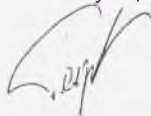
Между тем в литературе, в том числе и в учебной, отсутствует подробная сводка всех достижений современной экспериментальной эмбриологии, развивающейся в тесном взаимодействии с генетикой развития и молекулярной биологией. В учебниках по биологии развития и по генетике соответствующие разделы представлены небольшими главками, не создающими определенного представления об истинном положении дел.

Учебник, написанный членом-корреспондентом РАН Л.И. Корочкиным, одним из ведущих специалистов в области биологии и генетики развития, восполняет этот пробел. Автор рассматривает проблемы биологии индивидуального развития в генетическом аспекте. Им представлены современные данные по молекулярно-генетическому обеспечению всех фаз онтогенеза, начиная с созревания яйцеклетки. Непредвзято рассмотрены различные дискуссионные аспекты этой науки, такие, например, как проблема клонирования млекопитающих и человека.

Ценными представляются исторические экскурсы автора, отражающие вклад отдельных ученых в биологию индивидуального развития. Важно и то, что не забыты отечественные ученые, основанные ими научные школы. Подчеркнуты неизвестные ранее отечественные приоритеты, в частности в разработке метода трансплантации ядер, лежащего в основе клонирования животных.

Полагаю, что книга Л.И. Корочкина будет незаменимым пособием для всех специалистов, занимающихся биологией и молекулярной генетикой индивидуального развития, в особенности для научной молодежи — студентов и аспирантов, лишенных в настоящее время возможности получить полноценную информацию в данной области знания в связи с отсутствием соответствующих учебных пособий.

Академик



Г.П. Георгиев

Введение

Широкий спектр клеточного разнообразия, формирующийся в процессе индивидуального развития, хорошо известен. Наш организм построен из примерно 10^{14} клеток, которые организуются в клеточные ассоциаты, ткани и органы. Количество существующих во взрослом организме клеточных типов также очень велико и, по всей вероятности, исчисляется по крайней мере сотнями. Среди одних только форменных элементов крови встречаются разные виды лейкоцитов (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), лимфоциты, эритроциты. В слизистой желудка с помощью гистологических методов обнаруживаются главные клетки, синтезирующие пепсин, обкладочные, продуцирующие соляную кислоту, добавочные, выделяющие слизь, и др. Об избытии разных клеточных вариантов в нервной системе говорить не приходится. Там можно выделить различные морфологические типы нейронов — клетки Кахаля-Ретциуса, различные типы клеток Догеля.

Продолжительность жизни клеток также разнообразна: нервная клетка может сохраняться и функционировать всю жизнь, а эпителиальная клетка кишечника человека живет всего 1—2 дня.

Наряду с морфологическим разнообразием клетки и ткани обнаруживают специфику по молекулярным маркерам. Эта специфика формируется очень рано, зачастую уже на ранних стадиях дробления, затрагивая не только присутствие или отсутствие того или иного белка или фермента, но и паттерн изоферментов или родственных белков.

Принадлежность клеток к тому или иному типу, к той или иной ткани дает себя знать и в условиях культивирования тканей вне организма, где каждая тканевая система обнаруживает качественно специфичные, только ей одной присущие особенности поведения.

Встают естественные вопросы: *Как в условиях идентичности наследственного аппарата, при одинаковом наборе генов во всех клетках, возникает это многообразие клеток и тканей? Что является определяющим фактором в разделении развивающегося эмбриона на различные специфические молекулярные "области"?*

Поиском ответа на них и посвящен этот учебник.

При изложении фактического материала я исходил из предположения, что процесс индивидуального развития сводится к генетически детерминированному распределению биологически активных макромолекул по объему развивающегося яйца. Таким образом, каждая клетка в зависимости от ее позиции в целостном зародыше содержит в себе или получает от соседних клеток специфический набор этих молекул, как бы метящих ее наподобие “разноцветных флажков”, от которых и зависит ее судьба. Специфическая мозаика распределения этих “разноцветных флажков”, преформирующая на молекулярном “языке” план строения будущего организма, как раз и является той *позиционной информацией*, о которой часто пишут в учебниках, но смысл которой не раскрывают. На основе позиционной информации реализуется генетическая программа молекулярной спецификации клеток, их средства друг к другу, особенностей их формообразовательных движений. Следовательно, весь ход индивидуального развития, включая морфогенетические события, намечается и осуществляется на основе тех молекулярно-генетических процессов, которые имманентны самим клеткам и их системам.

Взаимодействия клеточных систем и складывающихся в клетках молекулярных констелляций ведут к образованию неких равнодействующих сил, направляющих движения клеточных пластов и условно обозначаемых как *морфогенетические поля*, от которых зависит “архитектурное” оформление онтогенеза. Они не являются, как иногда думают, чем-то внешним по отношению к развивающимся тканевым системам, но создаются самими этими системами. Они тем более не являются специфически биологической формой поля по типу электромагнитного и гравитационного полей или подобием аристотелевской энтелехии. Существование такого рода внешних по отношению к развивающейся живой системе сил до сих пор не было показано и не было зарегистрировано ни одним биологом, и, следовательно, соответствующие представления противоречат принципу “бритвы Оккама” (не следует умножать сущности сверх необходимости) и принципу экономии мышления, сформулированному величайшим философом Эрнстом Махом. Кроме того, на данном этапе развития науки отсутствуют какие-либо разумные подходы для экспериментальной верификации или фальсификации постулата об их существовании, каковой, следовательно, надлежит вынести за скобки научного, ибо наука фиксирует и вбирает в себя, как “третий мир” Карла Поппера, только то, что проверяемо и воспроизводимо. И я старался упорядочить и изложить в рамках некоей целостной концепции лишь те фактические данные, в качественности которых не приходится сомневаться.

За предоставленную мне возможность чтения курса по генетическим аспектам онтогенеза на биологическом факультете МГУ я весьма признателен профессорам В.А.Голиченкову и Н.В.Языковой (Дабагян). При его подготовке мною использованы опубликованные и неопубликованные материалы ряда авторов, которым я благодарен за возможность ознакомиться с ними. Это — статьи, рукописи и иллюстративные материалы О.Б.Симоновой, М.Г.Гаузе, Г.П. и П.Г.Георгиевых, И.Ф.Жимулева, А.Ф.Смирнова, В.А.Струнникова, А.К.Дондуа, В.И.Назарова, Г.В.Лопашова, М.М.Асланяна, В.А.Гвоздева, О.В.Яровой, К.Б.Соколовой, В.В.Бабкова, Ю.П.Алтухова, Н.Н.Воронцова, М.Б.Евгеньева, А.Т.Михайлова, Л.В.Белоусова.

В работе над учебником мною использованы новое издание книги Б.Льюина “Гены”, а также американские учебники по генетике:

- Waver R., Hedrick P. Genetics. N.Y.: McGraw Hill. Comp, 1997.
- Snustad D., Simmons M., Jenkins J. Principles of Genetics. N.Y.: John Wiley, 1997.
- Rlug W., Cummings M. Concepts of Genetics. N.Y.: Maxwelli MacMillan, 1994.
- Hartl J. Genetics. Boston; London: Johns and Bartlett Publ. 1994.

Свою благодарность я выражаю также профессору Университета Джорджа Мейсона (США) В.Н.Сойферу и профессору Университета в Ла Корунье (Испания) А.Т.Михайлову за возможность воспользоваться их личной библиотекой и за ряд ценных советов при подготовке данной книги к печати.

ЧТО ТАКОЕ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ И КАК ОНА СООТНОСИТСЯ С ГЕНЕТИКОЙ. ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ — ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ

Биология развития — наука об индивидуальном развитии организмов. Сам этот термин появился относительно недавно. Изначально (в позапрошлом веке), когда интенсивно описывали стадии развития зародышей, говорили об *эмбриологии*; после трудов Ч. Дарвина, когда стали сопоставлять особенности развития различных организмов, получила право на жизнь *сравнительная эмбриология*; затем, когда блестящие эксперименты Дриша и Г. Шпемана проложили новые пути и способы анализа механизмов индивидуального развития, выделилась *экспериментальная эмбриология*. Наконец, события, происходящие в процессе эмбриогенеза и на последующих стадиях развития, начали описывать с помощью биохимических, генетических, молекулярных и других методов, так что в конце концов стало ясно, что эти направления являются родственными ветвями одного и того же дерева и нельзя их отрывать друг от друга. Тогда и появилось обозначение *биология развития*, охватывающая весь комплекс этих дисциплин. С тех пор биология развития является одним из наиболее ярких примеров объединения усилий ученых самых разных специальностей с целью решить одну проблему — как из оплодотворенной яйцеклетки получается дефинитивная живая система со всеми свойственными ей специфическими особенностями! Какие факторы регулируют специфическое развитие этой системы?

В плане изучения таких регуляторных механизмов ведущее место занимает генетический подход, наподобие центра кристаллизации объединяющий остальные способы описания. Этот подход приобрел столь значительный статус, что получил название *генетики развития*. Что это такое? И чем она занимается?

Генетика развития, ранее называвшаяся феногенетикой, изучает реализацию наследственной информации в ходе индивидуального развития, т.е. путь от гена к признаку (морфологическому, биохимическому или молекулярному).

В период зарождения классической генетики существовала пропасть между этой новой наукой и экспериментальной эмбриоло-



Рис. 1.1. Томас Гент Морган. Великий американский ученый. Основоположник современной генетики и экспериментальной эмбриологии. Лауреат Нобелевской премии.

Создал крупнейшую генетическую школу, многие представители которой стали лауреатами Нобелевской премии. Сформулировал хромосомную теорию наследственности и принцип дифференциальной активности генов как основу индивидуального развития и клеточной дифференцировки. Внес огромный вклад в развитие генетики, эмбриологии и эволюционного учения



Рис. 1.2. Рихард Гольдшмидт. Выдающийся немецкий биолог. Один из основоположников современной генетики и экспериментальной эмбриологии.

Выдвинул оригинальную концепцию эволюционного развития, допустив существование специфических системных мутаций, в результате которых появляются так называемые перспективные уроды ("счастливые монстры"), дающие начало новым видам (и даже родам, и еще более высоким категориям) животных и растений. Эта теория, первоначально встреченная что называется "в штывки", в настоящее время обретает все большее признание

гией. Мост между ними суждено было перебросить двум великим ученым — американскому зоологу Т.Х.Моргану (рис. 1.1) и немецкому зоологу Р.Гольдшмидту (рис. 1.2), являвшимся в одно и то же время основоположниками и генетики, и современной экспериментальной эмбриологии. Естественно, они, как никто другой, понимали необходимость и продуктивность такого синтеза, а также отчетливо сознавали, на какой основе он может быть осуществлен. В последующем значительный вклад в генетику развития внесли биохимики и молекулярные биологи, так что в конечном итоге современная генетика развития сложилась на стыке этих четырех дисциплин — генетики, эмбриологии, биохимии и молекулярной биологии, а потому может считаться разделом как генетики, так и биологии развития и, в какой-то степени — молекулярной биологии.

ЭТАПЫ СТАНОВЛЕНИЯ ГЕНЕТИКИ РАЗВИТИЯ

Становление феногенетики (генетики развития) шло параллельно становлению биологии развития и может быть условно подразделено на несколько этапов.

Первый этап — описательный. Он приходится на начало 20-х и отчасти на 30-е годы XX в. Началось с того, что немецкий зоолог В.Хеккер заинтересовался тем, когда можно обнаружить различия в развитии нормальных и мутантных зародышей млекопитающих. Для этой цели он готовил гистологические срезы нормальных эмбрионов и эмбрионов-носителей той или иной мутации на разных стадиях их развития и определял стадию эмбриогенеза, на которой гистологические картины тех и других начинают отличаться. Такие стадии Хеккер назвал *фенокритическими фазами*. Он же предложил назвать возникающее новое направление биологии развития, изучающее эти фазы, *феногенетикой*.

В течение 20-х—30-х годов был накоплен огромный материал в этой области, в особенности на млекопитающих — крысах, мышах, морских свинках. А норвежский цитолог и генетик К.Бонневи создала базу для развития современного учения о наследственных нарушениях онтогенеза у человека, и это дало возможность осмыслить данные по врожденным порокам развития у человека.

Следует отметить, что фенокритические фазы развития изучались не только у животных, но и у растений, где активно работали лаборатории Э.Бауера в Германии и Е.Синнота в США. Однако для более глубокой оценки и интерпретации описательного материала требовались серьезные экспериментальные исследования. Они были проведены в течение 30-х годов XX в. и составили суть второго этапа.

Второй этап — экспериментальный. Он включает главным образом 30-е годы, а также начало 40-х годов XX в. В этот период, благодаря усилиям Т.Х.Моргана, Р.Гольдшмидта, швейцарского зоолога Э.Хадорна, английского генетика С.Уоддингтона, российской школы Н.К.Кольцова (рис.1.3) и др. удалось

Рис. 1.3. Николай Константинович Кольцов. Великий российский ученый. Член-корреспондент АН СССР.

Благодаря Н.К.Кольцову в нашей стране получили мощное развитие цитология, экспериментальная эмбриология и генетика. Почти все крупнейшие отечественные генетики и эмбриологи вышли из его Школы. Первым предложил матричный способ репликации генов. Открыл цитоскелет в животных клетках





Рис. 1.4. Август Вейсман. Выдающийся немецкий ученый.

Выделил в организме соматический и зародышевый пути. Выдвинул представление о раннем отделении зародышевого пути и о роли неравнонаследственного деления клеток в их дифференцировке и регионализации развивающегося организма. Успешно развивал взгляды о роли хромосом в наследственности

накопить богатый экспериментальный материал, проливающий свет на некоторые закономерности генетического контроля индивидуального развития. Именно в этот период были сформулированы **основные принципы феногенетики (генетики развития)**:

1. Принцип дифференциальной активности генов как основа гетерогенизации (регионализации) развивающе-

гося организма. Дело в том, что вопрос о закономерностях функционирования генома встал очень рано. Еще А. Вейсман (рис. 1.4) в конце XIX в. пытался построить стройную схему, с помощью которой удалось бы их объяснить. Он полагал, что в процессе индивидуального развития следует различать два типа клеточных делений — равнонаследственное и неравнонаследственное. При втором типе делений наследственное вещество распределяется по дочерним клеткам неравномерно, и именно это создает различия между ними и лежит в основе гетерогенизации зародыша. Согласно Вейсману, существует специфическая группа органических молекул, названных им **биофорами**, которые находятся в ядре клеток и через поры ядра мигрируют в цитоплазму. Ядру, таким образом, принадлежит активная роль, а цитоплазма, ее поведение и дифференцировка, как и в целом структура и функции клеток, зависят от специфических групп биофор — детерминантов. В зародышевой плазме находится полный набор детерминантов: их столько, сколько типов однородных клеток имеется у взрослого организма. Детерминанты, как и биофоры, растут и размножаются (делятся), так что для любого числа однородных клеток определенной ткани достаточно одного исходного детерминанта. Все детерминанты, определяющие развитие различных признаков организма, сгруппированы в ядре в так называемые иды. Во время митоза иды слагаются в иданты, соответствующие хромосомам.

Следовательно, по Вейсману, возникающие в ходе развития организма различия между клетками обуславливаются сортировкой наследственных единиц (детерминантов). Эти единицы распределяются неравномерно по различным клеткам и детермини-

руют их специализацию. Только *половые клетки* имеют полный набор детерминантов, а потому оказываются способными развиваться в целый организм. Так родилась *теория зародышевого пути*, согласно которой уже в ходе первого деления дробления одни клетки, где сохраняется полный набор детерминантов, образуют зародышевый путь, другие клетки, где детерминанты специфически распределяются между различными соматическими клетками, образуют соматический путь.

Обстоятельно изученное Т.Бовери в конце XIX в. развитие полового зачатка у аскариды гармонировало со взглядами Вейсмана. Зародышевые клетки *Ascaris* уже на ранних стадиях развития можно отличить от соматических клеток, поскольку ядра зародышевых клеток получают полные копии всего хромосомного материала, тогда как хромосомы, содержащиеся в ядрах соматических клеток, лишены своих концов. Бовери обнаружил, что *диминуция* (уменьшение количества) хроматина складывается из двух процессов — фрагментации хромосом и отбрасывания их концов. Процесс этот начинается со второго деления дробления и повторяется каждый раз, когда принадлежащая к половому пути клетка отделяет соматическую клетку (рис. 1.5). Таким образом, хромосомы зародышевых клеток *Ascaris* представляют собой комплексные образования, и часть хромосомного материала, входящего в их состав, не участвует в развитии соматических органов и тканей.

Однако подобный способ разделения полового и соматического пути встречается очень редко, в большинстве случаев это разделение, хотя и регистрируется чрезвычайно рано в эмбриогенезе, но не сопровождается диминуцией хроматина. Тончайшая структура хромосом в соматических клетках, как правило, не претерпевает существенных изменений, и, следовательно, *генотип всех клеток тела одинаков*, так что говорить о неравнонаследственном их делении во время индивидуального развития организма нет оснований. И, следовательно, как справедливо отмечал Н.В.Тимофеев-Ресовский, основная проблема генетики развития, изучающей действие генов в онтогенезе, т.е. путь от гена к признаку, заключается в выяснении того, *каким образом при идентичном наборе генов во всех клетках организма формируются клеточное разнообразие и морфофункциональная специализация тканей и органов*. На этот счет, начиная с 20—30-х годов XX в., существует две “модели” (или гипотезы) объяснения феномена.

Первая гипотеза была сформулирована Морганом, который полагал, что, несмотря на одинаковый набор генов, в клетках многоклеточного организма, расположенных в разных частях развивающегося зародыша, и в разные моменты их дифференцировки *функционируют разные гены*, потому-то они и приобретают сначала химическое, а затем и морфологическое своеобразие (рис. 1.6, А).

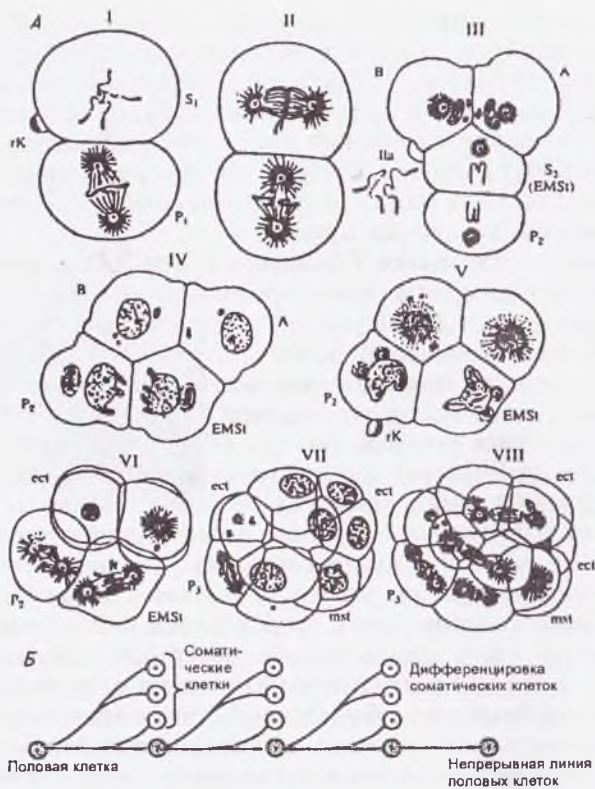


Рис. 1.5. Схема зародышевого пути.

А. Раннее обособление полового зачатка у аскариды. P1—P3 — клетки, дающие начало клеткам зародышевого пути (по Т.Бовери).

Б. Схема, иллюстрирующая вейсмановскую гипотезу зародышевого пути. Развивающееся яйцо дает начало дифференцированным клеткам тела (белые кружки — соматический путь) и половым клеткам (кружки с точками — половой, или зародышевый, путь)

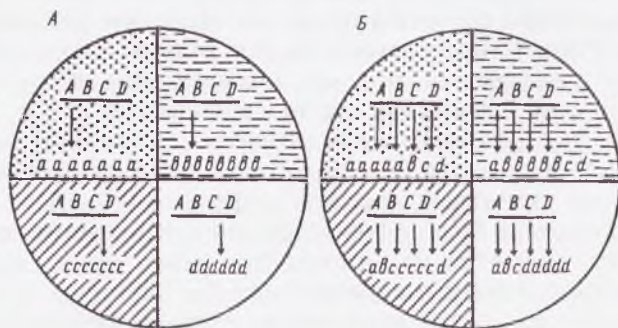


Рис. 1.6. Схема, иллюстрирующая гипотезы Т.Моргана (А) и Р.Гольдшмидта (Б).

А—D — гены; а, в, с, d — геноконтролируемые продукты. Различным способом заштрихованные секторы представляют участки зародыша, дифференцирующиеся в разных направлениях

Вторую гипотезу выдвинул Гольдшмидт. Он предположил, что во всех клетках одинаково работают все гены, но их продукты испытывают разную судьбу в разных частях зародыша. Именно там они подвергаются селективному отбору, так что наблюдается не дифференциальная активность генов в разных клетках, а дифференциальное функционирование их продуктов (рис. 1.6, Б). Если перевести взгляды Моргана и Гольдшмидта на современный язык, то можно сказать, что Морган говорил о *дифференциальной активности генов*, или о транскрипционном уровне регуляции регионализации эмбрионов, а Гольдшмидт — о *дифференциальной экспрессии генов*, т.е. о трансляционном и посттрансляционном уровне регуляции процессов гетерогенизации развивающихся зародышей.

2. *Принцип ведущей роли ядерно-цитоплазматических отношений в регионализации зародыша.* Этот принцип феногенетики был сформулирован в 30-е годы. Здесь представления Моргана и Гольдшмидта совпадали. Оба полагали, что за селективное проявление наследственной информации ответственна цитоплазма. По Моргану, в разных частях зародыша работают разные гены, потому что разные ядра попадают в разную цитоплазму, содержащую разные активирующие гены вещества. По Гольдшмидту, в разных частях зародыша функционируют разные генопродукты, потому что в их цитоплазме содержатся разные вещества, селективно способствующие или препятствующие функционированию этих генопродуктов.

О том, что в разных частях яйца содержится разная цитоплазма, известно было давно. В частности, у многих насекомых на самых ранних стадиях развития на вегетативном полюсе яйца возникает своеобразная зернистая, богатая РНК плазма, которую называют *полярной плазмой*. Ядра, попавшие в эту область, дают начало половым клеткам. Если ее облучить ультрафиолетом, то половые клетки не развиваются, и животные остаются стерильными. Если полярную плазму инъецировать в какую-то другую область зародыша, то в ней, в необычном для себя месте дифференцируются половые клетки. В дальнейшем мы рассмотрим многочисленные примеры такого рода.

3. *Признание роли взаимодействия генов в процессе онтогенеза — третий принцип феногенетики.* Эта роль была продемонстрирована многими исследователями, в том числе и из русской, кольцовской школы. Удалось выявить целый ряд феноменов, отражающих взаимодействие генов, в частности *экспрессивность, пенетрантность и специфичность действия гена*. Данные понятия были сформулированы немецким биологом Фохтом и российскими биологами Н.В.Тимофеевым-Ресовским (рис. 1.7) и П.Ф.Рокицким.



Рис. 1.7. Николай Владимирович Тимофеев-Ресовский. Один из самых ярких российских ученых.

Создатель радиобиологии. Внес значительный вклад в развитие эволюционной и популяционной генетики. Способствовал развитию феногенетики в нашей стране, сформулировал понятия экспрессивности и пенетрантности генов

- Под *экспрессивностью* подразумевается степень проявления данного гена. Всем известен, например, ген пегости у животных, обуславливающий пегую окраску. Окраска эта варьирует (рис. 1.8). Если речь идет о пегих коровах, то легко встретить как целиком белых коров с редкими черными пятнами, так и полностью черных коров с редкими маленькими белыми пятнами; име-

ются и все промежуточные уровни окраски. Это и есть экспрессивность.

- *Пенетрантность* — процент животных (или растений), у которых данная мутация проявляется. Например, мутация “белые глаза” (*white*) проявляется у дрозофилы в 100% случаев, и тогда говорят о 100%-й пенетрантности. В случае мутации *vena transversa incompleta* (*radius incompletus*, прерванная поперечная жилка крыла) у того же объекта пенетрантность может колебаться от 100%-й до 40—50%-й в зависимости от линии дрозофилы.

- *Специфичность действия гена* включает три явления: *время активации гена, направленность его действия и поле действия*.

— *Время активации* в ходе онтогенеза (временная специфичность действия гена) различно для разных генов и разных животных. Бывают как ранние гены, включающиеся уже в период дробления, так и поздние гены, транскрипция которых начинается относительно поздно, ближе ко времени формирования тканей и органов.

— *Направленность действия гена* (пространственная его специфичность) заключается в региональных особенностях его экспрессии, в тканевой специфике его транскрипционной активности. Интересны эффекты направленности действия гена в случае выше названной мутации *radius incompletus*. Можно отселектировать линии дрозофилы, у которых перерыв может быть в верхней или в нижней части жилки либо в ее середине. Иными словами, направленность действия гена обнаруживает межлинейные различия.

Рис. 1.8. Разнообразие в выражении признака пегости у коров, объясняемое действием многих генов-модификаторов (по: Snyder, David, 1957)



— *Поле действия гена* обозначает размер области, на которую распространяется его влияние. В случае мутации *radius incompletus* это будет размер дефекта (перерыва) соответствующей поперечной жилки.

В чем же дело? Почему один и тот же ген характеризуется различной экспрессивностью, пенетрантностью, специфичностью действия? Ответ был найден путем анализа взаимодействия генов. Оказалось, что проявление действия каждого гена *подвергается влиянию многочисленных генов-модификаторов*, которые порой могут частично или полностью заблокировать его выражение в определенном признаке (низкая пенетрантность) или, наоборот, способствовать максимальному проявлению его эффекта (высокий уровень пенетрантности и экспрессивности). Русский генетик Б.Л.Астауров (рис.1.9), ученик Н.К.Кольцова, выразился даже в том смысле, что все гены участвуют в формировании каждого признака, и каждый ген участвует в формировании всех признаков. Это, конечно, экстремистская точка зрения, но можно смело говорить *об участии очень многих генов в реализации одного признака*.

Так родилось понятие о *норме реакции*. Это понятие обозначает пределы колеблемости, варибельности того или иного генетически детерминированного признака. В этих пределах признак может изме-

Рис. 1.9. Борис Львович Астауров. Ученик Н.К.Кольцова, академик РАН.

Организатор и первый директор Института биологии развития Академии Наук, ведущего в стране научного учреждения по проблемам экспериментальной эмбриологии и генетики развития. Один из организаторов и первый президент Всесоюзного общества генетиков и селекционеров. Описал гомеозисную мутацию *tetraptera* у *Drosophila melanogaster*. Выполнил ряд важных и приоритетных исследований на тутовом шелкопряде, в том числе доказывающих ведущую роль ядра в индивидуальном развитии



няться под влиянием как генов-модификаторов (т.е. генотипической среды), так и внешних факторов, к которым данный признак чувствителен в ходе своего развития. Известны, например, температурочувствительные признаки. Существует порода так называемых русских (горностаевых) кроликов, характеризующихся определенной расцветкой. Они имеют белый мех с черными пятнами на ушах, кончике морды, лапах и хвосте. Этот тип окраски генетически детерминирован. Однако если у горностаевого кролика выбрить наголо на спине определенный участок свойственной им в этом месте белой шерсти и затем поместить подопытное животное на холод, то вместо белой шерсти под влиянием охлаждения вырастет черная. Оказалось, что цвет шерсти в разных участках тела животного зависит от температуры, при которой развивался шерстный покров. Так, на спине и боках темная шерсть развивается при температуре ниже $1-2^{\circ}\text{C}$, для ушей этот температурный порог равен $25-27^{\circ}\text{C}$, для кончика носа — 29°C и т.д.

Третий этап развития феногенетики — биохимический (40—60-е годы XX в.). Можно сказать, что он начался с открытия бельгийским ученым Ж.Браше и русским цитологом Б.Кедровским выдающейся роли нуклеиновых кислот в развитии. Стало ясным, что они имеют какое-то отношение к реализации наследственной информации, и в частности в синтезе белка, поскольку активному синтезу белков в клетке всегда предшествовало накопление рибонуклеиновой кислоты (РНК). В связи с открытием в 50-е годы роли дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) как материального носителя наследственности стало в основном понятным значение цепи $\text{ДНК} \rightarrow \text{РНК} \rightarrow \text{белок}$ в процессе онтогенеза. Посредством сочетания экспериментально-эмбриологических и биохимических методов был продемонстрирован поток РНК и белка из ядра в цитоплазму и наоборот, а также показана обратимость дифференцировки ядер в ходе развития некоторых объектов.

Была выявлена связь физиологических градиентов (различных свойств анимального и вегетативного, а также дорсального и вентрального полюсов развивающегося зародыша) с неравномерным распределением нуклеиновых кислот и белков.

Поскольку нашли прямой продукт генов — рибонуклеиновую кислоту (РНК), удалось выявить реальность дифференциальной активности генов (т.е. дифференциальный синтез РНК) на разных стадиях развития и в разных тканях.

Показана связь феномена эмбриональной индукции с белками и рибонуклеопротеинами и выявлены значительные изменения в синтезе РНК и белков в ходе этого процесса.

Одним из важнейших и ключевых событий рассматриваемого периода явилось открытие в 50-е годы американским генетиком К.Маркертом (рис.1.10) множественных фракций ферментов,

Рис. 1.10. Клемент Маркерт, выдающийся американский генетик и эмбриолог.

Открытие им изоферментов революционизировало биохимическую генетику. В настоящее время методы генетики изоферментов используются во многих областях биологии и медицины — популяционной и эволюционной генетике, молекулярной систематике, биологии развития, биохимической диагностике и т.д. Один из авторов метода трансплантации ядер у млекопитающих. Вместе с Г.Уршпрунгом в 1969 г. опубликовал первое руководство по генетике развития, по-прежнему и по сегодняшний день



обозначенных как *изоферменты*. Во многих случаях были локализованы гены, контролирующие синтез того или иного изофермента, и это позволило впервые следить за активностью отдельных конкретных генов в ходе индивидуального развития, используя в качестве специфических маркеров активность соответствующих изоферментов, выявляемых с помощью сочетания электрофореза и гистохимической окраски. На примере изоферментов было обнаружено, что экспрессия биохимических, так же как и морфологических признаков реализуется в результате взаимодействий генов и демонстрирует сходные с морфологическими признаками закономерности этого взаимодействия. В нашей стране идеи Маркерта были восприняты уже в 60-е годы, и генетические исследования изоферментов начали Л.И.Корочкин и его аспирант О.Л.Серов (Новосибирск) и Ю.П.Алтухов (Владивосток). При этом не только были освоены классические методы анализа изоферментов, но и предложены оригинальные способы выявления спектра изоферментов в отдельных клетках на разных стадиях их дифференцировки.

Четвертый этап — молекулярно-генетический (примерно с 60-х годов до наших дней). Характеризуется проникновением в генетику развития методов молекулярной биологии и генной инженерии, а также формированием представлений о конкретных путях реализации наследственной информации. Стало возможным выделять отдельные гены и не только анализировать закономерности их экспрессии в развитии, но и выявлять регуляторные зоны ДНК, от которых зависят эти закономерности.

Результатом таких исследований стало открытие генетических регуляторных систем, контролирующих экспрессию генов на разных уровнях, начиная от транскрипционного и кончая посттранскрипционным, тканевым и организменным.

Экспериментальные работы в области генетики развития проводятся в настоящее время по определенному плану:

- выявление разнообразия по данному признаку;
- доказательство генетической регуляции этого разнообразия (оно может быть вызвано не генетическими, но средовыми влияниями);
- локализация соответствующего гена (генов);
- выделение и клонирование гена, его секвенирование и “вычисление” продукта;
- анализ экспрессии гена в развитии;
- выявление регуляторных зон, контролирующих экспрессию, путем получения трансгенных животных, в геном которых введен соответствующий ген с прилежащими участками ДНК разной длины;
- молекулярно-генетический анализ взаимодействия данного гена и его продуктов с другими генами и их продуктами.

В настоящее время мы вступаем в **пятый период развития фенотипической генетики**, в ходе которого, возможно, будет решен основной вопрос этой науки, поставленный еще Т.Морганом: *каким образом молекулярно-генетические события в ходе онтогенеза детерминируют формообразовательные процессы?* Как из молекулярных изменений складываются изменения морфогенетические? Исследования швейцарского эмбриолога В.Геринга, о которых речь впереди, позволяют оптимистически смотреть в будущее.

Вклад российских ученых в генетику развития в период ее становления. Прежде всего — это успехи в разработке генетических методов управления полом у насекомых. Данная весьма актуальная проблема сложна, над ее решением бились многие лаборатории в различных странах мира, но решена она была лишь в филигранных исследованиях выдающихся ученых Б.Л.Астаурова и В.А.Струнникова и их сотрудников (Л.В.Струнникова, Ю.В.Демин, В.В.Клименко и др.). Полученные ими результаты широко используются в лабораториях различных стран мира как с теоретическим, так и с практическим выходом. Н.В.Тимофеев-Ресовский по возвращении в Россию после длительного пребывания за рубежом организовал активно работающую группу генетиков, возродивших фенотипическую генетику в России и плодотворно работавших в этой области (В.И.Иванов, Е.К.Гинтер, В.А.Мглинец, А.В.Яблоков, Н.В.Глотов). Ими были обнаружены новые особенности генетического контроля клеточной детерминации, выявлены этапы этого процесса, сформулированы основные закономерности формирования фенотипа, исследованы связи становления фенотипического разнообразия с эволюционными событиями.

В Институте биологии развития РАН (Москва) А.А.Нейфак открыл периодичность в морфогенетической активности ядер в эмбриогенезе различных животных и связал это явление с особенностями синтеза матричной РНК, а ученики выдающегося цитогенетика Н.Н.Соколова (М.Б.Евгеньев, В.Г.Митрофанов, Э.А.Абелева, А.И.Иванов), используя оригинальные модельные системы, выявили гены, контролирующие правильное течение митотического процесса клеток в ходе индивидуального развития. У дрозофилы было показано очень раннее разделение соматического и генеративного путей в ходе эмбриогенеза

В Институте молекулярной генетики РАН (Москва) в лаборатории В.А.Гвоздева (Е.В.Ананьев, Т.А.Герасимова, В.Т.Какпаков, Л.З.Файзуллин, В.Я.Бирштейн) были исследованы молекулярно-генетические основы эффекта положения и материнского эффекта, выдвинута оригинальная гипотеза о роли подвижных генетических элементов в онто- и филогенезе. Эта же лаборатория является одной из немногих в мире, где были получены и использованы в экспериментальной работе культуры клеток дрозофилы.

Б.В. Конохов с сотрудниками, развивая в Институте общей генетики РАН (Москва) феногенетику позвоночных, исследовал взаимодействие генных систем, контролирующих формирование глаза и конечностей у млекопитающих, и выявил молекулярные основы этого взаимодействия.

В Московском университете Л.В.Крушинский вместе со своими учениками (И.И.Полетаева, Л.Г.Романова, З.С.Зорина, А.Ф.Семиохина, Л.Н.Молодкина, Д.А.Флесс) разработали экспериментальные модели для исследования генетической регуляции становления поведенческих реакций в онтогенезе. Для этого были выведены крысы линии Крушинского-Молодкиной с наследственной предрасположенностью к аудиогенным эпилептическим припадкам, а также предложены оригинальные методики для изучения рассудочной деятельности животных, впервые описанной в лаборатории Крушинского. Совместно с известными молекулярными генетиками А.П.Рысковым и С.В.Лимборской ученики Л.В.Крушинского исследуют молекулярно-генетические аспекты этих явлений.

Московские генетики Р.В.Петров, Р.Л.Незлин, О.В.Рохлин, Г.И.Абелев, Р.М.Хаитов создали достаточно мощную отечественную школу молекулярной иммуногенетики. Под руководством Г.П.Георгиева развернуты обширные исследования в области онкогенетики.

В Санкт-Петербурге сформировалась генетическая школа М.Е.Лобашева, в последующем возглавленная С.Г.Инге-Вечтомовым. Генетика развития является одним из направлений исследований, развиваемых учениками М.Е.Лобашева. Приоритетные ре-



Рис. 1.11. Елена Владимировна Савватеева. Крупнейший специалист в области нейрогенетики развития.

Представительница Санкт-Петербургской генетической школы. Ученица М.Е.Лобашева и В.В.Пономаренко. Развивая их идеи, обнаружила у дрозофилы новые гены, ответственные за процесс развития и функционирования нервной системы, в том числе связанные с детерминацией способностей к обучению



Рис. 1.12. Андрей Павлович Дыбан. Выдающийся российский эмбриолог.

Автор пионерских работ по локализации сайтов хромосом, ответственных за регуляцию ранних этапов эмбрионального развития млекопитающих. Создатель российской школы в области экспериментальной эмбриологии

зультаты были, в частности, получены в том ее разделе, который связан с изучением генетической регуляции развития нервной системы и поведенческих реакций (В.В.Пономаренко, Н.Г.Лопатина, Е.В.Савватеева, Л.З.Кайданов, Н.Г.Камышев, С.Н.Новиков). Открыты новые возможности поиска нейромутантов у различных животных, у которых изменены особенности формирования поведенческих актов и обнаружены новые гены, контролирующие память и способности к обучению. Получены также данные о молекулярных аспектах их действия. Е.В.Савватеевой (рис.1.11) был открыт новый температурочувствительный ген *agnostic*, который контролирует процессы развития отделов мозга дрозофилы, связанных со способностью к обучению.

В Санкт-Петербурге сложилась также мощная школа генетики развития млекопитающих во главе с А.П.Дыбаном (рис. 1.12). Он и его ученики (В.С.Баранов, В.С.Репин) детально изучили роль отдельных участков различных хромосом млекопитающих в регуляции процессов индивидуального развития, что имеет большое теоретическое и медицинское значение. Вместе с московским биологом С.И.Городецким А.П.Дыбан выполнил важные исследова-

ния по получению трансгенных животных. В его совместных работах с учениками Л.В. Крушинского показана роль транслокаций в становлении системы мозга, определяющих особенности процессов обучения. В.И. Воробьев из Института цитологии РАН одним из первых в мире исследовал роль гистонов в регуляции активности генов в ходе онтогенеза, что весьма существенно для понимания формирования специфических особенностей различных областей развивающегося зародыша.

В Новосибирске открытие новых путей в генетике развития связано с автором пионерских работ по доместикации животных Д.К. Беляевым. Он и его ученики (Л.Н. Трут, В.И. Евсиков, П.М. Бородин, В.О. Рувинский) обнаружили выраженную дестабилизацию генетических регуляторных систем в ходе этого процесса и наметили пути анализа его молекулярно-генетических основ. Результаты, полученные Д.К. Беляевым и его школой, необычные и удивительные, вошли в золотой фонд мировой науки. Выдающиеся исследования И.Ф. Жимулева и Е.С. Беляевой с сотрудниками позволили построить принципиально новую схему функционирования хромосом в онтогенезе, ныне широко распространенную в мировой литературе, и выявить у насекомых последовательные стадии активации генного каскада, индуцированные гормональными факторами.

Л.И. Корочкин с сотрудниками сначала в Новосибирске (Б.А. Кузин, О.Л. Серов, А.А. Аронштам, Л.Ф. Максимовский, С.М. Закин, И.Ю. Раушенбах, Н.М. Матвеева, С.М. Свиридов, А.Н. Онищенко), а затем в Москве (А.А. Караванов, М.З. Людвиг, Н.А. Тамарица, М.Р. Копанцева) совместно с лабораторией Г.П. Георгиева (Г.Н. Ениколопов, П.В. Сергеев, Р.Б. Хечумян) разработал эффективную экспериментальную модель, позволившую открыть у дрозофилы и млекопитающих молекулярно-генетические системы, контролируемые на разных уровнях тканеспецифическую экспрессию генов. При этом был выделен и просеквенирован уникальный тканеспецифический ген, а также были впервые проанализированы молекулярно-генетические особенности процесса клеточной детерминации. Ими же, а также лабораторией Л.С. Сандахчиева были разработаны и внедрены в генетику развития уникальные микрометоды исследования, позволившие анализировать молекулярные изменения отдельных изолированных клеток.

Выдвинулись и молодые талантливые ученые, продолжающие традиции отечественной генетики развития. Это, в частности, лауреаты Европейской премии молодых ученых — П.Г. Георгиев (рис. 1.13), обнаруживший связь инсулятора и подвижных генетических элементов и определивший их роль в развитии клеток, и О.Б. Симонова (рис. 1.14), открывшая новый гомеостатический ген у дрозофилы, ключевой ген в процессе онтогенеза, включенный в целый ряд цепей морфогенетических процессов.



Рис. 1.13. Павел Георгиевич Георгиев. Один из ведущих в нашей стране специалистов в области генетики развития дробозифилы. Лауреат Европейской премии для молодых ученых. Член-корреспондент РАН.

Исследовал влияние подвижных генетических элементов на функционирование генов в процессе индивидуального развития. Разработал оригинальный метод "нокаута" (выключения) отдельных генов дробозифилы, позволяющий анализировать их роль в онтогенезе



Рис. 1.14. Ольга Борисовна Симонова. Первооткрывательница гомеозисного гена *lawc* у дробозифилы. Лауреат Европейской премии для молодых ученых.

Исследовала у дробозифилы нейрогены, гомологичные соответствующим генам млекопитающих, и обнаружила особенности их экспрессии в ходе развития центральной нервной системы дробозифилы. Показала важную роль *lawc*-гена в индивидуальном развитии, включая развитие нервной системы

В лаборатории Е.Д.Свердлова (Москва) группой молодых исследователей (братья С.А. и К.А.Лукьяновы, А.Н.Зарайский, Н.А.Гурская) был открыт новый гомеобоксодержащий ген у амфибий и модифицирован метод вычитания ДНК, позволяющий анализировать региональную специфичность функционирования генов в ходе индивидуального развития. В лаборатории Г.П.Георгиева (Институт биологии гена, Москва) молодые генетики (С.Л.Киселев, Е.А.Прохорчук, А.Н.Онищенко, О.Н.Кустикова) изолировали и изучили новые гены, принимающие участие в онкогенезе.

Российский биолог А.М.Оловников (рис. 1.15) предсказал существование теломеразной системы, позднее подтвержденное экспериментально, что имело большое значение в изучении роли хромосом в клеточной дифференцировке.

Это далеко неполный список достижений отечественной науки в области генетики развития. Здесь почти не представлены научные школы, работающие в области медицинских аспектов генетики развития, совсем не затронуты работы по генетике растений, также активно развивавшейся в России в 70-е годы.

Рис. 1.15. Алексей Матвеевич Оловников.

Российский биолог, предсказавший укорочение теломеров хромосом в процессе развития клеток и важную роль теломеразы в индивидуальном развитии



Все сказанное свидетельствует о том, что наши российские ученые, работающие в области генетики развития, обладают огромным научным потенциалом и в случае государственной поддержки могли бы функционировать на уровне самых высоких мировых стандартов, обогащая мировую науку и новыми оригинальными идеями и новыми важнейшими результатами.

III Рекомендуемая литература

1. Астауров Б.Л. Генетика и проблемы индивидуального развития//Онтогенез. 1972. Т.3. С. 547—565.
2. Бобков В.В. Московская школа эволюционной генетики. М.: Наука, 1985.
3. Корочкин Л.И. Развитие исследований по феногенетике животных в СССР//Онтогенез. 1977. Т.8. С. 547—562.
4. Музрукова Е.Б. Т.Х.Морган и генетика. М., 2002.
5. Соколова К.Б. Развитие феногенетики в первой половине XX в. М.: Наука, 1998.
6. Тимофеев-Ресовский Н.В., Иванов В.И. Некоторые вопросы феногенетики//Актуальные вопросы современной генетики. М.: Изд-во МГУ, 1966. С. 412—433.
7. Korochkin L.I., Koniukhov B.V., Mikhailov A.T. From genes to development: phenogenetic contribution to development biology in Soviet Russia from 1917 to 1967//Intern. J.Develop. Biol. 1997. V.41. P.763—770.

IV Вопросы для повторения

1. Что такое биология развития и генетика развития?
2. Что такое фенокритические фазы?
3. В чем суть представлений А.Вейсмана о генетическом контроле онтогенеза? Соматический и зародышевый пути.
4. В чем разница представлений Т.Моргана и Р.Гольдшмидта?
5. Каковы основные этапы становления генетики развития?
6. Какие Школы генетиков развития сформировались в нашей стране?

ВЕДУЩАЯ РОЛЬ ЯДРА В РЕГУЛЯЦИИ ФОРМООБРАЗОВАНИЯ

ДИСКУССИИ О РОЛИ ЯДРА В РАЗВИТИИ

Реализация наследственной информации в онтогенезе, будучи многоступенчатым процессом, включает различные уровни регуляции — *клеточный, тканевый, организменный*. На каждом этапе развития организма, в ходе морфологической, физиологической и молекулярной гетерогенизации составляющих его клеточных популяций функционирует большое количество генов. Каждый из них контролирует ход той или иной биохимической реакции и через нее принимает участие в осуществлении формообразовательных процессов. Локализация генов в хромосомах ядер определяет *ведущую роль последних* в регуляции формообразования. Однако по этому поводу длительное время происходили дискуссии, в особенности между эмбриологами и генетиками. Первые отводили основную роль цитоплазме, вторые, естественно, ядру. Т.Бовери в 1904 г. выдвинул компромиссную гипотезу, гласившую, что все особенности высших таксонов и ранние стадии развития зависят почти всецело от цитоплазмы, в то время как особенности видового и подвидового характера и более поздние стадии развития обуславливаются ядром, и в частности наследственными зачатками, заложенными в хромосомах. Эту гипотезу разделяли Е.Конклин, Л.Леб, а из отечественных биологов Ю.А.Филипченко. Однако уже в начале XX в. большинство эмбриологов (начиная, по-видимому, с В.Ру и А.Вейсмана) под впечатлением достижений зарождавшейся генетики стали склоняться к признанию главенствующей роли ядра (и локализованных в нем генов) как в детерминации всех фенотипических особенностей развивающегося организма, так и в регуляции всех стадий онтогенеза. Естественно, что этого взгляда придерживались и “отцы” новой науки — генетики.

ОПЫТЫ ПО ДОКАЗАТЕЛЬСТВУ ВЕДУЩЕЙ РОЛИ ЯДРА В РАЗВИТИИ

Правота генетиков была продемонстрирована лишь в 30-е годы XX в. в опытах физиолога растений Г.Хеммерлинга. Он обнаружил, что у одноклеточной водоросли *Acetabularia* форма

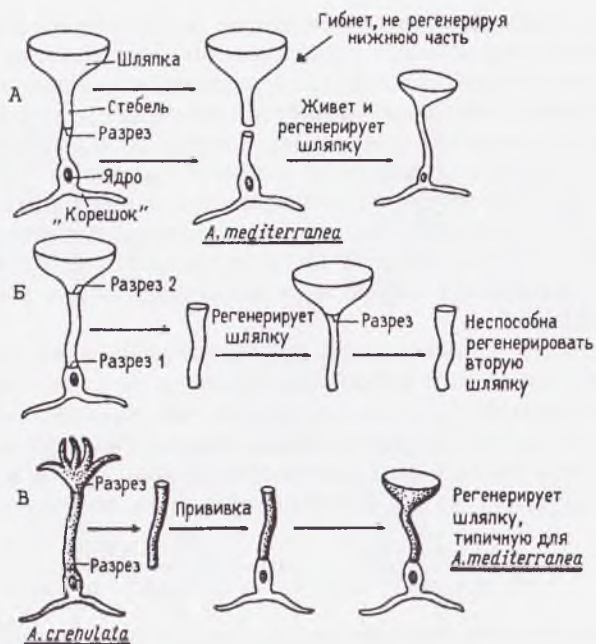


Рис. 2.1. Эксперименты Г.Хеммерлинга, доказывающие выработку ядром ацетибулярии вещества, необходимого для регенерации шляпки

шляпки (зонтика) — органа размножения, развивающегося на верхушке стебля, зависит только от ядра. Так, если у водоросли одного вида — *Acetabularia mediterranea* — удалить содержащий ядро ризоид (рис. 2.1, А) и срастить со стебельком ризоид с ядром другого вида — *A.wettsteini* или *A.crenulata*, то образуется шляпка, свойственная *A.wettsteini* или *A.crenulata*, и наоборот (рис. 2.1, В). Он сделал вывод, что специфическая форма шляпки определяется только ядром и не зависит от цитоплазмы.

В 50-е годы Б.Л.Астауров использовал для доказательства ведущей роли ядра в развитии животных разную чувствительность ядра и цитоплазмы к действию радиации: ядро во много раз чувствительнее к облучению, чем цитоплазма. Он облучал неплодотворенные яйца тутового шелкопряда высокой дозой рентгеновых лучей и затем оплодотворял их нормальной, необлученной спермой. В яйцо шелкопряда обычно проникает несколько спермиев. После этого яйца нагревались в течение 135 мин при 40°С. В результате действия тепла женское ядро часто остается на поверхности и не участвует в процессах развития. Такие яйца, лишенные женского ядерного аппарата, развиваются путем диплоидного андрогенеза, т.е. образуют ядро дробления посредством слияния

ядер двух спермиев. Соответствующие особи всегда самцы, и их легко узнают при помощи генетической маркировки. Если, используя эту методику, соединить цитоплазму яиц *Bombux mandarina* с ядром *Bombux mori*, отличающегося по многим морфологическим, физиологическим признакам и поведению, то оказывается, что развивающийся организм целиком и полностью подобен отцовскому, т.е. соответствует информации, содержащейся в ядре. При соединении ядер *B. mandarina* с цитоплазмой *B. mori* получены сходные результаты (рис. 2.2). Отсюда следует, что и у шелкопряда *формообразовательные процессы определяются ядром и не зависят от цитоплазмы.*

Но как быть с позвоночными? Подчиняются ли они тем же закономерностям? Этот вопрос исследовал в 60-е годы XX в. французский эмбриолог Л. Гальен младший. Он использовал в своей работе два четко обособленных вида из рода *Pleurodeles* — *waltlii* и *poireti*, различающихся по многим морфологическим и биохимическим признакам. Путем скрещиваний были получены гибриды:

$$\frac{\text{ядро } P. \textit{poireti}}{\text{цитоплазма } P. \textit{waltlii}} \text{ и } \frac{\text{ядро } P. \textit{waltlii}}{\text{цитоплазма } P. \textit{poireti}}$$

Потомки первого поколения (F_1) были жизнеспособны и плодовиты. Следовательно, присутствие гаплоидного набора хромосом того же вида, что и цитоплазма, обеспечивает нормальное развитие зародыша.

Далее Гальен использовал метод трансплантации ядер в яйцеклетки амфибий, который, как считают, разработан американскими эмбриологами Р. Бриггсом и Т. Кингом в 50-е годы и позднее усовершенствован английским ученым Дж. Гердоном. Авторы



работы выдвигали на Нобелевскую премию. В действительности этот метод был разработан еще в 40-е годы русским ученым, основоположником отечественной экспериментальной эмбриологии Г. В. Лопашовым (рис 2.3). Суть метода заключается в том, что собственное ядро яйцеклетки тем или иным способом (механически или облучени-

Рис. 2.3. Георгий Викторович Лопашов.

Выдающийся российский эмбриолог. Один из основоположников и классиков отечественной экспериментальной эмбриологии, автор метода трансплантации ядер. Его метод революционизировал экспериментальную эмбриологию. Среди эмбриологов хорошо известна так называемая "операция Лопашова" по исследованию взаимодействия индуктора и компетентной ткани, вошедшая в учебные пособия

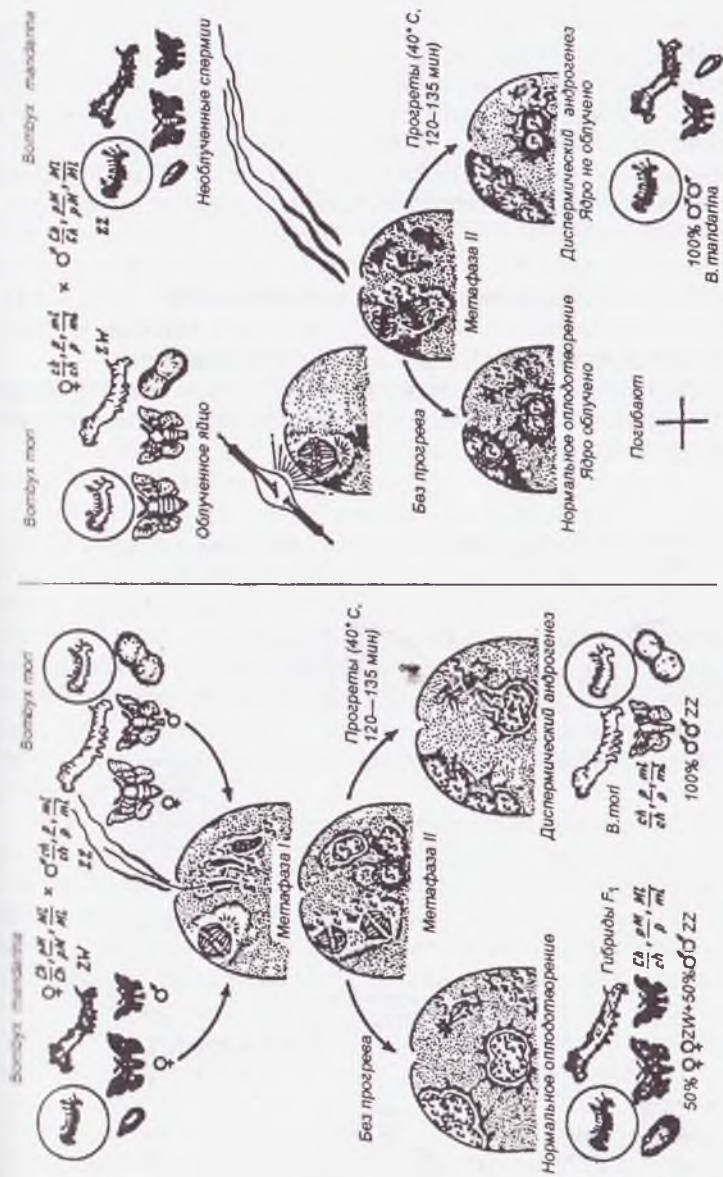


Рис. 2.2. Схема получения межвидового андрогенеза, доказывающего ведущую роль ядра в развитии (по: Астауров, 1968).

Слева — андрогенетические особи (плазма *Bombyx mandarina* + ядро *B. mori*), справа — обратная комбинация (плазма *B. mori* + ядро *B. mandarina*). Андрогенные гибриды плохо отличимы от обычных. Для выделения андрогенных особей применен способ избирательного уничтожения обычных гибридов посредством рентгенизации яиц-яйцеклеток

ем) удаляется, и чужеродное ядро-донор впрыскивается в яйцеклетку с помощью микропипетки (рис. 2.4). Весной 1948 г. Г.В.Лопашов написал на эту тему большую статью в один из отечественных журналов. Однако в августе грянула печально известная сессия ВАСХНИЛ, на которой под руководством академика Т.Д.Лысенко с благословения и при поддержке высших правительственных чиновников и идеологов от науки начался разгром генетики в нашей стране, и набор статьи Лопашова, подтверждавшей одно из основных положений генетики, был рассыпан. Тем не менее сохранились ее тезисы, подтверждающие российский приоритет. Они были опубликованы в сборнике “Рефераты работ биологического отделения АН СССР” (М., 1945. С. 88—89) и в “Comptes Rendus (Doklady) de l’Academie des Sciences de l’URSS”. 1946. V.LII, N 4). Тезисы содержали описание предложенного автором метода, а также первые результаты, полученные с его помощью.

Именно этот метод взял на вооружение Л.Гальен и путем межвидовых пересадок ядер получил ядерно-цитоплазматические гибриды с разной конституцией:

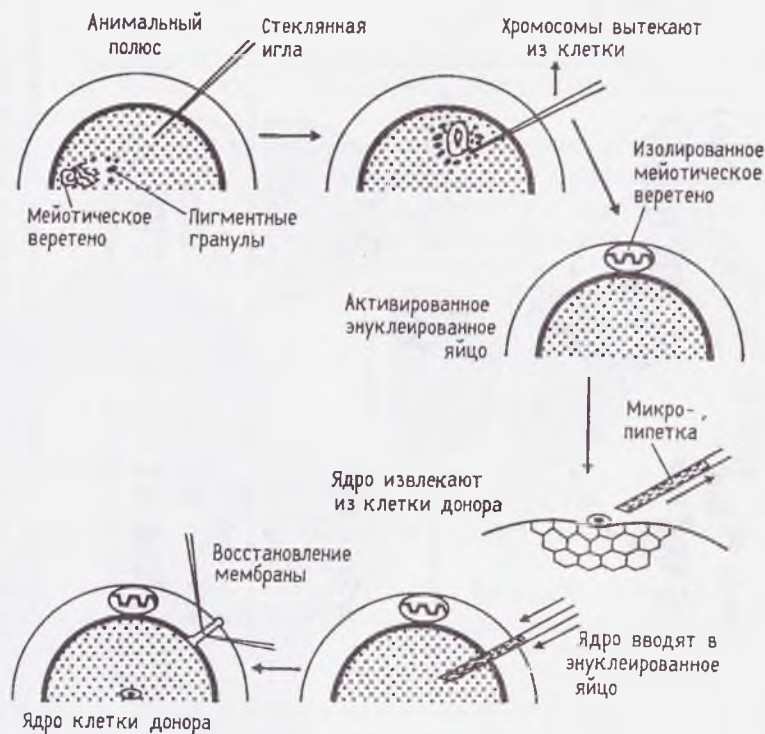


Рис. 2.4. Принцип инъекции ядер в яйцеклетки (по: King, 1966)

ядро <i>P. waltlii</i>	ядро <i>P. poireti</i>
цитоплазма <i>P. poireti</i>	цитоплазма <i>P. waltlii</i>

Начиная со стадии ранней гастролы у них обнаруживались тяжелые нарушения развития. Однако небольшое число таких гибридов (около 2 %) достигало взрослого состояния. *Все особи по своим кариологическим, морфологическим, серологическим и биохимическим признакам были подобны представителям того вида, от которого бралось трансплантированное ядро.*

Таким образом, можно утверждать, что *специфические особенности индивидуального развития контролируются клеточным ядром.*

ОБРАТИМЫ ЛИ ИЗМЕНЕНИЯ ЯДЕР В РАЗВИТИИ?

Претерпевают ли ядра дифференцированных клеток необратимые изменения при развитии или эти изменения носят функциональный характер?

Уже в ранних экспериментально-эмбриологических исследованиях удалось выяснить, что по крайней мере в ходе начальных стадий развития ядра сохраняют свой потенциал и способность обеспечить нормальное развитие зародышей. Однако более точный ответ на данный вопрос был дан лишь в 60-е годы XX в. и также с помощью метода трансплантации ядер. Дж. Гердон убивал ядро неоплодотворенного яйца лягушки ультрафиолетовыми лучами и затем трансплантировал в него ядро из дифференцированной клетки кишечника. Около 1—2% таких яиц развивалось во взрослых лягушек (рис. 2.5). Эти данные свидетельствуют об *обратимости изменений ядер по крайней мере в некоторых дифференцированных клетках.*

Ядра мозаичных яиц, в частности дрозофилы, также сохраняют способность к обеспечению развития зародышей и личинок, что было показано в экспериментах с трансплантацией ядер от зародышей дикой линии мух в яйца мутантов *uwsn₁lzo₂*. Очевидно, ядра некоторых специализированных тканевых систем *эквивалентны* в отношении содержащейся в них наследственной информации. Однако это правило не является универсальным. Как уже отмечалось, при развитии аскариды выявлена диминуция хроматина в соматических тканях, то же самое наблюдается при развитии циклопов и ряда других объектов. Точно так же в разных соматических тканях в ходе их дифференцировки наблюдаются изменения в содержании повторяющихся последовательностей ДНК. Например, у *Drosophila virilis* в разных специализированных органах различается содержание трех фракций сателлитной ДНК, свойственных данному виду насекомых (рис. 2.6).



Рис. 2.5. Процедура получения половозрелых особей шпорцевой лягушки посредством трансплантации ядер клеток кишечного эпителия головастика в энуклеированные яйца (по: Gurdon, 1977).

Хромосомы в яйце шпорцевой лягушки дикого типа (с двумя ядрышками — 2-пи) разрушают ультрафиолетовым облучением и вводят в него ядро клетки кишечного эпителия головастика шпорцевой лягушки из линии с одним ядрышком (1-пи). В одних случаях яйцо не делится, в других случаях развитие зародыша нарушается, но может развиваться нормальная взрослая особь, клетки которой содержат одно ядрышко

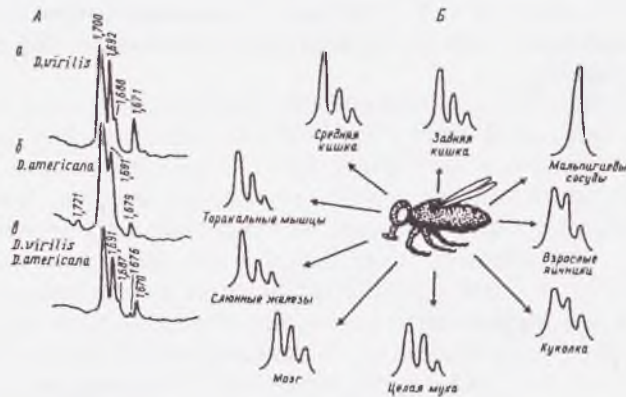


Рис. 2.6. Содержание фракций ДНК в соматических тканях насекомых в ходе дифференцировки.

А. Распределение фракций ДНК *D. virilis* (а), *D. americana* (б) и их гибрида (в) в градиенте плотности нейтрального CsCl (по: Albertson, Gall, 1974). По оси абсцисс — плавучая плотность; по оси ординат — оптическая плотность.

Б. Различия в соотношении фракций сателлитной ДНК в различных органах *D. virilis* (по: Gall, 1975)

ПРОБЛЕМА КЛОНИРОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ. ПУТИ РЕШЕНИЯ, СЛОЖНОСТИ И ВОПРОСЫ

Обнаружение эквивалентности ядер у некоторых объектов и принципиальная возможность клонирования амфибий привели к постановке вопроса о клонированном разведении млекопитающих. Более того, вокруг этой проблемы сложилась атмосфера неоправданного оптимизма.

В 70-е годы XX в. появились публикации работавшего в США швейцарского эмбриолога К.Иллменсе (K. Illmensee), в которых автор демонстрировал трех мышей, будто бы клонированных в результате его экспериментов. Однако эти опыты не смогли воспроизвести в других лабораториях, а комиссия из компетентных биологов признала результаты автора недостоверными. Более того, в опытах Дж.Мак-Грата и Д.Солтера (J. McGrath, D. Solter) в 1984 г. было продемонстрировано, что комбинация двух мужских или двух женских пронуклеусов приводит к остановке эмбрионального развития мышей, а ядра 8-клеточных зародышей и внутренней клеточной массы бластоцисты не обеспечивают развитие *in vitro* ядерных трансплантатов даже до стадии морулы. Небольшая часть ядер (5%), полученных от 4-клеточных зародышей, обеспечивала развитие только до стадии морулы. В то же время 19% энуклеированных зигот, содержащих ядра 2-клеточных зародышей мыши, развивались до стадии морулы или бластоцисты. Эти данные, казалось бы, указывали на то, что в эмбриогенезе мыши происходит быстрая потеря тотипотентности клеточных ядер. Сходные сложности возникали и при работе с эмбрионами кроликов.

Между тем, в 1987 г. в российском журнале "Биофизика" была опубликована статья Л.М.Чайлахяна с соавторами, в которой предлагалось заменить трансплантацию ядер электростимулируемым сиянием клеток. Кариопласт получали из ранних бластомеров зародышей мыши. В ряде случаев авторам удалось добиться рождения мышей в таких экспериментах. В 1989 г. С. Уилладсен (S. Willadsen) получил четыре генетически идентичных бычка холстейнской породы в результате пересадки в реципиентные энуклеированные яйцеклетки донорских ядер, выделенных из дезагрегированных бластомеров одного 32-клеточного зародыша. Однако не удавалось получить клонированных млекопитающих при трансплантации в энуклеированную яйцеклетку ядер соматической клетки от взрослого животного, о чем, собственно, и мечтали. Потому на какое-то время воцарилось спокойствие. И вдруг, как гром с ясного неба, — овечка Долли!

Британский эмбриолог Я.Вильмут (Wilmut) в 1997 г. опубликовал статью, в которой сообщал, что ему удалось клонировать овцу. Для этого были использованы ядра соматических клеток из ткани

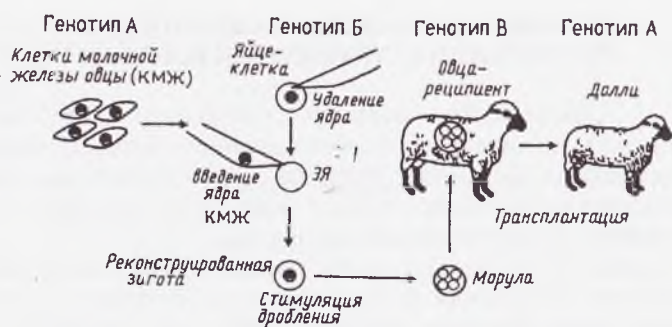


Рис. 2.7. Схема генетического клонирования овцы (по: Асланян, 1998).

ЭЯ — нуклеированная яйцеклетка

молочной железы взрослой овцы, которые вводили в энуклеированные яйцеклетки. Образовавшиеся диплоидные зиготы стимулировали к дроблению электрошоком и трансплантировали в овцу-реципиента (рис. 2.7). Процент положительных результатов был весьма низок: из 250 зигот была получена всего одна овца. Однако поднявшаяся вначале волна энтузиазма сменилась скепсисом: в январском номере журнала "Science" за 1998 г. появилась статья итальянского биолога В.Сгарамелла и доктора Н.Зайндера из Рокфеллеровского университета, в которой сообщалось, что в трех лабораториях не удалось воспроизвести эксперименты Вильмута, и были высказаны сомнения в их доказательности. Дело в том, что Вильмут брал клетки для клонирования из молочной железы беременной овцы. Однако в случае беременности возможно попадание эмбриональных клеток в систему циркуляции, и именно такую клетку мог случайно "поймать" Вильмут в ходе экспериментов, и именно эта клетка обеспечила успех в его работе. Однако такого рода результат отнюдь не является новостью, поскольку ядра эмбриональных клеток способны обеспечить нормальное развитие зародыша. Впрочем, тонкий молекулярно-генетический анализ все же подтвердил, что генотип Долли соответствует генотипу донорской соматической клетки и, следовательно, *эту овечку можно считать клонированной.*

В 1998 г. в Гонолулу группой Р.Янагимачи (R.Yanagimachi) были проведены эксперименты, в ходе которых практически были решены технические проблемы клонирования мышей. Суть этих особенно демонстративных экспериментов отражена на рис. 2.8. Авторы использовали для трансплантации ядра клеток, окружающих ооцит (клеток так называемого cumulus oophorus), клеток Сертоли из семенников и клеток, выделенных из мозга (авторы утверждают, что были взяты именно нейроны, однако из текста статьи не очень понятно, были ли это действительно нейроны или клетки глии). Ядра, выделенные из соматических клеток, инъекцирова-

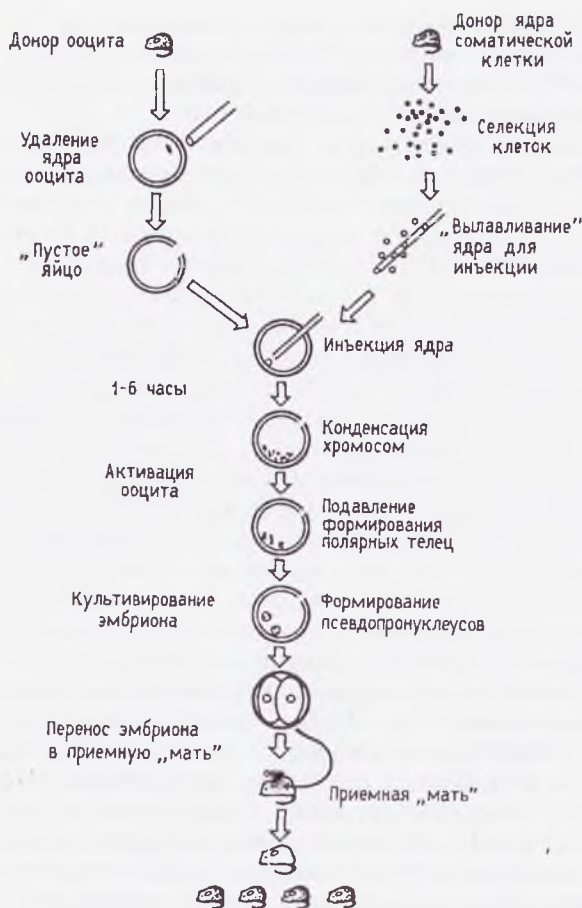


Рис. 2.8. Схема клонирования мыши (по: Yanagimachi, 1998)

ли в энуклеированное яйцо с помощью микропипетки. Яйцо активировали к развитию помещением в специальный раствор (так называемый NEPES-CZB), свободный от кальция, добавляли стронций и цитохалазин. Стронций активировал яйцо, тогда как кальций подавлял образование полярных телец. Эмбрионов культивировали до стадии 2—8 клеток (морулы или бластулы) и затем трансплантировали в матку приемной матери, где многие из них имплантировались и продолжали развитие. Процент "выхода" рожденных мышат (их извлекали с помощью кесаревого сечения на 18,5—19-й дни беременности) был низок: в разных сериях экспериментов от 2 до 2,8%. Молекулярные исследования доказали принадлежность ядер рожденных мышат к клеткам донора соматических клеток.

Таким образом, по крайней мере в некоторых случаях была доказана способность ядер соматических клеток обеспечивать нормальное развитие млекопитающих. Следовательно, получение клона принципиально возможно и в этом случае.

Следует однако отметить, что, хотя работы Я. Вильмута и ученых из Гонолулу являются бесспорно выдающимся достижением, перспективы их дальнейшего развития следует оценивать с осторожностью. На самом деле, получить абсолютно точную копию данного конкретного животного (а именно такая конечная цель ставится в экспериментах по клонированию) намного сложнее, чем это представляется при поверхностном знакомстве с проблемой. Техническая разработка методов клонирования отнюдь не решает эту задачу. Ведь структурно-функциональные изменения ядер в ходе индивидуального развития животных достаточно глубоки: одни гены активно работают, другие инактивируются и “молчат”, при этом сам зародыш представляет собой своеобразную мозаику полей распределения функционально различных генов. Чем организм более специализирован, чем выше ступенька эволюционной лестницы, на которой он стоит, тем эти изменения глубже и тем труднее обратимы. У некоторых организмов, например у известного кишечного паразита аскариды, генетический материал в будущих зародышевых клетках остается неизменным в ходе развития, а в других, соматических клетках выбрасываются большие фрагменты ДНК — носителя наследственной информации. В эритроцитах птиц ядра “сморщиваются” в маленький комочек и не работают, а потому из эритроцитов млекопитающих, стоящих эволюционно выше птиц, вообще выбрасываются за ненадобностью. У плодовой мушки дрозофилы особенно четко выражены процессы, свойственные и другим организмам: селективное умножение или, наоборот, недостатка каких-то участков ДНК, по-разному проявляющиеся в разных тканях.

Много шума в связи с работами по клонированию вызвал еще и тот факт, что в ходе дифференцировки соматических клеток хромосомы последовательно укорачиваются на концах, в зародышевых же клетках специальный белок теломераза достраивает, восстанавливает их. Полученные в этом направлении данные, очевидно, лишней раз свидетельствуют о различиях, иногда достаточно существенных, между зародышевыми и соматическими клетками. Следовательно, не так-то просто ответить на вопрос о том, способны ли ядра соматических клеток полноценно заменить ядра клеток зародышевого пути в их функции обеспечения нормального развития зародыша! Складывается впечатление, что *трансплантация ядер с целью клонирования как у низших позвоночных, так и у млекопитающих, завершается относительным успехом только в тех случаях, когда в яйцеклетку попадает ядро так называемых стволо-*

них клеток. Это те клетки, которые недавно удалось обнаружить в разных тканях многих организмов и которые сохраняют достаточно высокий потенциал развития (порою тотипотентность). Количество их в той или иной ткани невелико: около 0,5—2% и меньше. Оно вполне сопоставимо с тем низким процентом выхода, который наблюдается в опытах по клонированию животных.

КЛОН И КОПИЯ — ЭТО ОДНО И ТО ЖЕ ИЛИ НЕТ?

Получение клона еще не означает получения точной копии клонированного животного. Так, исследованиями В.А.Струникова показано, что в партеноклонах шелкопряда *разнообразие по многим признакам (например, по весу особи, ее размерам и продуктивности) может быть даже выше, чем в обычной популяции.* А.П.Рысков и Н.А.Кан из московского Института биологии гена обнаружили, что *разные ящерицы в пределах одного партеноклона могут различаться по некоторым видам повторяющихся последовательностей ДНК, т.е. их геном не является абсолютно идентичным!* Известно также, что “естественный” клон — однойцовые (мозаиготные) близнецы человека, хотя и очень похожи друг на друга, но не идентичны. А ведь они развиваются в матке одной матери, т.е. в абсолютно равных условиях, когда пределы колеблемости различных признаков в рамках нормы реакции сведены к минимуму. В случае использования приемных матерей при клонировании млекопитающих столь идеальные условия создать невозможно, и, следовательно, абсолютная точность копирования исходной особи едва ли может быть обеспечена.

Что касается клонирования человека, то перед ним стоят непреодолимые этические преграды, поскольку большая часть трансплантируемых в приемную мать зародышей развивается с аномалиями и либо погибнет, либо родится уродами, что с моральной точки зрения недопустимо!

ЧТО ВЛИЯЕТ НА ФУНКЦИИ ЯДЕР В РАЗВИТИИ?

Ядра, даже если они эквивалентны, в разных частях зародыша и в разные периоды развития проявляются разными своими “сторонами” (дифференциальная экспрессия). Подтверждающее большинство эмбриологов и генетиков связывает это с попаданием эквивалентных ядер в разную цитоплазму.

Действительно ли разная цитоплазма может изменять функциональное состояние ядер? Ответ на этот вопрос был получен в опытах на двух экспериментальных системах.

• *Первая система* — гибриды соматических клеток, образующиеся в результате их слияния: *гомокарионы*, когда сливаются клет-

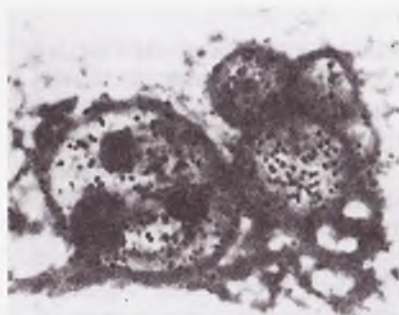


Рис. 2.9. Радиоавтограф гетерокариона, который в течение 20 мин инкубировался с уридином (по: Харрис, 1978).

Клетка (HeLa) содержит одно собственное ядро и три ядра куриных эритроцитов, находящихся на разных стадиях увеличения объема. Все ядра синтезируют РНК. С увеличением объема ядра возрастает количество включенной метки

ки одного типа, и *гетерокарионы*, когда сливаются клетки различного типа. Явление *соматической гибридизации* открыли американский цитолог Г.Барский (G. Barski) в 1960 г. и француз русского происхождения Б.Эффрусси (B. Ephrussi). Эффрусси обнаружил, что в смешанной культуре разных клеток изредка может происходить их слияние с образованием соматических гибридов. В дальнейшем были разработаны способы индуцирования слияния клеток с помощью обработки вирусом Сендай, инактивированным ультрафиолетовыми лучами, лизолецитином и другими агентами, что значительно повышало выход гибридных клеток. Оказалось, что если, например, эритроциты курицы, в которых ядра инактивированы и не обнаруживают транскрипции, сливаются с опухолевыми клетками HeLa, которые характеризуются высоким уровнем синтеза РНК, то в таком гетерокарионе ядра куриных эритроцитов начинают активно синтезировать РНК. Показан поток РНК и белковых веществ из ядра в цитоплазму и обратно (рис. 2.9).

Следовательно, функциональное состояние ядер обнаруживает в данном случае зависимость от вида цитоплазмы, в которой находится ядро.

- *Вторая система* — опять-таки трансплантация ядер. Дж.Гердон (рис. 2.10) исходил из того обстоятельства, что на разных стадиях развития яйца функциональное состояние его ядра существенно изменяется: синтез ДНК, синтез РНК, инактивация ядра и конденсация хроматина. Он предположил, что различия в функциональной активности ядра зависят от факторов, содержащихся в цитоплазме. Если это так, функция любых ядер, трансплантированных в развивающееся яйцо, должна придти в соответствие с функцией собственного ядра клетки-хозяина. Гердон использовал для трансплантации ядер, изолированных из клеток, взятых на разных стадиях развития — стадии бластулы — когда в ядрах активно синтезируется ДНК, нейрулы — когда в ядрах наблюдается синтез РНК, и ядра взрослых нервных клеток, характеризующихся высоким уровнем транскрипции. Результаты его экспериментов представлены на рис. 2.11. Из них следует, что функциональная

Рис. 2.10. Джон Гердон. Выдающийся английский эмбриолог.

Довел до совершенства методику трансплантации ядер. Впервые получил клонированных экспериментальным путем позвоночных животных. Известен также своими работами по изучению механизмов эмбриональной индукции. Разработал методику введения матричной РНК в эмбрионы и наблюдал происходящий в ней синтез специфического белка



активность трансплантированного ядра приходит в точное соответствие с функциональным состоянием ядра клетки-реципиента. Следовательно, разная цитоплазма индуцирует разные функциональные состояния находящегося в нем ядра.

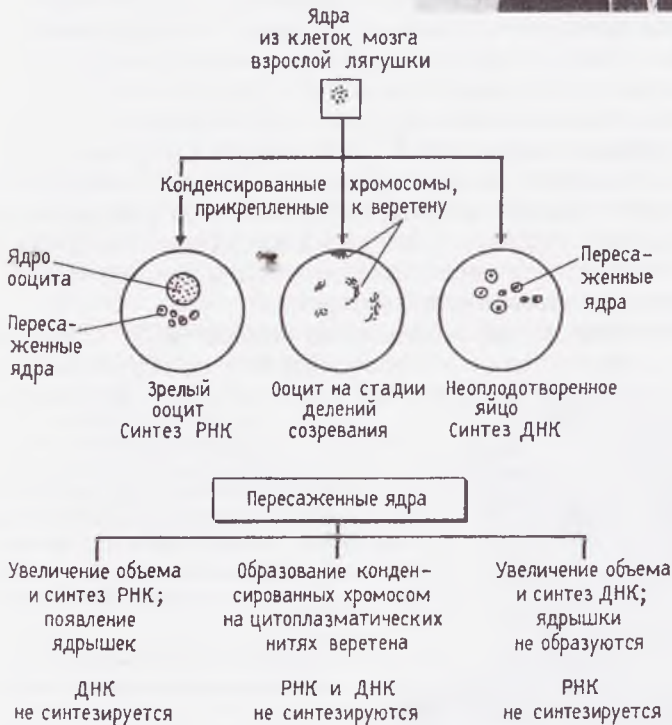


Рис. 2.11. Цитоплазматический контроль активности хромосом в пересаженных ядрах (по: Gurdon, 1970).

Ядра мозга взрослых лягушек, в которых нет митозов и в которых в норме ДНК не синтезируется, по-разному изменяют характер своей активности под влиянием цитоплазмы ооцита или яйца. Изменения активности ядер происходят через 1 час в яйцах, через 4 ч — в созревающих ооцитах и через 24 ч — в зрелых ооцитах

КАК ЦИТОПЛАЗМА ВЛИЯЕТ НА РАБОТУ ГЕНОВ?

Каким же образом цитоплазма может влиять на активность генов? С.Армс (S.Arms), ученица Дж.Гердона, продемонстрировала, что в трансплантированные ядра мигрируют меченые цитоплазматические белки, причем концентрирование этих белков в ядрах совпадает по времени с морфологическими изменениями, происходящими в них и отражающими переход в новое функциональное состояние. Затем было установлено, что как гистоны, так и кислые белки проникают в пересаженное ядро в период изменения его функционального состояния (рис. 2.12). Рейнъецируя разные фракции меченых белков в ооциты амфибий, Дж.Боннер разделил их по характеру поведения на три типа: 1) накапливающиеся предпочтительно в ядре, 2) равномерно распределенные по клетке и 3) преобладающие в цитоплазме. Гердон уточнил стадию развития яйца, на которой цитоплазма приобретает способность индуцировать синтез ДНК. Для этой цели он инъецировал ядра, выделенные из мозга *Xenopus laevis*, в яйца этих животных в различные сроки после их активации и прослеживал включение в них H^3 -тимидина. Созревание ооцитов стимулировали гипофизарным гормоном. Было найдено, что фактор, индуцирующий синтез ДНК, отсутствует в ядре и цитоплазме растущего ооцита и появляется через несколько часов после введения питуитарного гормона, тотчас вслед за разрушением оболочки ядра ооцита. Он сохраняется в цитоплазме яйца по крайней мере в течение часа после оплодотворения или активации и эффективен в отсутствие оплодотворения.

Таким образом, наследственный аппарат ядра выдает информацию в соответствии с цитоплазматическим окружением. Встает вопрос о том, как выдается эта информация — непрерывно или порциями.

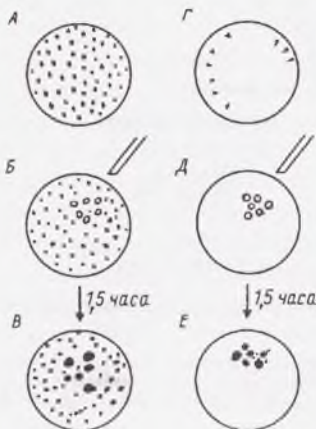


Рис. 2.12. Схема результатов опытов, демонстрирующих накопление цитоплазматического белка в ядрах клеток мозга взрослых животных, пересаженных в неоплодотворенные яйцеклетки и индуцированных к синтезу ДНК (по: Gurdon, 1971)

Приведены результаты опытов С.Армс (1968), где было показано, что пуромицин является эффективным ингибитором синтеза белка.

А — неоплодотворенные яйцеклетки, меченые во время оогенеза путем внутрибрюшинного введения H^3 -аминокислот;

Б — пересажены ядра клеток мозга и инъецированы пуромицином;

В — меченый белок концентрируется в наиболее набухших ядрах;

Г — неоплодотворенные немеченые яйцеклетки;

Д — пересажены ядра клеток мозга и инъецированы H^3 -тимидином;

Е — наиболее сильное включение метки происходит в самых набухших ядрах

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЯДЕР И ЕЕ ПЕРИОДИЧНОСТЬ

В 60-е годы XX в. выдающийся российский эмбриолог А.А.Нейфах (рис. 2.13) обнаружил, что пространственно-временная организация дифференциальной транскрипции в эмбриогенезе различных животных проявляется через *периодичность* морфогенетической активности ядер. Она заключается в том, что, хотя транскрипция происходит непрерывно, информационная РНК, обеспечивающая формообразовательные события, синтезируется лишь в определенные, ограниченные промежутки времени, т.е. как бы квантованно. Нейфах доказал это, используя различные способы подавления транскрипции. Он заметил, что подавление морфогенетической активности ядер рентгеновским облучением, к которому ядра особенно чувствительны по сравнению с цитоплазмой, остающейся при этом жизнеспособной, сопровождается подавлением синтеза информационной (матричной) мРНК. То же самое происходит и при воздействии антибиотика актиномицина. Вместе с этим темп синтеза РНК в целом зародыше не следует за периодами морфогенетической активности: у зародышей выюна, например, он поддерживается на постоянном высоком уровне, начиная со стадии ранней бластулы. Следовательно, выданный в период морфогенетической активности ядер “квант” информации обеспечивает формообразовательные процессы в течение достаточно длительного промежутка развития, после чего в цитоплазму “посылается” очередная порция матричной РНК.

Таким образом, морфогенетическая активность ядер осуществляется за счет синтеза специфических мРНК, продуцирующих белки, которые принимают участие в формообразовательных процессах.

В исследованиях А.А.Нейфаха и М.Б.Королева было показано, что всем эмбриональным зачаткам также присуща периодичность морфогенетической функции ядер. При этом обнаруживаются специфические особенности каждой закладки,

Рис. 2.13. Александр Александрович Нейфах. Выдающийся российский эмбриолог, один из самых ярких представителей отечественной биологии.

Открыл периодичность морфогенетической активности ядер, детально исследовал транспорт РНК из ядра в цитоплазму в процессе клеточной дифференцировки. Изучал компартиментализацию цитоплазмы в ходе оогенеза. Анализировал генетическую продолжительность жизни



проявляющиеся в различиях временных интервалов чувствительности к подавлению ядерной функции.

Соответствующая периодичность в морфогенетической активности ядер была продемонстрирована и в случае позднего развития и постнатального онтогенеза, когда завершаются процессы специализации клеток. Это касается дифференцировки хрусталика, мышц, гемопоэза, раннего нейроэмбриогенеза и др. Так, мне удалось обнаружить, что у крыс до 4—5-го дня после рождения кора головного мозга тотально чувствительна к введению актиномицина D: ее развития тормозится. Инъекция антибиотика после 5-го дня постнатальной жизни не влияет на развитие 5—6-го слоев коры головного мозга, однако отражается на развитии 2—4-го слоев. Позднее и эти слои клеток коры становятся резистентными к действию актиномицина.

Морфогенетическая функция ядер у зародышей с регуляционным типом развития начинается на стадии ранней, средней или поздней бластулы, когда в зародыше содержится от 100—200 (морской еж) до многих тысяч (амфибии) клеток. Внешне она проявляется на стадии средней бластулы (морской еж) или в начале гаструляции (рыбы, амфибии).

У мозаичных яиц она начинается и проявляется раньше: у моллюсков — на стадиях 12 и 22—24 бластомеров соответственно, у аскариды — на стадии двух бластомеров (рис. 2.14). Однако принципиально развитие мозаичных яиц не отличается от развития яиц регуляционного типа. В частности, развитие моллюска *Lyanassa* также характеризуется дифференциальной активностью генов во

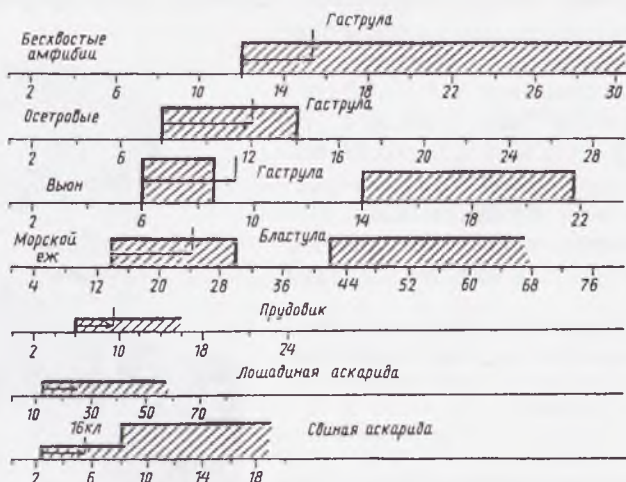


Рис. 2.14. Сроки проявления морфогенетической функции ядер у зародышей разных видов (по: Нейфах, 1962)

времени и пространстве и четко выраженной периодичностью в морфогенетической активности ядер.

Открытие периодичности в морфогенетической функции ядер позволило объяснить с позиций молекулярной генетики классическое положение о критических периодах в развитии, выдвинутое С. Стоккардом (Stockard) еще в 20-е годы XX в. и позднее развитое П. Г. Светловым, гласящее, что в онтогенезе имеются периоды, когда развивающийся организм особенно чувствителен к действию различных вредных факторов.

Таким образом, ядро, несущее наследственный материал, в котором записана программа индивидуального развития, характеризуется следующими особенностями:

- играет ведущую роль в регуляции формообразовательных процессов;
- осуществляет эту роль посредством ядерно-цитоплазматических взаимоотношений;
- по крайней мере в некоторых случаях клеточной дифференцировки и у некоторых объектов сохраняет свой потенциал к обеспечению развития целостного организма, т.е. испытывает в ходе онтогенеза обратимые функциональные изменения;
- в ходе регуляции индивидуального развития проявляет периодичность морфогенетической активности.

1.1 Рекомендуемая литература

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология: В 3 т. М.: Мир, 1994—1996.
2. Асланян М. М. Удивительная история овечки Долли // Биология в школе. 1998, № 1. С. 5—9.
3. Гердон Дж. Регуляция функции генов в развитии животных. М.: Мир, 1977.
4. Гилберт С. Биология развития: В 3 т. М.: Мир, 1993—1995.
5. Рингерц Н., Севидж Р. Гибридные клетки. М.: Мир, 1979.
6. Серов О. Л. Перенос генов в соматические и половые клетки. Новосибирск: Наука, 1985.
7. Харрис Г. Ядро и цитоплазма. М.: Мир, 1973.
8. Wakayama T., Perry A., Zuccotti M. et al. Full term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei // Nature. 1998, V. 394. P. 369—373.

1.2 Вопросы для повторения

1. Как была доказана ведущая роль ядра в формообразовании у растений?
2. Как была доказана ведущая роль ядра в формообразовании у животных?

3. Обратимы ли изменения ядер в процессе онтогенеза?
4. Для чего используется метод трансплантации ядер?
5. Что такое клонирование животных?
6. С какими проблемами приходится сталкиваться при клонировании животных?
7. Как цитоплазма влияет на функции ядра? Работы Дж. Гердона.
8. Что такое гетерокарионы?
9. Что такое периодичность в морфогенетической активности ядер? Работы А.А.Нейфаха.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В РАЗВИТИИ

КАК УСТРОЕН ГЕН?

Закономерности экспрессии генов у эукариот и прокариот различны. У последних факт транскрипционной активности в подавляющем большинстве случаев означает появление соответствующего белкового продукта. Иными словами, в этом случае понятия активности гена и его экспрессии практически совпадают. У эукариот картина гораздо более сложная. Транскрипция гена у них еще не означает его экспрессии в фенотипе, поскольку на пути синтеза конечного продукта стоит множество генетически регулируемых звеньев метаболической реакции, включающих посттранскрипционные, трансляционные и посттрансляционные события, а также влияния, осуществляемые на организменном уровне (в частности, эффекты гормональной активности желез внутренней секреции). Путь от гена к молекулярному признаку, им контролируемому, тернист и не всегда "проходим".

При этом следует отметить, что среди молекулярных биологов практически отсутствует единое определение понятия "ген". В сущности, налицо два подхода к этой проблеме. Одни генетики подразумевают под геном единицу транскрипции, т.е. такой участок ДНК, который включает в себя последовательности, кодирующие какой-то продукт, другие относят к гену и окружающие его регуляторные зоны — промоторы, энхансеры, сайленсеры и т.д. Для большей простоты изложения я буду придерживаться второй точки зрения.

В таком случае *тонкая структура гена*, согласно современным представлениям, выглядит, как это показано на рис. 3.1, А. Как следует из рисунка, ген состоит из *экзонов*, кодирующих последовательности ДНК, и *интронов*, не кодирующих последовательности ДНК, разделяющих экзоны. Количество тех и других варьирует от одного до нескольких десятков. Рекордное число интронов (около 50) найдено в коллагеновом гене (рис. 3.2). Размеры интронов и экзонов также колеблются в широких пределах. В коллагеновом гене есть экзоны длиной в 45—54 п.н., каждый из них кодирует последовательность из 15—18 аминокислот. Размер интронов

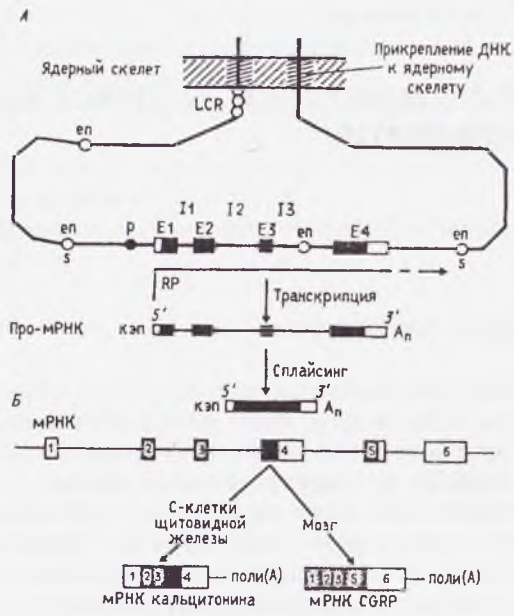


Рис. 3.1. Современные представления о структурно-функциональной организации генетической системы.

А. Схема организации гена, построенная на основании данных молекулярной биологии и генетики. Е — экзоны; I — интроны; LCR — последовательность, контролирующая локус; ep — энхансер; s — сайленсер; p — промотор; RP — РНК-полимераза; A_n — поли (А) (по: Георгиев, Корочкин, 1995).

Б. Альтернативный сплайсинг для гена кальцитонина/СGRP. В С-клетках щитовидной железы для формирования мРНК кальцитонина используются экзоны 1,2,3 и 4. В клетках мозга для синтеза мРНК нейропептида CGRP используются экзоны 1,2,3,5 и 6 (по: Grenshaw et al., 1987)

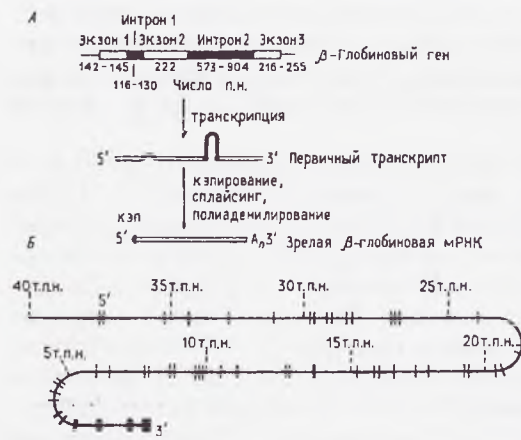


Рис. 3.2. Экзон-интронная структура эукариотических генов (по: Георгиев, 1989).

А — бета-глобиновый ген млекопитающих (цифры дают вариации размеров экзонов и интронов). Дано схематическое изображение про-мРНК и зрелой мРНК. Экзон 1 дает 5'-нетранслируемую область (30 нуклеотидов) и кодирует аминокислоты 1-30, экзон 2 кодирует аминокислоты 31-104, экзон 3 — аминокислоты, начиная со 105-й до С-конца, и 3'-нетранслируемую область. Б — 1-альфа-2-коллагеновый ген курицы. Он состоит из более чем 50 экзонов (широкие блоки) и интронов (тонкая линия), занимающая в геноме область в 38 тыс. нуклеотидных пар

иногда составляет лишь десятки пар нуклеотидов, но в ряде случаев (некоторые гены дрожофилы) достигает нескольких десятков тысяч.

КАК “РАБОТАЕТ” ГЕН?

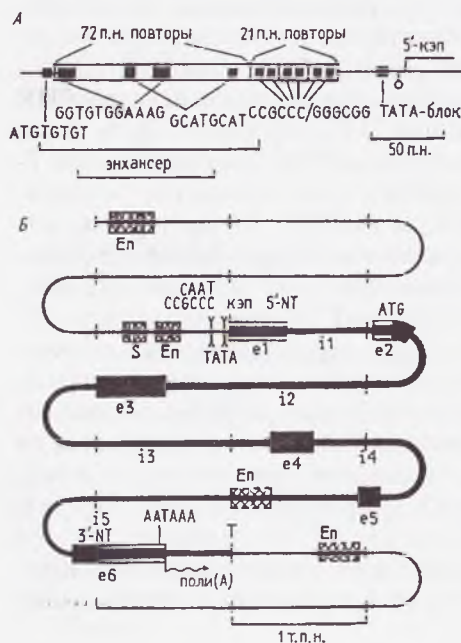
Кодирующая часть гена начинается иницирующим кодоном и заканчивается терминирующим. Она лежит в центральной части мРНК и транслируется в полипептид. Ей предшествует 5'-нетранслируемая область, а за ней следует 3'-нетранслируемая область. Размеры нетранслируемых областей варьируют от одной мРНК к другой. Вероятнее всего, эти последовательности участвуют в регуляции процессов трансляции. Имеются данные, что 3'-нетранслируемая область определяет время жизни мРНК, а последовательности 5'-нетранслируемой области могут влиять на эффективность процесса трансляции.

В клетках эукариот мРНК образуются в результате сплайсинга первичного транскрипта, т.е. про-мРНК, включающего копии как экзонов, так и интронов. *сплайсинг* — это процесс “вырезания” копий интронов и соединений экзонных транскриптов в единую молекулу мРНК. Обычно про-мРНК в несколько раз (иногда в десятки раз) больше, чем зрелая мРНК. Благодаря наличию экзонов и интронов становится возможным такое явление, как *альтернативный сплайсинг (процессинг)*, когда объединение различных экзонов одной и той же транскрипционной единицы позволяет образовываться нескольким разным РНК, синтезирующим разные белки (см. рис. 3.1, Б). Для большинства генов начало мРНК и начало первичного транскрипта на ДНК совпадают. Сразу после начала транскрипции к 5'-концу про-мРНК присоединяется 7-метилгуанозин трифосфатная группа — это называется “кэпированием” 5'-конца. “Кэп” сохраняется в мРНК. Таким образом, начало единицы транскрипции совпадает с началом мРНК. Его обозначают как *точку инициации* транскрипции, или как кэп-сайт. 5'-конец первичного транскрипта про-мРНК тоже совпадает с 3'-концом мРНК. В большинстве случаев он подвергается химической модификации: к нему присоединяются аденилатные остатки, в результате чего формируется поли(А) длиной 100—250 нуклеотидов. Однако на самом деле транскрипция не останавливается на этом месте, а РНК-полимераза продолжает свое движение и осуществляет синтез РНК еще на том или ином отрезке ДНК. Последний может достигать и нескольких сот пар нуклеотидов. Затем в так называемой зоне терминации, также варьирующей по длине, транскрипция затухает и РНК-полимераза освобождается с матрицы.

Вскоре после того, как РНК-полимераза прошла участок полиаденилирования еще до окончания транскрипции, в новообразованной РНК в этом месте происходит разрыв с последующим полиаденилированием 3'-конца. Поэтому концом транскрипта, или про-мРНК, считают сайт полиаденилирования, который также является общим для про-мРНК и мРНК. Про-мРНК подвергается в клеточном ядре *процессингу* (созреванию), который осуществляется посредством сплайсинга.

РЕГУЛЯТОРНАЯ ЧАСТЬ ГЕНА

К кодирующим последовательностям ДНК примыкают регуляторные, лежащие за пределами единицы транскрипции, иногда на расстоянии нескольких десятков тысяч п.н. Они представлены на рис. 3.3. Это *промотор*, участок ДНК, расположенный обычно перед кэп-сайтом и определяющий правильность инициации транскрипции, а в ряде случаев — ее достаточно высокий уровень и тканевую специфичность. В большинстве промоторов центральным элементом является так называемый ТАТА-блок (рис. 3.3) — последовательность, которая в усредненном виде выглядит как ТАТААА и окружена короткими районами, относительно обогащенными GC-парами. ТАТА-блок располагается на расстоянии 25 п.н. перед кэп-сайтом. Кроме того, в районе длиной примерно 100 п.н. перед кэп-сайтом часто выявляются другие характерные последовательности, например СААТ или ССГССС. Наличие ТАТА-блока определяет правильную точку начала транскрипции. Наличие дополнительных характерных последовательностей



примерно 100 п.н. перед кэп-сайтом часто выявляются другие характерные последовательности, например СААТ или ССГССС. Наличие ТАТА-блока определяет правильную точку начала транскрипции. Наличие дополнительных характерных последовательностей

Рис. 3.3. Регуляторные последовательности эукариотического генома (по: Георгиев, 1989).

А — регуляторные последовательности эукариотического вируса SV40: — “сердцевинные” последовательности энхансера и важнейшие элементы промотора; Б — схема “усредненного” эукариотического гена, состоящего из 6 экзонов (е) и 5 интронов (i) (в масштабе). Указаны энхансеры (En) и сайленсер (S) с их сердцевинными последовательностями (блоки внутри), возможные локализации энхансеров, элементы промотора, нетранслируемые области (5' — NT и 3' — NT) гена, иницирующий кодон (AUG)

тей усиливает промотор, делает транскрипцию с него более эффективной. Промотор, в частности ТАТА-бокс, служит для связывания с ДНК *факторов транскрипции*, необходимых для последующего образования активного комплекса РНК-полимеразы с ДНК и запуска синтеза РНК при участии последней.

Хотя структура промотора влияет на эффективность транскрипции, основной контроль последней осуществляется *цис-элементами*, расположенными за пределами промотора и часто за пределами гена. Эти *цис-регуляторные последовательности* бывают нескольких видов:

- *энхансеры* (усилители), усиливающие транскрипцию;
- *сайленсеры* (ослабители), ослабляющие транскрипцию;
- *инсуляторы (MAR/SAR-последовательности)*, обеспечивающие относительную автономность функций гена и его регуляторных последовательностей, т.е. относительную независимость транскрипции от функционального состояния соседних генов.

Цис-регуляторные элементы генома представляют собой места связывания с ДНК регуляторных белков. Благодаря гибкости молекул ДНК образуются ПЕТЛИ ДНК, осуществляющие процесс транскрипции. Регуляторные белки могут входить в контакт с белками промоторного комплекса или непосредственно с РНК-полимеразой, вызывая активацию или подавление транскрипции. В силу этого место расположения регуляторного элемента на ДНК не играет обычно решающей роли. Так, энхансеры или сайленсеры могут быть обнаружены в самых разных местах по отношению к единице транскрипции. Они часто находятся перед геном на расстоянии 3—10 и более тыс. п.н. от кэп-сайта. Они могут находиться в интронах, за сайтом полиаденилирования, перекрывать с кодирующими последовательностями. Основная их функция заключается, по-видимому, в изменении конформации ДНК и соответственно ее функционального состояния. Обычно один ген контролируется несколькими энхансерами и сайленсерами.

Энхансеры — короткие последовательности ДНК (обычно 100—200 пар оснований), они могут действовать на больших расстояниях, независимо от того, локализованы ли они до точки инициации синтеза РНК или после точки терминации. Они изменяют транскрипционную активность генов через создание наиболее благоприятной для транскрипции конформационной ситуации в соответствующем участке ДНК. Энхансеры, как правило, состоят из нескольких модулей, коротких олигонуклеотидов, каждый из которых отвечает за связывание определенного регуляторного белка (рис. 3.4).

Таким образом, каждый энхансер может взаимодействовать с целым рядом регуляторных белков. Последние могут вырабатываться лишь в определенных тканях, и тогда энхансер обладает ткане-

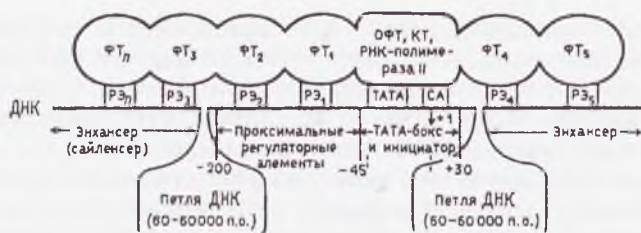


Рис. 3.4. Межмолекулярные взаимодействия на промоторе РНК-полимеразы II (по: Патрушев, 2000).

РЭ₁—РЭ₅ — последовательности нуклеотидов регуляторных элементов промотора; ФТ₁—ФТ₅ — взаимодействующие с ними регуляторные факторы транскрипции; ОФТ — основные факторы транскрипции; КТ — коактиваторы транскрипции; +1 — точка инициации транскрипции

вой специфичностью. Взаимодействие белкового фактора и энхансера может контролироваться низкомолекулярными соединениями, гормонами, металлами и другими веществами, что позволяет включать и выключать некоторые гены с помощью этих соединений.

Между энхансерами и сайленсерами не существует четкого разграничения. *Одна и та же последовательность может выступать и в роли энхансера, и в роли сайленсера, в зависимости от того, какие регуляторные белки вырабатываются в клетках данного типа.*

В интерфазных ядрах эукариот нити хроматина, в которых упакована ДНК, организованы в виде топологически независимых петель длиной 500—100 тыс. п.н. Эти петли получили название *хромомеров*. Образование хромомеров возможно благодаря наличию у их основания специфических последовательностей нуклеотидов, которые взаимодействуют с ядерным матриксом (или с ядерным скэффолдом — скелетом) — сетчатой структурой внутри интерфазного ядра, которая образована белками и РНК. Эти последовательности нуклеотидов, взаимодействующие с ядерным матриксом, получили название *MAR* (Matrix Associated Region), или *SAR* (Scaffold Associated Region), или *MAR/SAR*. Их длина составляет около 300—1000 п.н. У дрозофилы они богаты АТ и содержат многочисленные сайты взаимодействия ДНК/белок. Возможно, именно *MAR/SAR* последовательности, фланкирующие активные домены хроматина, выполняют функции *инсуляторов*, или регуляторной области локусов (Locus Control Regions — LCR). Трансгены, фланкируемые инсуляторами, функционируют автономно в чужеродном геноме, на их активности не сказывается влияние соседнего эу- или гетерохроматина.

Таким образом, *инсулятор* — это *цис*-регуляторный элемент, который блокирует взаимодействие между энхансером и промотором, если он расположен между ними. При этом ни энхансер, ни промотор сами по себе не теряют своей функциональной ак-

тивности. Наиболее изученным инсулятором является *su(Hw)*-связывающий район, который входит в состав ретротранспозона мдг4 *Drosophila melanogaster* и состоит из 12 октамерных сайтов связывания для белка *su(Hw)*. Уменьшение числа сайтов связывания приводит к ослаблению инсуляторной функции.

Известно, что геномная ДНК организована в специфические структурно-функциональные участки — *домены*, которые представлены петлями размером 100—200 тыс. п.н., прикрепленные своими концами к белковым структурам ядерного скелета (матрикса). Именно в результате этого LCR могут ограничивать домены ДНК и препятствовать влиянию на ген последовательностей, лежащих за пределами данной петли. Согласно модели, разработанной в Институте биологии гена РАН С.В.Разиным и О.В.Яровой (она очень напоминает схему, предложенную в конце XIX в. Хольмгреном на основании его тонких гистологических исследований), элементы ядерного скелета представляют собой микроканальцы, связанные с ядерными порами. Петли ДНК аранжированы вокруг этих канальцев так же, как в современной архитектуре вокруг башни с лифтом располагаются отдельные модули здания. Внутренний матрикс ядра представляет собой сеть канальцев, обеспечивающих возможность транспорта различных веществ: ферментов, предшественников ДНК и РНК, регуляторных белков, а также РНК — из ядра в цитоплазму. Канальцы могут местами расширяться и ветвиться, образуя каверны, вокруг которых собраны кластеры репликаонов и транскрипционные фокусы (рис. 3.5).



Рис. 3.5. Модель организации интерфазной хромосомы, основанная на предположении о том, что ядерный матрикс представляет собой систему канальцев (по: Ярова, 1997)

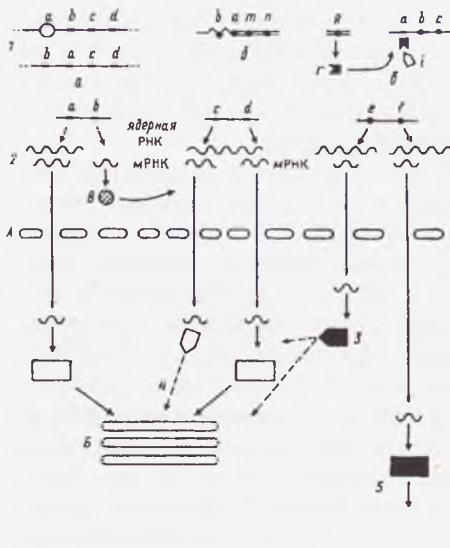


Рис. 3.6. Схема уровней регуляции экспрессии генов, проявляющихся в различных генных взаимодействиях (по: Корочкин, 1981).

1 — взаимодействие генов на транскрипционном уровне, включающее эффекты инверсии (а), транслокации (б) и индукции по типу Жакоба и Моно (в). а—d — структурные гены; R — ген-регулятор; г — репрессор, и — индуктор.

2 — посттранскрипционная регуляция на уровне процессинга или скорости транспорта мРНК из ядра в цитоплазму. В — комплекс, регулирующий процессинг; 3 — взаимодействие генов на уровне регуляции скорости синтеза и деградации продукта; 4 — действие генов, контролирующих связывание продукта трансляции с клеточными мембранами, ингибиторами или другими веществами; 5 — действие генов, контролирующих синтез продуктов, которые осуществляют различные межклеточные взаимодействия (морфогенетические движения, индукцию и т.д.). А — ядерная, Б — клеточная мембрана

Каким образом осуществляется в рамках этой системы и за ее пределами, в цитоплазме клетки, генетическая регуляция экспрессии генов, выход в фенотип определенной наследственной программы, записанной в ДНК генома?

Рассмотрим различные уровни регуляции экспрессии генов у эукариот, которые схематически представлены на рис. 3.6.

МНОГОУРОВНЕВЫЙ ПРИНЦИП РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

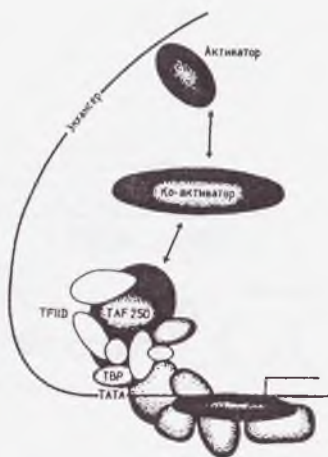
Транскрипционный уровень

Этот уровень обеспечивается состоянием ДНК и связанных с ней белков хромосомы, в частности, структурных единиц хромосомы — нуклеосом. Они формируются в результате взаимодействия ДНК с основными белками — гистонами. Нуклеосомные частицы состоят из двух полных витков ДНК (83 п.н. на виток), закрученных вокруг “кора”, представляющего собой гистоновый октамер. Белковый кор содержит по 2 молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Полипептидная цепь гистонов содержит от 102 до 135 аминокислотных остатков, а общий вес октамера составляет примерно 100 кДа. В деконденсированной форме хроматина каждая такая “бусинка” связана с соседней частью нитевидным участком линкерной ДНК.

Транскрипция сопровождается формированием так называемого преинициационного комплекса (PIC), состоящего более чем из 50 отдельных полипептидов, расположенного рядом с сайтом

Рис. 3.7. Компоненты транскрипционной регуляции (по: Mizzen, 1998).

Жирная кривая линия представляет ДНК. Модель основана на физическом взаимодействии активаторов, коактиваторов и гуанозинтрифосфата. Связывающийся с энхансером транскрипционный активатор связывает также белок-коактиватор, который в свою очередь связывает субъединицу TAF 250 белка TFIID. Двусторонние стрелки отражают взаимодействие между этими компонентами. Эти взаимодействия обеспечивают формирование транскрипционного комплекса, способствующего функционированию РНК-полимеразы II и процессу транскрипции



инициации синтеза РНК. Важнейшую роль в этом комплексе играет набор общих транскрипционных факторов (TFIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH), а также РНК-полимераза. TFIID — мультимерный белковый

комплекс, состоящий из связывающего ТАТА-бокс белка (ТВР) и набора ассоциированных с ТВР факторов (TAF_{II}s). Ему принадлежит критическая роль в этом процессе, поскольку только компонент PIC способен специфически связываться с промотором (рис. 3.7; 3.8).

Процессы, влияющие на транскрипцию. Обнаружено два вида процессов, влияющих на транскрипцию, — *метилирование*, действующее непосредственно на ДНК, и *ацетилирование*, действующее на белки хромосом.

Метилирование осуществляется с помощью специального фермента метилазы и заключается в присоединении метильной группы к цитозину. Это изменяет конформацию ДНК и таким способом оказывает влияние на процесс транскрипции. Особенно демонстративные доказательства этого влияния были получены при исследовании развивающихся эритроцитов человека и курицы. Оказалось, что в них ДНК, кодирующая глобины и синтезирующая соответствующую мРНК, полностью неметилирована, в то время как те же гены в клетках, не синтезирующих глобины, метилированы в высокой степени (рис. 3.9, А, Б). Процессы переключения с одного синтеза на другой (например, одного типа иммуноглобулинов на другой тип) также сопровождаются деметилированием. При этом состояние метилирования может передаваться от клетки ее потомкам в ходе клеточного деления. Характерно, что ядра первичных половых клеток у самцов и самок очень слабо метилированы, но гены спермия и яйца, напротив, интенсивно метилированы. Паттерн метилирования данного гена (генов) в яйце и спермии может различаться. Это — материнский и отцовский *импринтинг*, который привносит дополнительную информацию в наследуемые геномы, и она может регулировать по-



Рис. 3.8. Регуляция транскрипции РНК-полимеразой II (по: Jones, Kadonaga, 1992).

В этой модели начальная ступень транскрипционной активации включает узнавание области промотор/энхансер последовательностями специфических ДНК-связывающих факторов. Эти факторы собирают АТФ-зависимые, хроматин-ремоделлирующие элементы к матрице. Хроматин-ремоделлирующие факторы катализируют мобилизацию нуклеосом. Дополнительно промотор/энхансер-связывающие факторы способствуют прямо или непрямо ассоциации ацетилаз (таких как СВР/р300, PCAF/Gen5, SRC/p160), которые модифицируют коровые гистоны и другие белки, существенные для инициации транскрипции. Ацетилирование белков действует, возможно, благодаря множественным механизмам изменения конформации хроматина, модуляции аффинности ДНК-связывающих факторов и регуляции активности транскрипционных факторов и кофакторов. Промотор/энхансер-связывающие факторы взаимодействуют также с большим мультисубъединичным комплексом, который имеет родственные формы, известные как TRAP, ARC, DRIP, SMCC, NAT, SRB, и медиатор — MED (не все показаны на рисунке). Этот комплекс взаимодействует с РНК-полимеразой II, чтобы облегчить связь с основной транскрипционной машиной. Имеются также прямые взаимодействия между TAF-субъединицами (TBP-ассоциированные факторы) TFIID-комплекса и промотор/энхансер-связывающими факторами. Область инсулятора изолирует транскрипционно активный домен от влияния соседних областей

ведение хромосом и экспрессию генов на транскрипционном уровне в пространстве и времени (рис.3.9, В).

Метилирование, следовательно, является существенным моментом в организации транскрипционного уровня регуляции активности генов, но не является универсальным. Даже среди позвоночных, где оно широко распространено, некоторые гены обладают способностью к транскрипции и в метилированном состоянии. У дрозофилы метилаза отсутствует, метилирования ДНК у нее не происходит, что не мешает, однако, нормальному индивидуальному развитию мухи.

В последнее время все больше внимания уделяется еще одному способу регуляции транскрипционной активности — ацетилированию гистонов, которые организуют нуклеосомы, структурные элементы хромосом.

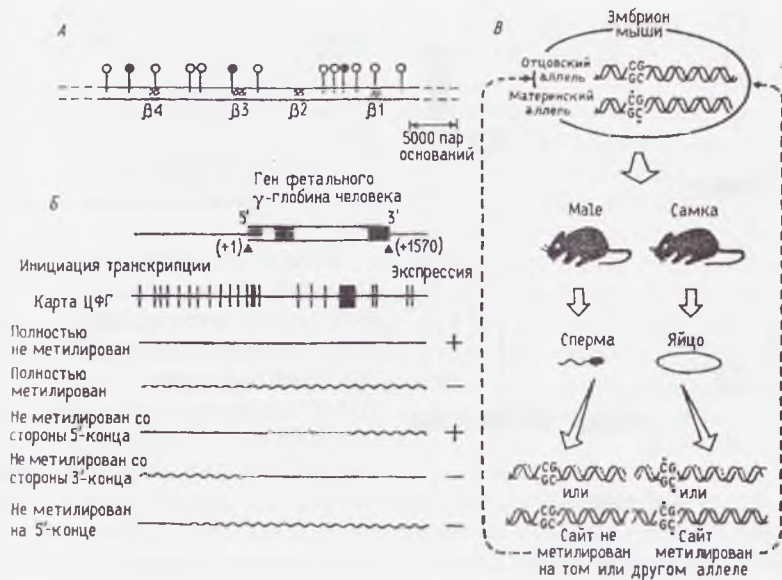


Рис. 3.9. Схема метилирования глобиновых генов.

А — метилирование бета-цепей глобина кролика (по: Shen, Maniatis, 1980). Каждый ген глобинового кластера представлен заштрихованным квадратом. Последовательности CCGG обозначены кружками, причем черными кружками обозначены те из них, которые полностью метилированы только в клетках, не транскрибирующих глобины.

Б — метилирование контролирует транскрипцию клонированного гена фетального гамма-глобина человека. На верхней диаграмме показаны клонированный глобиновый ген и его 5- и 3'- фланкирующие области. Экзоны обозначены черным цветом, интроны — белым, фланкирующие области — тонкими линиями. Под диаграммой дана карта возможных сайтов метилирования ДНК, которые представляют собой участки, где присутствует динуклеотид CpG. Под этой картой приведены схемы метилирования пяти изученных клонов. Прямые линии — неметилированные сегменты, волнистые — метилированные. Знаки (+) и (-) с правой стороны рисунка указывают на то, экспрессировались или не экспрессировались данные сегменты (по: Busslinger et al., 1983).

В — импринтинг посредством метилирования различает отцовский и материнский аллели в ходе гаметогенеза у мышей (по: Lewin, 1998)

Впервые о посттрансляционном ацетилировании гистонов сообщили в 1964 г. американский биохимик В.Оллфри (V.Allfrey) с коллегами, которые обнаружили, что неацетилированные гистоны тормозят транскрипцию ДНК на первом этапе экспрессии гена, в то время как ацетилирование гистонов редуцирует это торможение. Оллфри предположил, что ацетилирование “разрыхляет” связь ДНК с гистонами и как бы “открывает” ген, делая его доступным действию активирующих транскрипцию регуляторных белков, тогда как деацетилирование уплотняет структуру хроматина и закрывает доступ различного рода активирующим агентам.

В последующем было показано, что ацетилирование обратимо и осуществляется по специфическим лизиновым остаткам, которые локализованы в NH_2 -терминальном домене гистонов.

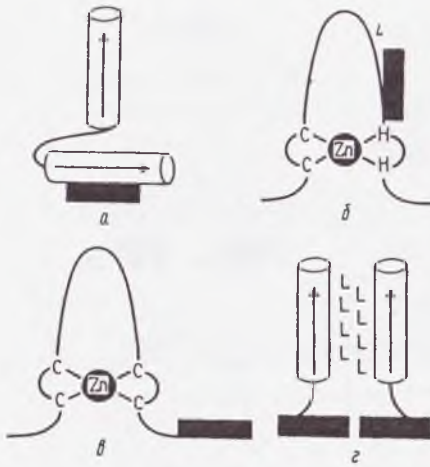


Рис. 3.10. Модели различных доменов в молекулах белков, связывающихся с ДНК (по: Struhl, 1989)

a — спираль-поворот-спираль (НТН), стрелки указывают направление спирали белка; *b* — “цинковые пальцы” цистеин-гистидин (С—Н); *в* — цистеин-цистеиновый “цинковый палец”; *г* — лейцин-лейциновая (L) “застежка” (“zipper”). Затемненные прямоугольники — участки контакта с ДНК

Белки, регулирующие транскрипцию. Описаны многочисленные негистоновые белки, способные связываться с ДНК и регулировать экспрессию генов на транскрипционном уровне. За связывание с ДНК ответственны небольшие участки (домены) белковой молекулы, содержащие до 100 аминокислот, которых достаточно для придания молекуле белка специфической конформации, необходимой для этого связывания. Различают три типа таких доменов (рис.3.10):

• *спираль—поворот—спираль* (helix-turn-helix, НТН) — эта структура продуцируется гомеозисными генами и построена из двух альфа-спиралей, которые разделены бета-поворотом.; одна из спиралей — “спираль узнавания” — ложится в большую бороздку связываемой молекулы ДНК, другая располагается в малой бороздке;

• “цинковые пальцы” — активаторы транскрипции, играющие важную роль в развитии и определении пола; молекула содержит от 2 до более чем 10 повторяющихся единиц, состоящих из 30 аминокислотных остатков. В них входят 7—11 атомов цинка;

• “лейциновая застежка” (лейциновый zipper) — молекула этого белка содержит 4—5 остатков лейцина, которые отделены друг от друга семью другими аминокислотами. Наличие другой такой последовательности молекул лейцина в альфа-спирали белка позволяет им замыкаться наподобие застежки “молния”.

Эффект положения. Различного рода молекулярные преобразования ДНК и хромосомных белков, вызываемые многими факторами, отражаются на компактизации ДНК и могут инициировать ее плотную упаковку, которая морфологически регистрируется как *гетерохроматин*. Гетерохроматиновые районы ДНК, как правило, не транскрибируются и являются важным фактором транскрипционной регуляции. В геноме присутствует также и конститутивный гетерохроматин, который состоит из высокоповторяющихся

сателлитных ДНК и, хотя сам не транскрибируется, способен влиять на активность смежных областей генома. Если тот или иной ген в результате инверсии или транслокации попадает в гетерохроматиновую зону, он теряет способность к транскрипции, и этот феномен обозначают термином *эффект положения*. Он возникает в результате компактизации участков ДНК, приближенных к гетерохроматину. Примером служит инверсия у *D.melanogaster*, приближающая ген *white*, отвечающий за пигментацию глаз, к гетерохроматину. У мух, несущих эту инверсию, наблюдается мозаичная окраска глаз. Это свидетельствует о том, что экспрессия гена *white* в одних клетках репрессируется, а в других — нет, что прямо коррелирует со степенью распространения гетерохроматизации.

Гетерохроматизация близлежащих эухроматиновых районов, при которой стабильно наследуется репрессированное состояние генов в определенной субпопуляции клеток, получила название *эффекта положения мозаичного тина* (PVE — Position Variegation Effect). Приобретенное конденсированное состояние хроматина может привести к полной репрессии транскрипции потенциально активных эухроматиновых генов. В случае PVE инактивация гена в каждой данной клетке происходит статистически, на ранних стадиях развития, а затем приобретенное репрессированное состояние поддерживается в потомстве каждой конкретной клетки. PVE чувствителен к различным воздействиям, включая температуру и разные генетические факторы: присутствие дополнительной Y-хромосомы, влияние генов-модификаторов и др. У дрозофилы известно более 120 локусов, мутации в которых влияют так или иначе на PVE:

- десять локусов *suppressor of variegation {Su(var)}*, которые супрессируют эффект PVE, находясь в трех копиях на геном;
- 75 локусов *Su(var)* супрессируют PVE, находясь в одной копии;
- десять локусов *E(var) — Enhancer of variegation* — усиливают действие PVE, находясь в одной копии на геном;
- около 25 локусов усиливают PVE, будучи в одной копии.

Столь большое количество генов может влиять на PVE в связи с тем, что гетерохроматин имеет сложное строение, обусловленное взаимодействием большого числа белков и ДНК. Любые мутационные изменения в том или ином белке влекут за собой определенные сдвиги во взаимоотношениях белков хроматина и в его конформационном состоянии.

Известны и белковые продукты генов, влияющих на PVE. Так, ген *Su(var)2-5* кодирует белок HP1, основной структурный белок гетерохроматина. Этот белок ассоциирован с прицентромерным гетерохроматином и гетерохроматиновыми районами 4-й хромосомы. Он состоит из 167 аминокислот и высококонсервативен, его гомологи обнаружены у мыши и человека. Другой ген *Su(var)3-*



Рис. 3.11. Игорь Федорович Жимулев (член-корреспондент РАН) и Елсна Сергеевна Беляева — новосибирские цитогенетики, проложившие новые пути в исследовании функционирования политенных хромосом дрозофилы.

Показали ограниченность концепции “один диск — один ген” и доказали возможность содержания нескольких генов в одном диске. Внесли существенный вклад в исследования механизмов эффекта положения и регуляции генной активности в политенных хромосомах

7 также принадлежит к структурным компонентам гетерохроматина, он взаимодействует с белком HP1, включает 1169 аминокислот и содержит домен цинковых пальцев на N-конце. Увеличение дозы этого гена приводит к усилению PVE. Гетерохроматизация может быть связана с тем, что по соседству с эухроматиновым геном оказывается протяженный фрагмент гетерохроматина, состоящий из повторяющихся сателлитных последовательностей.

Сателлитные последовательности могут играть важную роль в регуляции активности генов в ходе индивидуального развития, так или иначе влияя на конформацию уникальной ДНК и особенности ее экспрессии в пространстве и времени. Косвенным подтверждением этому служат различия в составе сателлитной ДНК в разных органах *Drosophila virilis*. В геноме целой мухи выявлено три фракции сателлитной ДНК. Соотношение этих фракций в разных органах мухи существенно различается, что свидетельствует, во-первых, о возможной роли сателлитной ДНК в регуляции клеточной специфики и, во-вторых, о молекулярных и структурных изменениях ядра в процессе дифференцировки. В частности, Р.Хеникофф (Henikoff) описал транслокацию примерно одного миллиона пар минисателлита GAGA в район гена *brown*, которая приводила к супрессии гена и образованию гетерохроматина. Сателлит GAGAAA длиной 1000 п.н. недостаточен для индукции PVE, но более короткий сателлит ATATAA в конструкции, инъецированной в геном дрозофилы, способен индуцировать PVE гена *white*. Более того, подобная конструкция с высокой частотой встраивается в гетерохроматиновые районы. Гетерохроматизации иногда подвергаются достаточно обширные области хромосомы. Важную роль в этом процессе играют белки, содержащие “цинковые пальцы”.

Значительный вклад в изучение механизмов эффекта положения мозаичного типа внесли отечественные генетики, в особенности школы И.Ф.Жимулева и Е.С.Беляевой (рис. 3.11), а также

Рис. 3.12. Владимир Алексеевич Гвоздев. Член-корреспондент РАН. Лауреат Государственной премии. Автор оригинальных представлений о роли подвижных генетических элементов в регуляции активности генов и связанных с этим эволюционных преобразованиях.

Одним из первых исследовал дозовую компенсацию и эффект положения у дрозофилы, внес большой вклад в этот раздел генетики



В.А.Гвоздева (рис. 3.12). В лаборатории И.Ф.Жимулева предложена модель формирования эффекта положения мозаичного типа, основанная на предположении о статистическом распределении неких белков-компактизаторов вокруг центров инициации компактизации. При этом предполагается, что 1) центры инициации компактизации присутствуют как в эухроматине, так и в гетерохроматине и 2) молекулы белков-компактизаторов способны связываться не только с сайтами в хроматине, но и друг с другом, формируя мультимерный комплекс. В результате стохастической ассоциации молекул белков-компактизаторов вокруг центров инициации компактизации становится возможным взаимодействие этих молекул друг с другом. В таком случае центры инициации могут связать такое количество молекул-компактизаторов, которое достигает некоего критического значения — порога компактизации, следствием чего является необратимый процесс, т.е. образование гетерохроматинового домена. Таким образом, гетерохроматин описывается как область хроматина, содержащая повышенное количество центров инициации компактизации.

В.А.Гвоздев с сотрудниками получили интересные данные о возможных эволюционных истоках некоторых повторов. В частности предполагается, что уникальнейший, специфически экспрессирующийся в семенниках дрозофилы эухроматиновый ген является предшественником двух паралогичных амплифицированных повторов.

Дифференциальная активность генов. Одним из вариантов регуляции экспрессии генов на транскрипционном уровне являются разные типы *дифференциальной активности генов*: в первую очередь *дифференциальная активность родительских геномов*. В этом случае на первых стадиях дробления яиц некоторых животных ядра имеют двойственную структуру, которая определяется относительной независимостью поведения гаплоидных родительских наборов



Рис. 3.13. Александра Алексеевна Прокофьева-Бельговская. Выдающийся российский цитогенетик. Член-корреспондент Академии Медицинских Наук СССР.

Создала отечественную школу цитогенетиков. Внесла существенный вклад в исследование проблемы гетерохроматина. Принимала активное участие в возрождении в России медицинской генетики

ров хромосом. В клетках некоторых гибридов растений обнаружена различная степень спирализации и окрашиваемости хромосомных наборов. Эти исследования были подтверждены при исследовании ранних стадий развития циклопа и рыб замечательным российским цитологом А.А.Прокофьевой-Бельговской (рис.3.13).

Наиболее ярким примером дифференциальной активности целых родительских геномов является феномен инактивации одного хромосомного комплекса у самцов некоторых видов щитовок (мучнистых червецов, кокцид), так как в этом случае цитологические наблюдения подтверждены генетически. На ранних стадиях эмбриогенеза у таких самцов происходит полная гетерохроматизация хромосомного комплекса, полученного от отца, сопровождающаяся инактивацией отцовских генов. В некоторых тканях самцов на определенных этапах развития конденсированные хромосомы возвращаются к эухроматическому состоянию (дегетерохроматизация), и именно эти ткани развиваются ненормально, если организм несет облученный отцовский геном или геном другого вида. Дегетерохроматизация имеет место не во всех клетках, вследствие чего такие ткани становятся функционально мозаичными. Чтобы объяснить механизм инактивации отцовского генома у кокцид, У.Нур (U.Nur) постулировал, что самки производят яйца двух типов — с веществом, которое вызывает гетерохроматизацию отцовского набора, и без него. После оплодотворения первые развиваются в самок, вторые — в самцов.

Инактивация X-хромосомы. Следующий пример дифференциальной активности генов — *дифференциальная активность гомологичных хромосом и их участков*. В первую очередь речь идет о феномене *лайонизации*, открытом М.Лайон (M.Lyon, рис. 3.14). Этот феномен касается инактивации одной из X-хромосом у самок млекопитающих, что объясняет дозовую компенсацию у них. Инактивация одной из X-хромосом у XX-самок обеспечивается ее гетерохроматизацией и формированием гетеропикнотического тельца — полового хроматина, тельца Барра (рис. 3.15). Согласно дан-

Рис. 3.14. Мэри Лайон. Выдающийся английский цитогенетик.

Открыла инактивацию X-хромосомы у млекопитающих. На основании ее работ в мировой генетике сформировалось целое большое направление, посвященное изучению открытого ею феномена, играющего ключевую роль в дозовой компенсации у млекопитающих



ным Лайон, 1) гетеропикнотическая X-хромосома может быть отцовского или материнского происхождения в различных клетках одного и того же животного; 2) эта хромосома генетически не активна. Имеются биохимические данные в пользу того, что инактивирована по крайней мере большая часть X-хромосомы. Во всяком случае, если не

проявляется фракция одного из ферментов, контролируемых локусом X-хромосомы, то не обнаруживается и изофермент, синтез которого определяется геном, расположенным на значительном расстоянии от первого. Такая инактивация стабильна. Так, если от пациентки, гетерозиготной по электрофоретическим вариантам глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (соответствующий ген локализован в X-хромосоме), выделить клон клеток только с быстрой фракцией фермента и такие клетки слить с мышинными фибробластами, то в гетерокарионе проявляется только эта быстрая фракция глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Следовательно, вторая X-хромосома остается в неактивном состоянии.

Встает вопрос о том, в какой момент развития инактивируется одна из X-хромосом. Оказалось, что этот процесс имеет место на довольно ранних этапах эмбрионального развития. В ооцитах и в период раннего дробления функционируют обе X-хромосомы. Так,

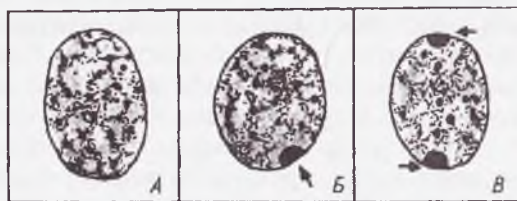


Рис. 3.15. Ядра эпителиальных клеток гортани человека, окрашенные крезил-виолетом (по: Moore, 1977).

А — клетка нормального мужчины (XY) не содержит тельца Барра. Б — клетка нормальной женщины (XX) содержит одно тельце Барра (указано стрелкой). В — клетка женщины с тремя X-хромосомами содержит два тельца Барра; активна только одна X-хромосома

при гетерозиготности по сцепленной с полом глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы в этот период удается обнаружить обе фракции фермента. Одним из показателей инактивации является образование телец полового хроматина (телец Барра). У человека и макаки половой хроматин идентифицирован в клетках трофобласта 10—12-дневной бластоцисты и на 16—19-й дни в клетках зародыша, т.е. на стадии 2000—5000 клеток. При этом у 13-дневных зародышей человека половой хроматин выявляется в 14% клеток трофобласта, но отсутствует в мезодерме хориона (как и в клетках зародыша). Близкие результаты были получены и при исследовании эмбриогенеза других животных. В опытах с инъекцией одной клетки из бластоцисты мышей, гетерозиготных по гену окраски, сцепленному с X-хромосомой, в бластоцисты-реципиенты мышей (которые несли в аутосомах ген третьей окраски, отличающейся от обеих, контролируемых X-хромосомой) показано, что инактивация X-хромосомы происходит на стадии бластоцисты 3—3,5 дней или на несколько клеточных делений позднее. Есть данные, что *инактивация происходит после обособления клеток эмбриобласта, заметно раньше отделения мезодермы и эктодермы и совпадает по времени с имплантацией.*

Образование полового хроматина наблюдается не во всех клетках зародыша. У зародыша человека трех месяцев, когда в ядрах соматических клеток тельце полового хроматина присутствует, в ядрах оогоний и ооцитов гетеропикноз не выражен. При этом инактивации X-хромосомы в разных типах клеток происходит асинхронно.

П. Расселл (Russell) в 1965 г. предположила, что инактивация X-хромосомы опосредуется одним *цис*-действующим локусом, который она обозначила как *Xic* (X-inactivation center) и который был локализован в X-хромосоме человека и мыши. Было высказано предположение, что он формирует сигнал инактивации, распространяющийся вдоль хромосомы. В дальнейшем удалось продемонстрировать, что *Xic* регулирует как инициацию, так и распространение X-инактивации. В 1991 г. был идентифицирован специфический транскрипт *Xist*, инактивирующий X-хромосому. Этот транскрипт обнаружен только в неактивной X-хромосоме (*X'*) в соматических клетках. *Xist* РНК была выявлена в ядре и колокализирована с неактивной X-хромосомой. У мышей транскрипционная активность гена *Xist* определяется у эмбрионов на стадии 4—8 клеток. Обнаружена также преимущественная экспрессия *Xist* в отцовской хромосоме (*X^h*) на предимплантационной стадии развития.

Сигнал к инактивации X-хромосомы опосредуется регуляторным аппаратом, контролирующим экспрессию *Xist*. Сравнительный анализ продемонстрировал наличие консервативной после-

довательности длиной 100—300 п.н. upstream главного транскрипционного сайта. В этой области были идентифицированы сайты связывания для транскрипционных факторов TFID, SPI, CBF.

Было, наконец, продемонстрировано, что *Xist* РНК занимает большой ядерный домен, соответствующий X' -территории. Слабый синтез этой РНК наблюдается в эмбриональных стволовых (ES) клетках, при этом в стволовых XX-клетках синтез в два раза выше, чем в XYES. Инактивации X-хромосомы связана со стабилизацией *Xist* РНК. Предложены две модели соответствующих молекулярных механизмов этого процесса.

В *первой модели* предполагается, что прежде инициации лайонизации *Xist*-транскрипт дестабилизируется специфическим регулируемым в развитии фактором. Снижение уровня содержания этого фактора ведет к тому, что транскрипт от одного аллеля, остается стабильным (X^o), в то время как транскрипт другого аллеля накапливается (X'). Транскрипция гена *Xist* в X^o -аллеле репрессируется (стадия завершения). Согласно *второй модели*, нестабильный вариант РНК транскрибируется обоими аллелями перед инициацией лайонизации. К началу инактивации одной из X-хромосом синтез нестабильного варианта сохраняется только в одном аллеле (X^o), в то время как другой аллель переходит на режим синтеза стабильного транскрипта (X'). Аллель, синтезирующий нестабильный транскрипт постепенно репрессируется.

Как происходит распространение инактивации вдоль X-хромосомы? По этому поводу также существует две так называемые *way-station модели*, не очень существенно отличающиеся друг от друга (рис. 3.16).

Согласно *первой модели*, *Xist* РНК ассоциируется с высокоаффинным РНК-связывающим сайтом белка (way-station elements), локализованного в X-хромосоме посредством “цис-продвижения”.

Вторая модель утверждает, что *Xist* РНК активно транспортируется РНК-связывающим белком к way-stations на X-хромосоме. В обеих моделях формирование РНК/ДНК/белкового комплекса вблизи *Xic*-локуса индуцирует локальные конформационные изменения хроматина, облегчая таким образом распространение “волны” инактивации.

Дозовая компенсация у дрозофилы. У млекопитающих посредством лайонизации достигается эффект *компенсации дозы*, в результате чего одна X-хромосома самца “справляется” со своими “обязанностями” ничуть не хуже двух хромосом самки. У дрозофилы феномена лайонизации не наблюдается и дозовая компенсация генов обеспечивается с помощью другого регуляторного механизма, компенсирующего различия в количестве генов у самцов и самок. Примером дозовой компенсации на биохимическом уровне у *D.melanogaster* может служить активность 6-фосфоглюко-

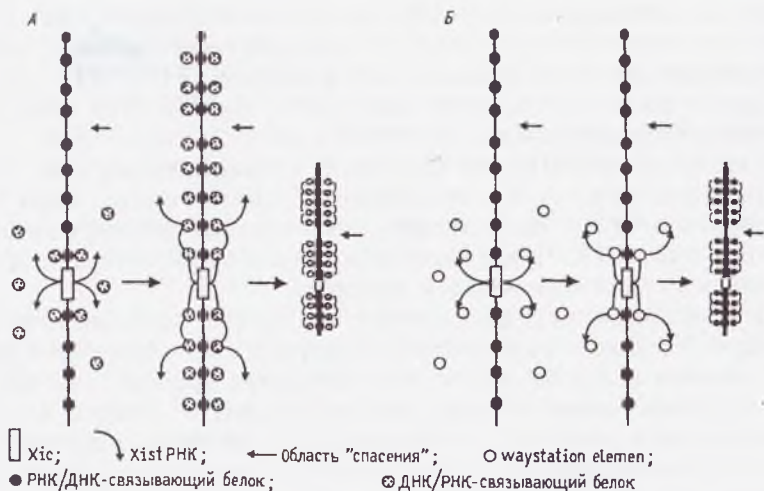


Рис. 3.16. Модель распространения X-инактивации (по: Mizzen, 1998).

А — Xist РНК ассоциируется в *cis*-положении с белками, локализованными в сайтах с высокой аффинностью связывания (way-station elements) в X-хромосоме. Б — Xist РНК активно транспортируется РНК-связывающими белками к way-stations в X-хромосоме. В обоих моделях формирование комплекса РНК/ДНК/белок, близкий к Xic (X inactivation center), будет индуцировать локальные конформационные изменения в хроматине, облегчая распространение волны инактивации

натдегидрогеназы (6-ФГД), контролируемая геном *Pgd*, локализованным в X-хромосоме (рис. 3.17)

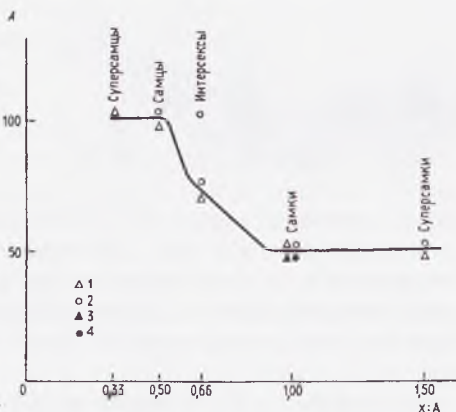
Рисунок демонстрирует прямую корреляцию между уровнем активности фермента и дозой структурных генов у каждого пола. В то же время одна доза гена у самца определяет такую же активность 6-ФДГ, как у самки. Сходные данные были получены и для ряда других ферментов, синтез которых контролируется сцепленными с полом генами, например глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (ген *Zw*). Как выявили В.А.Гвоздев с сотрудниками, сегменты X-хромосомы, контролирурующие различные признаки, проявляют способность к дозовой компенсации независимо от их положения в геноме. Тем не менее в некоторых случаях способность гена к дозовой компенсации может определяться и районом его локализации в хромосоме. Так, ген LSP1-альфа, кодирующий белок гемолимфы личинки дрозофилы и локализованный в X-хромосоме, часто фигурирует в качестве примера отсутствия дозовой компенсации, однако при изменении его локализации в этой же хромосоме он становится компенсируемым.

Механизм дозовой компенсации определяется различиями структурно-функциональной организации половых хромосом у самцов и самок. В частности, *одиночная X-хромосома самца в клетках слюнных желез дрозофилы сильно разрыхлена и в общем имеет*

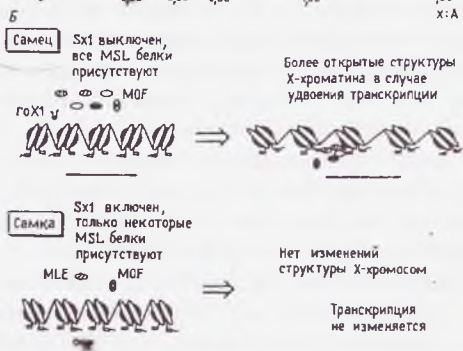
Рис. 3.17. Взаимоотношение X-хромосомы и аутосом.

А — зависимость активности генов X-хромосомы от величины отношения числа X-хромосом к числу наборов аутосом (по Анашьева и др., 1974). По оси абсцисс — отношение половых хромосом и аутосом. По оси ординат — число зерен серебра (1) и активность 6-ФГД (2) в расчете на X-хромосому; 3, 4 — те же характеристики триплоидных самок. Транскрипционная активность X-хромосомы самцов принята за 100%.

Б — дозовая компенсация у дрозофилы (по: Turner, 1998). Диаграмма демонстрирует, как компоненты системы дозовой компенсации взаимодействуют с X-хромосомой, изменяя конформацию ДНК



такую же толщину, как две X-хромосомы самки. Содержание негистоновых белков в одной хромосоме самца примерно соответствует такому (около 80%) в двух хромосомах самки. Согласно данным радиоавтографических исследований, соответственно увеличена и транскрипционная активность X-хромосомы самца, зависящая от уровня компактизации хроматина.



В осуществлении дозовой компенсации играют роль определенные нуклеотидные последовательности типа повторов, которые обеспечивают селективное связывание с белками-продуктами генов *mle*. К ним, в частности, принадлежит повторяющаяся последовательность из 372 пар нуклеотидов, локализованная во многих районах исключительно X-хромосомы дрозофилы, а также простые моно- и динуклеотидные повторы типа AC/GT, общее количество которых в одиночной X-хромосоме почти точно в два раза больше, чем в любой из аутосом. Имеются некоторые данные в пользу того, что иногда может иметь место и компенсация дозы генов в аутосомах. Так, у трисомиков по некоторым аутосомам дрозофилы активность ряда генов и интенсивность синтеза РНК такие же, как у диплоидов.

Дифференциальная активность гомологичных генов. Одним из специфических вариантов транскрипционной регуляции активности генов является дифференциальная активность гомологичных локусов хромосом, выявленная при образовании гетероморфных пuffs (районов интенсивной транскрипции в политеменных хромосо-



Рис. 3.18. Синтез РНК в гетероморфных пухах (помечены стрелками) политенной хромосомы личинки комара. Метод радиоавтографии

мах) у дрозофилы (рис. 3.18). Эта дифференциальная активность регистрируется на основе двух критериев: 1) изменения характера пффинга в гомологичных локусах в зависимости от генотипической среды (например, в разных линиях или в гибридах) и 2) различной степени гетероморфности пффов в отдельных клетках органа.

В серии работ М.Ашбюрнера (M.Ashburner) исследовано поведение нескольких районов хромосом в различных линиях *Drosophila melanogaster* и *D.simulans* и гибридах между ними (рис. 3.19). Так, пфф 64С имеется лишь в линии *vgb* и никогда не обнаруживается в других линиях *D.melanogaster*. В F_1 от скрещивания мух линии *vgb* с мухами других линий можно обнаружить общий, развитый обоими гомологами пфф при синапсисе гомологов, и гетероморфный пфф — только на гомологе линии *vgb* при асинапсисе. Российские генетики Е.В.Полуектова и М.Б.Евгеньев обнаружили сходную ситуацию у гибридов *D.virilis* × *D.texana*.

Для объяснения подобных случаев Ашбюрнер предложил следующую гипотезу (см.рис. 3.19). Он допускает, что имеется регуляторный ген, стимулирующий смежную зону к формированию пффинга, и структурный ген, локализованный в этой зоне. В случае синапсиса продукт регуляторного гена транспортируется во второй гомолог, лишенный способности к формированию пффа вследствие мутации гена-регулятора. Таким образом происходит коррекция пффинга. При асинапсисе регуляторный продукт не достига-

ет гомолога с инактивированным пффом, коррекции пффинга не происходит.

Наибольший интерес представляет асинхронность в дина-

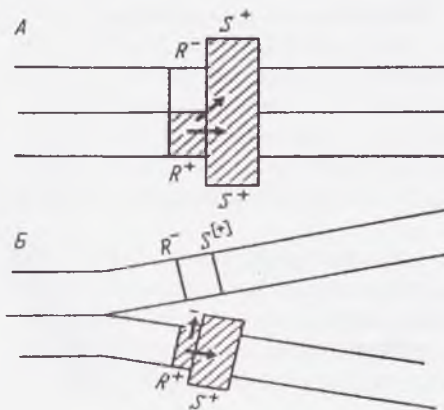


Рис. 3.19. Гипотеза, объясняющая зависимость пффинга от синапсиса у *D.melanogaster*, гетерозиготных по гену-регулятору $R(R^+/R^-)$ (по: Ashburner, 1970)

А — гомологи конъюгируют и сигнал от гена, регулирующего активность пффа, способен активировать оба родительских аллеля. Б — гомологи не конъюгируют, и этот сигнал активирует только структурный ген в *cis*-положении

мике формирования гомологичных пуфов. Примером может служить поведение участка 63E у дрозофилы. *D.melanogaster* и *D.simulans* имеют пуф в этой области, но у *D.simulans* он меньше. В гибриде *D.melanogaster* × *D.simulans* при синапсисе гомологов пуф симметричен, при асинапсисе он формируется сначала на хромосоме *D.melanogaster*, затем на хромосоме *D.simulans*, причем сохраняется автономность в размерах пуфов. Асинхронность редукции гомологичных пуфов при прекращении функционирования клеток ооцитарной железы описана у галловой мушки.

В ряде случаев обнаружена дифференциальная активность *организатора ядрышка* — района хромосомы, где локализованы гены, кодирующие рибосомную РНК (рРНК) и активно ее синтезирующие. Хорошо известно еще с 30-х годов XX в., что у организмов с одной парой ядрышкообразующих хромосом в диплоидных ядрах бывает два ядрышка неодинаковой величины. В пределах одной ткани можно встретить все промежуточные состояния от одного большого и другого очень маленького ядрышка до двух ядрышек одинаковой величины. По-видимому, образование разных по размерам ядрышек происходит вследствие асинхронности активации ядрышковых организаторов в процессе конденсации пронуклеолярного материала, так как уже в это время обнаруживаются различия в величине формирующихся ядрышек.

Феномен аллельного исключения — крайний случай дифференциальной активности гомологичных локусов. Еще одним случаем дифференциальной активности гомологичных генов является феномен, описанный при изучении дифференцировки иммунокомпетентной ткани и известный под названием *аллельное исключение*. Этот феномен имеет место при синтезе иммуноглобулинов (ИГ). Гены, контролирующие этот синтез, локализованы в аутосомах и являются кодоминантными, поскольку у гетерозигот присутствуют продукты (аллотипы) обоих родительских аллелей. Однако каждая зрелая плазматическая клетка у гетерозигот специализируется на синтезе лишь одного из двух аллотипов как легких (L), так и тяжелых (H) цепей ИГ (структура молекулы иммуноглобулина представлена на рис. 3.20). Второй аллотип может продуцироваться лишь в другой клетке.

Прямые доказательства аллельного исключения были получены методом иммунофлуоресценции. Если пометить антисыворотки к разным аллотипам разноцветными флуорохромами, то при микроскопическом анализе популяции плазматических клеток, синтезирующих ИГ, можно видеть популяции из двух типов клеток, окрашенных по-разному. Отсюда следует вывод о специализации каждой клетки на синтезе только одного аллотипа из двух, так что гетерозиготность в данном случае проявляется не на клеточном (там один из генов является доминантным), а на тканевом

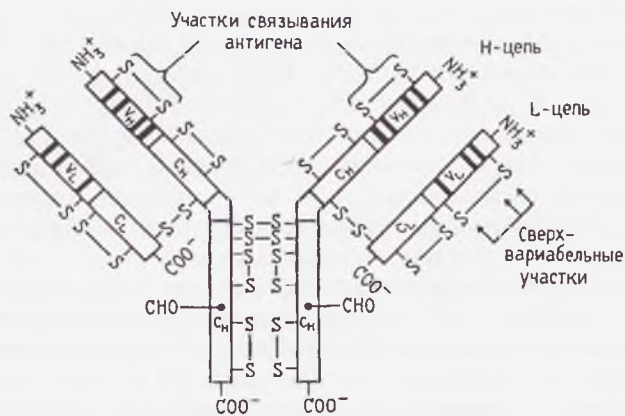


Рис. 3.20. Схема строения молекулы иммуноглобулина

уровне. В целом оба типа клеток обычно распределены случайно, но имеются области, где один из них преобладает.

Каков молекулярно-генетический механизм аллельного исключения? Он был выявлен в 70-е годы XX в. в лаборатории нобелевского лауреата С.Тонегавы (S.Tonegawa). Оказалось, что в ходе дифференцировки В-лимфоцита, — клетки, которая постепенно превращается в плазматическую клетку, синтезирующую и секретирующую ИГ, происходит перестройка (*сплайсинг*) генов легких и тяжелых цепей, в результате которой они становятся способными к транскрипции. Перестройка происходит только в одной из двух гомологичных хромосом. В одних клетках она затрагивает отцовскую хромосому, в других — материнскую. Соответственно в одной из клеток как бы “формируется” функционально активный отцовский ген, в другой — материнский. Рассмотрим эти события на примере формирования генов легких цепей ИГ.

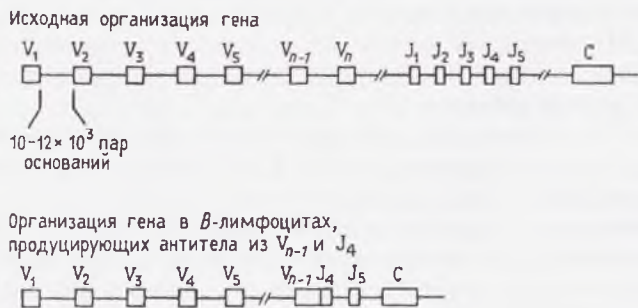


Рис. 3.21. Перестройка генов легких цепей в ходе развития В-лимфоцитов.

До стимуляции антигеном один из 300 или большего числа V-сегментов гена объединяется с одним из пяти J-сегментов гена и сближается с константным (С) сегментом гена

Гены для легких и тяжелых цепей ИГ разделены в лимфоцитах на сегменты. Гены легких цепей состоят из трех сегментов (рис. 1.21). Первый сегмент гена кодирует переменную (V) область легкой цепи. Она содержит около 300 различных последовательностей, кодирующих первые 97 аминокислот легкой цепи антитела. Второй сегмент — J-область — состоит из четырех-пяти возможных последовательностей ДНК для последних 15—17 остатков переменной части легкой цепи антитела. Третий сегмент детерминирует постоянную (C) область легкой цепи. В ходе дифференцировки В-лимфоцита одна из трехсот V-областей и одна из пяти J-областей комбинируются друг с другом и образуют переменную часть гена антитела. Это достигается перемещением последовательности V-области к последовательности J-области — перестройкой, которая сопровождается *элиминацией* промежуточной ДНК. По такому же принципу “формируются” и гены тяжелых цепей.

Таким образом, обширный фактический материал свидетельствует о реальности *дифференциального подавления транскрипции в одном из гомологичных локусов (и даже одной из гомологичных хромосом или целого отцовского генома)*.

Подводя итог, можно заключить, что *возможен по сути дела весь мыслимый спектр различных состояний родительских аллелей, начиная от полной инактивации одного из них и кончая равной активностью обоих. В онтогенезе мы также встречаемся с различными временными показателями включения отцовских и материнских генов — от асинхронного до одновременного. Не исключена возможность того, что в эволюционном аспекте асинхронность включения гомологичных локусов и блоков этих локусов в ходе индивидуального развития является первым этапом на пути к полной инактивации одного из них (путем прогрессирующего отставания по времени включения в функцию). Возможно, это явление распространяется как на половые хромосомы, так и на аутосомы.*

Амплификация и магнификация генов. Своеобразными вариантами регуляции активности генов, многократно усиливающими транскрипцию некоторых конкретных генов, является умножение генетического материала, проявляющееся в *амплификации и магнификации*.

Амплификация заключается в том, что участки ДНК, которым *надлежит синтезировать большие количества РНК, многократно копируются (амплифицируются)*. В качестве наиболее демонстративного примера можно привести синтез дополнительного количества рибосомной ДНК (рДНК) в ооцитах амфибий. С помощью молекулярной гибридизаций было показано, что избыток ДНК в

ооцитах *Bufo* объясняется появлением экстра-копий ядрышкового организатора. Эти ооциты содержат необыкновенно большое количество рДНК. Избыточная рДНК имеет экстра-хромосомную локализацию в виде многочисленных ядрышек внутри ядра ооцита. Большинство добавочных копий рДНК существует в виде колец. У *Xenopus* и *Bufo* синтез этой ДНК происходит в ходе мейоза, в течение пахитенной стадии. Ядра на стадии лептотены содержат одно ядрышко, на стадии пахитены начинают появляться дополнительные ядрышки, количество которых особенно быстро возрастает на ранней диплотене и увеличивается до 1000. Было подсчитано, что в процессе амплификации количество копий ядрышкового организатора возрастает до 2500—5000. Методом гибридизации на цитологических препаратах удалось показать, что 20—40 копий амплифицированной ДНК присутствуют уже на стадии премеиотической интерфазы.

Специфическая амплификация рДНК была продемонстрирована не только у амфибий, но также у рыбы *Roccus*, у жука *Colembetes*, сверчка и ряда других животных. В очень редких случаях обнаружена амплификация уникальных последовательностей ДНК, кодирующих тот или иной белок. Так, в культуре ткани наблюдается амплификация гена, кодирующего гипоксантинфосфорибозилтрансферазу. Амплифицируются некоторые гены дрозофилы, при этом обнаружены даже регуляторные последовательности, от которых зависит амплификация. Найден, например, участок ДНК, который индуцирует амплификацию в фолликулярных клетках кластера из трех генов, расположенных в 3-й хромосоме и кодирующих белки оболочки зародыша — хориона. Регулирующий эффект оказывает гексамер TCACGT, найденный во всех трех генах в положении 23—27 нуклеотида от ТАТА-бокса. Во фланкирующей гены с 3'-конца последовательности выявлены палиндромы и короткие обращенные повторы, которые лежат в областях с необычайно высоким содержанием аденина и тимина.

Этого не наблюдается, однако, в случае интенсивного синтеза определенного вида мРНК в шелкоотделительной железе шелкопряда *Bombyx mori*, где образуется около 300 мкг фиброинового белка в последние 4 дня пятого личиночного возраста. Каждая гигантская полиплоидная клетка содержит около 0,2 г ДНК, из которой 0,022% кодируют фиброиновую мРНК. Поскольку на гаплоидный набор приходится 1—3 гена, кодирующих последнюю, это соответствует 10^6 . Первоначально предполагалось, что и в этом случае амплификация могла бы иметь место, но в последующем выяснилось, что гиперпродукция фиброиновой мРНК происходит за счет высокой степени общей полиплоидизации. Фиброиновый же ген присутствует в одной копии на гаплоидный геном. Точно так же в большинстве клеток, продуцирующих тот или иной белок в огромных количествах, феномен амплификации не обна-

ружен (клетки, синтезирующие глобины, иммуноглобулины, кристаллины, овальбумин), так что амплификация в функционировании генома, по-видимому, является скорее исключением, чем правилом.

Столь же редко встречается и сходная с амплификацией *магнификация* — диспропорциональная репликация рибосомной ДНК (рДНК) дрозофилы, которая обуславливает реверсию к дикому типу мутантов *bobbed*. Мутанты характеризуются утратой части рибосомных генов, что проявляется фенотипически в уменьшении длины и толщины щетинок, истончении хитинового покрова и снижении скорости роста. Ф.Ритосса (F. Ritossa) предложил следующий механизм магнификации:

- магнификация начинается у самцов (но не у самок), которые имеют фенотип *bobbed*;
- первая стадия процесса протекает у таких *bobbed*-индивидуумов и заключается в синтезе экстракопий рДНК, что не проявляется фенотипически в первом поколении (premagnification);
- в потомстве этих самцов описанные молекулярные события находят выражение в фенотипическом эффекте; предполагается, что экстракопии рДНК, синтезированные на premagnification-стадии, интегрируются в хромосомы клеток зародышевой линии;
- эффективность процесса варьирует от близкого к 100% до много меньших величин;
- магнификация рДНК может продолжаться в следующих генерациях.

К.Тартоф (K. Tartof) представил данные, позволяющие предполагать возможность происхождения магнификации благодаря неравному обмену сестринских митотических хроматид. В последующем его представления были подтверждены. В любом случае этот феномен отражается на течении индивидуального развития и клеточной дифференцировки в связи с недостаточностью количества рибосом у соответствующих мутантов.

Диминуция хроматина. Этим термином в индивидуальном развитии называют явление, противоположное умножению генетического материала.

У аскариды, в частности, зигота содержит две хромосомы. В каждой из них имеется тонкий центромерный и утолщенные концевые районы. Т. Бовери (Th. Boveri) еще в 1887 г. описал различия в поведении хромосом будущих соматических и половых клеток аскариды в процессе развития. Уже во время второго деления дробления в той клетке, которая даст начало соматическому "пути", утолщенные концы хромосом "отрываются" от средней части и, не имея центромер, остаются в районе экватора митотического перетена, где и дегенерируют. Это явление утраты значительной

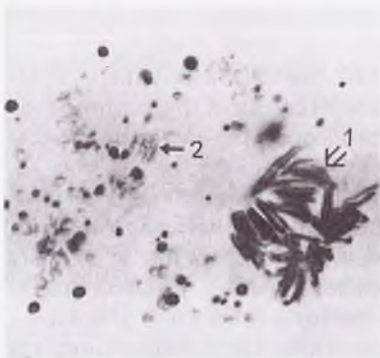


Рис. 3.22. Диминуция хроматина у *Cyclops kolensis* (по: Акифьев, Гришанин, Бродский, 1993).

1 — клетка зародышевого пути, в которой не прошла диминуция хроматина (анафаза); 2 — анафаза в постдиминуционной клетке соматического пути. Округлые гранулы содержат элиминированную ДНК; заметна большая разница в размерах хромосом клеток 1 и 2; в процессе диминуции хроматина из хромосом данного вида соматических клеток вырезается 94% ДНК! Оставшихся 6% достаточно для формирования всех тканей циклопа

части наследственного материала в соматических клетках Бовери и назвал *диминуцией хроматина*. В клетках “зародышевого” пути хромосомы сохраняют свою целостность, чем обеспечивается преемственность в передаче наследственной информации от родителей потомкам (см. также гл. 1). А. Вейсман использовал эти данные для обоснования широко известной теории зародышевого пути, согласно которой будущие половые клетки на самой ранней стадии развития вычлняются в некий самостоятельный путь и в отличие от будущих соматических клеток сохраняют в целости и неизменном виде свой генетический материал, в то время как разные соматические клетки теряют разные области наследственных задатков, вследствие чего развиваются в разных направлениях.

Элиминируемая ДНК содержит большое количество повторяющихся последовательностей. Например, у лошадиной аскариды *Parascaris equorum* клетки зародышевого пути содержат два легких сателлита, которые вместе составляют около 85% ДНК зиготы. Диминуция именно этих сателлитов и наблюдается в соматических клетках. В целом в ходе диминуции удаляется около 90% сателлитной ДНК, присутствующей в клетках зародышевого пути. При этом по крайней мере крупные блоки рибосомной 18S и 28S ДНК не удаляются. По некоторым оценкам соотношение повторенных и уникальных последовательностей в элиминируемой ДНК составляет 1:1.

В результате элиминации хроматина образуются соматические ядра, в которых 90% ДНК уникальны и почти 10% повторены. Примерно 0,01—0,05% ДНК составляют высокоповторяющиеся последовательности. После удаления концевых гетерохроматиновых фрагментов хромосом на них формируются новые теломеры (повтор ТTAGGC).

Аскарида не является уникальным организмом, у которого обнаружена диминуция, сходный феномен выявлен у нескольких видов циклопов (рис. 3.22), при этом в соматических клетках удаляется 65—75% ДНК. Количество ДНК в зародышевых клетках примерно в 2 раза выше, чем в соматических клетках. Среди двукрылых насекомых (у галловой мухи, например) описана своеобраз-

ная форма диминуции хроматина, когда удаляются целые хромосомы.

Российские генетики А.П.Акифьев и А.К.Гришанин считают, что процесс диминуции хроматина возникает в ходе эволюции под влиянием единичной мутации, действие которой заключается в активации фермента диминуции.

Естественно, что такого рода явления играют существенную роль в определении уровня и дифференциального характера транскрипционной активности.

Значение подвижных генетических элементов. На уровень транскрипционной активности влияет также внедрение *подвижных генетических элементов* (ПГЭ). Так, экспрессия гена *yellow* (*y*) у *D melanogaster* контролируется серией тканеспецифических энхансеров, локализованных в 5'-области и в интроне гена. Инсерция ПГЭ *gypsy* в аллель *y*² на расстоянии 700 пар оснований от старта транскрипции вызывает эффект пространственного ограничения фенотипа: мутантная ткань обнаруживается в тех структурах, которые контролируются энхансерами, расположенными upstream от сайта инсерции ПГЭ, но те структуры, чьи энхансеры локализованы downstream от сайта инсерции, пигментированы нормально. Этот эффект может быть воспроизведен и при инсерции в ту же самую область фрагмента *gypsy* длиной 430 пар оснований, содержащего область, связывающую белок, кодируемый геном *suppressor of Hairy-wing* [*su(Hw)*] и принадлежащий к транскрипционным регуляторам типа белков с "цинковыми пальцами" ("zink finger protein"). Предполагается, что присутствие *su(Hw)* тормозит действие тех тканеспецифических энхансеров, которые локализованы более дистально от *su(Hw)*-связывающей области относительно промотора.

Посттранскрипционный уровень

Первым этапом этого уровня регуляции является созревание мРНК, ее *процессинг*, осуществляемый посредством сплайсинга. В процессинге, помимо про-мРНК участвуют соответствующие ферменты (рестриктазы, метилазы, ферменты полиаденилирования и "кэпирования"), а также так называемые информоферные белки, образующие ядерные рибонуклеопротеидные (РНП) комплексы (ядерные информосомы), описанные Г.П.Георгиевым (рис.3.23) и О.П.Самариной. Белковый состав информофер достаточно сложен; более 60% составляют белки, характеризующиеся высоким содержанием глицина и аналога аргинина. От этих белков зависит упаковка РНП-частиц.

На *втором этапе* "зрелая" мРНК *стабилизируется*. Избирательная стабилизация такой мРНК, выход ее из пула гетерогенной ядерной РНК включает присоединение поли-А-фрагментов (по-



Рис. 3.23. Георгий Павлович Георгиев. Один из классиков молекулярной генетики, стоявший у истоков этой науки. Академик РАН. Лауреат Государственных премий.

Предложил схему регуляции активности генов у зукарнот. Один из первооткрывателей подвижных генетических элементов у дрозофилы. Открыл информиферы — структуры, участвующие в переносе генетической информации из ядра в цитоплазму. Описал гены, играющие важную роль в процессах развития опухоли

лиаденилирование). От длины полиаденилового “хвоста” зависит продолжительность жизни мРНК и ее трансляции в цитоплазме. Дифференциальная стабильность мРНК может быть одним из механизмов дифференцировки, поскольку различия в стабильности молекул

мРНК отражаются на интенсивности синтеза соответствующих белков.

На *третьем этапе мРНК транспортируется* из ядра в цитоплазму. Регуляция синтеза белка на данном этапе может проявляться в большей или меньшей задержке выхода всех видов мРНК из ядра в цитоплазму, в дифференциальной задержке выхода отдельных видов мРНК и, наконец, в селекции РНК, т.е. выходе одних видов мРНК и деградации других видов в ядре. В частности, гистоновая мРНК обнаруживается в цитоплазме очень быстро по сравнению с другими фракциями.

Я.-Е. Эдстрем (J.-E. Edstrom) с сотрудниками выделил в слюнных железах хирономид *два типа гетеродисперсной РНК — раннюю и позднюю*. Ранняя РНК, располагающаяся на электрофореграммах в зоне между 5S и 18S, относительно быстро (уже через 30 мин) мигрирует в цитоплазму. Поздняя, высокодисперсная (75S) РНК обнаруживается в цитоплазме лишь через 3 часа после введения метки. Обе фракции существенно различаются по их стабильности. Если у первой период полужизни около одного дня и по прошествии двух дней она не определяется в цитоплазме, то вторая имеет период полужизни несколько дней и может быть определена в клетке даже через две недели. Она является продуктом специфических районов политенных хромосом — колец Бальбиани, и органоспецифична, поскольку выявляется только в слюнных железах и отсутствует в мальпигиевых сосудах и кишечнике. В бластоцистах мыши также найдены две популяции поли(А)-содержащей мРНК: одна — с периодом полужизни около 7 часов, другая, “долгоживущая”, — около 18 часов. В ходе дифференци-

ровки линзы у цыплят разные субъединицы кристаллинов синтезируются на мРНК разной стабильности.

По-видимому, дифференциальная стабильность мРНК может быть одним из механизмов дифференцировки, поскольку различия в стабильности молекул мРНК отражаются на интенсивности синтеза соответствующих белков.

Трансляционный и посттрансляционный уровни

Конечное содержание белков или ферментов в клетке зависит не только от регуляции на ранее описанных уровнях. Транскрипция и посттранскрипционные события контролируют содержание мРНК в цитоплазме клетки. Однако конечная концентрация белков и, следовательно, уровень экспрессии соответствующих структурных генов зависят также от локусов, регулирующих трансляционные и посттрансляционные процессы.

Важную роль в поддержании определенной концентрации какого-либо белка в клетке играет соотношение скоростей его синтеза и распада. Известны специальные гены, которые контролируют это соотношение. Например, аминолевулинатдегидратаза печени мышей линии АК (аллель *Lv-a*) имеет более высокую активность, чем у мышей линии C57BL/6 (аллель *Lv-b*). Гетерозиготы *Lv-a/Lv-b* характеризуются промежуточным уровнем активности фермента, причем аминолевулинатдегидратаза обоих видов гомозигот идентична по различным физико-химическим свойствам. Показано, что локус *Lv* (не являясь структурным геном для данного фермента) увеличивает скорость его синтеза, не действуя на скорость деградации. Таким образом определяется количество молекул фермента в ткани и в зависимости от него — общая ферментативная активность.

Различия в активности между быстрым и медленным вариантами алкогольдегидрогеназы у особой дрозофилы, гетерозиготных по соответствующему структурному гену, обуславливаются различиями в скорости синтеза этих двух изоферментов.

С другой стороны, закономерности трансляции в значительной степени определяются неодинаковой активностью аминоктил-тРНК-синтетаз и соотношением набора фракций различных транспортных РНК (тРНК). Соотношение этих фракций коррелирует с аминокислотным составом белков, характерных для данного типа клеток. В частности, такая корреляция выявлена для транспортных РНК в шелкоотделительной железе шелкопряда, в ретикулоцитах различных животных. Отмечено, что набор транспортных РНК в недифференцированных тканях амфибий сходен, в то время как в тканях, дифференцирующихся в разных направлениях, различается.

У хрущака мучного (*Tenebrio molitor*) удалось продемонстрировать, что гормональная регуляция фенотипического выражения генов, контролирующая синтез кутикулярного белка, также осуществляется на трансляционном уровне и включает появление новых тРНК и активирующих их ферментов. Стабильная мРНК для кутикулярных белков синтезируется заранее (с опережением!), но не транслируется до момента воздействия ювенильного гормона, вызывающего изменения в составе тРНК. Существование дифференциальной трансляции некоторых триплетов открывает возможность регуляции клеточной дифференцировки путем селективной активации или инактивации стабильных мРНК, хранящихся в эмбриональных клетках. При этом у хрущака мучного важную роль в трансляционном уровне регуляции играют различия в активности лейцил-тРНК-синтетазы. Показано, что эти различия обусловлены существованием множественных форм фермента за счет конформационных его преобразований. Для каждого конформера характерен определенный уровень активности.

В системе транспортных РНК и аминоксил-тРНК синтетаз проявляется также действие многочисленных генов-модификаторов. Примером тому является фенотипика мутантов дрозофилы *Abnormal abdomen* — $A^{53}g$ (локализация — X-хромосома). Первичный эффект мутации — нарушение дифференцировки гистобластов и абдоминальной гиподермы. Однако экспрессивность и пенетрантность признака в значительной степени зависят от генов-модификаторов, локализованных как в X-хромосоме, так и в аутосомах, и от влияний среды — влажности, населенности, возраста культуры и т.д.

Известны также и мутации, изменяющие скорость деградации фермента. В частности, у мышей найден генетический фактор, контролирующий содержание каталазы печени путем регуляции скорости ее деградации, которая в печени мышей линии C57BL/На намного ниже, чем у мышей линий DBA/2 и C57BL/6. В связи с этим в печени мышей первой линии накапливается в три раза больше молекул фермента. Интересно, что тот же регуляторный генетический фактор не влияет на скорость деградации каталазы в почках мышей.

Некоторые виды мутаций, влияющих на трансляционные и посттрансляционные процессы, могут иметь существенное морфогенетическое значение. У аксолотля, например, обнаружена мутация *g*, предотвращающая у гомозигот g/g связывание одного из изоферментов эстеразы с клеточными мембранами. Сначала это событие не отражается на развитии зародыша, однако на более поздних стадиях нарушаются пигментогенез, система кровоснабжения, формирование жаберных структур. В конечном итоге дифференцирующиеся ткани испытывают резкое кислородное голо-

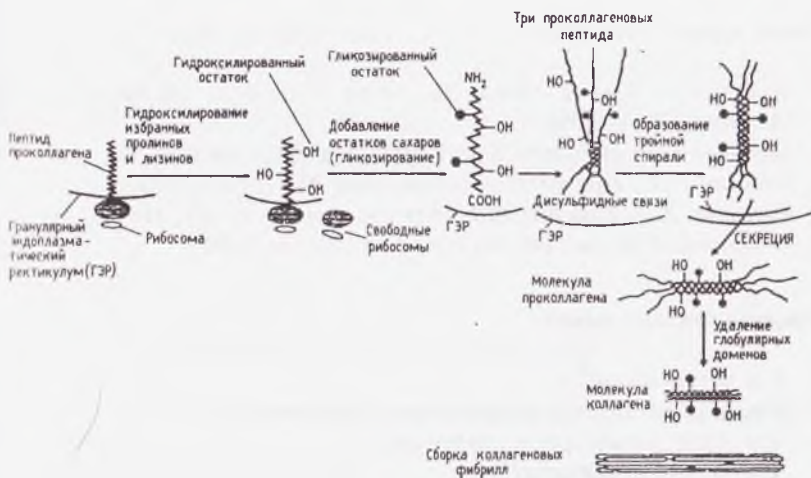


Рис. 3.24. Модель посттрансляционных модификаций молекулы коллагена внутри гранулярного эндоплазматического ретикулума, а также после секреции (по Alberts et al., 1983)

дание, и зародыш погибает. Похожие мутации обнаружены и у мышей. Это — мутации локуса *albino* (c^{65k} , c^{112k} , c^j), подавляющие активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы с сильным плейотропным эффектом (нарушение морфогенеза, гибель зародышей). Оказалось, что мутировавший ген контролирует синтез мембранных белков. Мембраны мутантов утрачивают способность связывать глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу и тирозиназу, что и обуславливает различные морфогенетические аномалии — отсутствие пигментообразования, нарушения в развитии тимуса и почек, нарушение размеров и формы амеланотических пигментных гранул.

Многообразие посттрансляционных модификаций на примере формирования коллагеновых волокон представлено на рис. 3.24.

Таким образом, комплексное влияние различий в скорости трансляции, а также посттрансляционных событий (формирование мультиферментных комплексов, связывание с мембранами или ингибиторами, деградация и т.д.) является важным моментом в обеспечении дифференциального выражения биохимического признака в клеточном фенотипе. Вследствие такого контроля на многих уровнях реализации биохимических признаков в фенотипе возможен существенный разрыв во времени между транскрипцией гена и появлением кодируемого им белка в клетке. Мутации соответствующих генов могут иметь эволюционное значение, поскольку влияют на время созревания взаимодействующих тканевых систем и, следовательно, на течение морфогенетических процессов.

Рекомендуемая литература

1. *Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж.*, и др. Молекулярная биология: В3 т. М.: Мир, 1994—1996.
2. *Богданов А.А., Медников Б.М.* Власть над геном. М.: Наука, 1989.
3. *Георгиев Г.П.* Гены высших организмов. М.: Наука, 1989.
4. *Корочкин Л.И.* Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1977.
5. *Патрушев Л.И.* Экспрессия генов. М.: Наука, 2000.

? Вопросы для повторения

1. Как устроен ген?
2. Как осуществляется процесс транскрипции гена?
3. Что такое энхансеры и сайленсеры?
4. Что такое инсуляторы?
5. Какие процессы влияют на транскрипцию?
6. Что такое молекулярный импринтинг?
7. Какие белки регулируют транскрипцию?
8. Что такое эффект положения? Роль гетерохроматина.
9. Что такое дифференциальная активность генов?
10. Что такое лайонизация? Ее механизмы.
11. Как осуществляется дозовая компенсация у дрозофилы?
12. Каковы механизмы дифференциальной активности гомологичных локусов?
13. Что такое аллельное исключение?
14. Что такое амплификация генов?
15. Что такое магнификация генов?
16. Что такое диминуция хроматина?
17. Каково значение подвижных генетических элементов в регуляции активности генов?
18. Что такое посттранскрипционный уровень регуляции экспрессии генов?
19. Что такое трансляционный и посттрансляционный уровень регуляции экспрессии генов?
20. Каково значение многоуровневого принципа регуляции экспрессии генов в развитии эукариот?

Глава четвертая

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПЛАНА СТРОЕНИЯ ОРГАНИЗМА

ОТКУДА БЕРЕТ НАЧАЛО ОНТОГЕНЕЗ?

Какой момент можно считать началом индивидуального развития:

- первое деление дробления?
- слияние пронуклеусов?
- оплодотворение яйцеклетки?

Т.Х.Морган справедливо заметил, что за точку отсчета надлежит принимать еще более ранний период времени, а именно созревание яйцеклетки. Он писал, что неправильно считать ее недифференцированной системой, что на самом деле она является самой высокоспециализированной клеткой в организме, поскольку именно в ходе ее созревания закладывается план будущего строения организма.

И действительно, развитие ооцита, по сути дела, представляет собой последовательное формирование гетерогенности его цитоплазмы, в результате чего осуществляется так называемая *ооплазматическая сегрегация*. В этот период функционируют почти все гены (во всяком случае, уникальные последовательности ДНК), так что в яйцеклетке амфибий содержится набор самых разнообразных мРНК (и даже около 200 тысяч молекул глобиновой мРНК), многие из которых станут нужными лишь на относительно поздних стадиях развития. Ядро развивающегося ооцита функционирует, следовательно, как бы с опережением, работая не только “на настоящее”, но и “на будущее”.

В ЧЕМ СУТЬ ООПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕГРЕГАЦИИ?

В ходе ооплазматической сегрегации формируются те региональные особенности цитоплазмы, которые как бы намечают, “преформируют” на химическом уровне план строения будущего организма. В основу формирования этого плана лежит образование *полярных градиентов* распределения биологически активных веществ. Яйцеклетка характеризуется, в частности, анималь-

но-вегетативным градиентом, который проявляется в постепенном падении концентрации РНК и белков, активности синтеза РНК и белков и др. в направлении от анимального к вегетативному полюсу В вегетативной области яйца, напротив, сосредоточены метаболически инертные запасные питательные вещества.

Иными словами, яйцеклетка — отнюдь не гомогенное образование, но *гетерогенная, химически преформированная, высокоспециализированная система*. Значение этой преформации может быть выявлено экспериментально. Например, Ж.Браше с помощью разных режимов центрифугирования нарушал градиентное распределение веществ цитоплазмы двояким способом:

- разрушал систему градиентов, вызывая равномерное распределение РНК, белков и др. веществ по цитоплазме;
- расчленил единый анимально-вегетативный градиент на два самостоятельных градиента.

Эти нарушения по-разному сказывались на судьбе развивающегося зародыша. В *первом* случае развитие останавливалось на самых ранних стадиях развития, и зародыш погибал (рис. 4.1) Во *втором* случае возникал зародыш с двумя системами осевых органов (рис. 4.2), с двумя головами. Таким образом, при отсутствии градиента распределения система осевых органов вообще не формируется, а двум градиентам распределения соответствуют две системы осевых органов. В чем же дело? По-видимому, в том, что неравномерное распределение РНК ведет к регионально специфическому синтезу соответствующих белков в развивающемся зародыше. Уже в ходе дробления blastомеры приобретают определенные свойства, отличающие их друг от друга как в физиологическом, так и в молекулярном отношении. Очевидно, именно эти события обуславливают специфичность ядерно-цитоплазматичес-

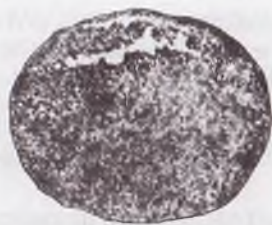


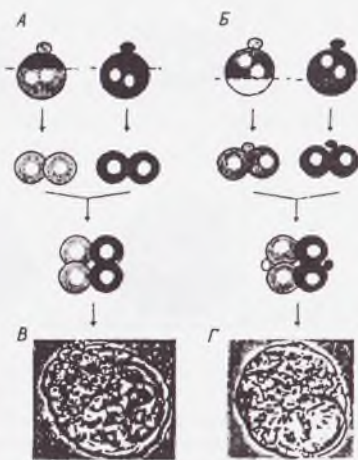
Рис. 4.1. Спадение крыши blastоцеля при центрифугировании blastулы. (по: Браше, 1970)



Рис. 4.2. Дифференцировка богатого РНК добавочного зародыша из центрифугированной blastулы (по: Пастель и Браше)

Рис. 4.3. Развитие химерных эмбрионов, полученных без того или другого полюса (по: *Zernicka-Goetz, 1998*).

А, Б — схема, демонстрирующая, как были получены химеры без анимального (А) или вегетативного (Б) полюса. В, Г — бластоцисты, развившиеся из химер без анимального (В) или вегетативного (Г) полюса



них отношений и определяемую этой специфичностью дифференциальную активность генов.

Следует в то же время отметить, что яйца млекопитающих, по-видимому, не имеют столь жестко фиксированной гетерогенности, как, например, яйца амфибий или дрозофилы. Как показали опыты М.Зерницки-Гёц, выполненные в 1998 г., эмбриональные оси в ооцитах мыши

устанавливаются после того, как начинается развитие зиготы. Ей удалось получить нормальное развитие бластоцисты из яиц, лишенных анимального или вегетативного полюса (рис. 4.3). Впрочем, эти данные могут свидетельствовать лишь о высокой регуляторной способности, присущей ооцитам млекопитающих. Вполне возможно, что в оперированных ооцитах происходит перераспределение различных маркеров в ходе раннего развития. В связи с этим вопрос об уровне и времени гетерогенизации ооцитов млекопитающих (как и некоторых других яиц регуляторного типа) следует считать открытым. Ответ на него может быть получен только в результате анализа локализации продуктов генов, гомологичных соответствующим локусам дрозофилы, ведающим детерминацией полярных осей (*bicoid, nanos, Toll* и др.).

“ЧУДЕСНЫЕ” СВОЙСТВА ПОЛЯРНОЙ ПЛАЗМЫ

У некоторых организмов, например у асцидий, гетерогенизацию цитоплазмы яйцеклетки можно заметить по разнице в окраске разных ее частей. Достаточно рано проявляется у них и гетерогенность в распределении некоторых белков, например ацетилхолинэстеразы (рис. 4.4). Иногда специфически выделяется та или иная часть цитоплазмы, например так называемая *полярная плазма* яиц некоторых насекомых, включая дрозофилу, формирующаяся на заднем полюсе яйца, богатая РНК и характеризующаяся четко выраженженной зернистой структурой. Клеточные ядра, которые попадают в эту цитоплазму, дают начало половым клеткам. Если область полярной плазмы облучить ультрафиолетом, то развившиеся из таких локально облученных яиц зародыши будут стерильны, поскольку оказываются лишенными половых клеток.

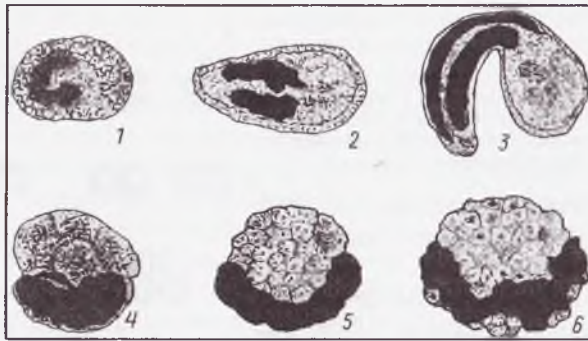


Рис. 4.4. Результаты гистохимического определения ацетилхолинэстеразы в процессе развития асцидии *Halocynthia* (по: Slack, 1983).

1—3 — нормальное развитие: фермент локализуется в хвостовых мышцах; 4—5 — дробление эмбриона было остановлено цитохалазином: 4 — остановка на стадии 8 клеток; 5 — на стадии 32 клеток; 6 — на стадии гастрюлы. Фермент появляется в тех клетках, которые детерминированы к развитию в направлении хвостовых мышц

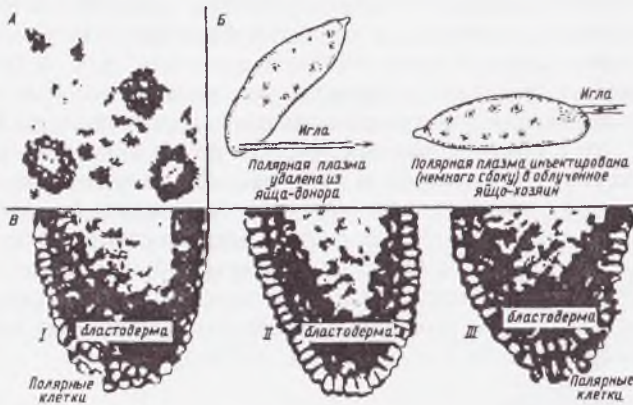


Рис. 4.5. Полярные гранулы (по: Okada et al., 1974).

А — полярные гранулы из фракционированных полярных клеток дрозофилы (микрофотография получена с помощью просвечивающего электронного микроскопа). Б — методика трансплантации полярной плазмы от необлученного донора облученному хозяину; В — продольные гистологические срезы через заднюю область зародыша дрозофилы, фиксированного к моменту завершения периода дробления: I — нормальный зародыш с бластодермой и полярными клетками; II — зародыш, который был облучен на ранней стадии дробления, бластодерма сформировалась, но полярные клетки отсутствуют; III — зародыш, облученный на ранних стадиях дробления, которому затем инъецировали полярную плазму от нормального зародыша. Видны бластодерма и полярные клетки

Микроинъекции полярной плазмы в различные участки бластодермы вызывают образование половых клеток в необычном месте (рис. 4.5).

Полярная плазма характеризуется тремя свойствами:

- функционирует автономно, т.е. способна вызвать эффект в любом участке зародыша;

- функционирует *специфически*, индуцируя образование только одного определенного типа клеток — половых;
- *видонеспецифична*, и микроинъекции полярной плазмы одного вида в бластодерму другого вида вызывают положительный эффект — стимуляцию образования гоноцитов в месте инъекции, однако образующиеся при этом половые клетки сохраняют строение, свойственное “своему” виду.

ОТЧЕГО ООЦИТ ОБЛАДАЕТ ПОЛЯРНОСТЬЮ?

Итак, цитоплазма яйца гетерогенизируется в результате процесса оплазматической сегрегации. Встает вопрос, чем вызвана эта сегрегация, от каких факторов зависит формирование градиентов? Можно считать твердо установленной обусловленность этих событий положением ооцита в материнском организме.

А. Беллами (Bellami) еще в 1919 г. обнаружил, что у 75—80% созревших овариальных яиц *Rana pipiens* стебелек, который прикрепляет оболочку, окружающую ядро, к яичнику, подходит к яйцу в области экватора. Положение стебелька по отношению к яйцу не может считаться случайным, так как участок шириной в 40 мк, в пределах которого стебелек может прикрепиться к яйцу, составляет только около 34% всей поверхности яйца. Кровеносные сосуды, выходя из стебелька, распространяются по всей поверхности, причем сосуды проходят лишь в оболочке, а не в веществе самого яйца. При этом большая часть артериальных сосудов располагается в анимальном полушарии, а кровеносные сосуды вегетативного полушария принадлежат преимущественно к венозным сосудам (рис. 4.6). В таком случае можно думать, что полярность яйца лягушки находится в прямой зависимости от распределения кровеносных сосудов, так что вследствие этого формируется градиент интенсивности процессов обмена веществ, подобно тому, как существуют градиенты распределения желтка и пигмента.

Ясно, что анимальный полюс, снабжаемый артериальной кровью, находится в более благоприятных условиях, способствующих

Рис. 4.6. Вполне созревший ооцит из яичника лягушки (по: Чайлд, 1941).

Характеризуется обычным распределением артериальных и венозных сосудов оболочки яйца в пигментированном и непигментированном полушариях: а — артерия; б — вена; с — стебелек

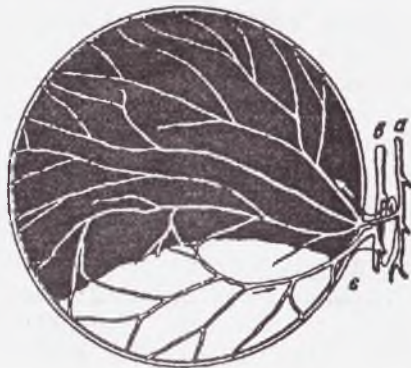




Рис. 4.7. Радиоавтограф ооцита (1), питающих клеток и фолликулярного эпителия (2) домашней мухи (по: Дэвидсон, 1972).

А — инкубацию проводили в течение 30 мин с ^3H -цитидином. Б — то же самое через пять часов после инкубации. Видно, как меченая РНК поступает в ооцит из прилегающей питающей клетки (указано стрелкой). Интенсивно меченая РНК, присутствующая ранее (А) в ядрах питающих клеток (3), теперь наблюдается в основном в их цитоплазме

накоплению биологически активных веществ и более

активному метаболизму. В цитоплазме вегетативного полушария, снабжаемой венозной кровью, складываются условия, способствующие (вследствие более инертного метаболизма) накоплению запасных питательных веществ.

Есть, впрочем, более общее обстоятельство, обуславливающее формирование градиентов в развивающемся ооците: неравное положение его полюсов по отношению к окружающим ооцит трофическим клеткам. Всегда один из полюсов ооцита окружен большим количеством питающих клеток, снабжающих его через специальные каналцы различными веществами — РНК, белками, а у некоторых жуков даже и митохондриями. С помощью радиоавтографии был доказан поток РНК из трофоцитов в яйцеклетку (рис. 4.7). Таким образом, поставленный в более благоприятное положение относительно трофоцитов полюс ооцита становится впоследствии анимальным. Ясно, что формирование анимально-вегетативного градиента зависит от *материнского организма*.

У дрозофилы было экспериментально показано влияние генотипа матери на проявление ранних эмбриональных признаков через систему градиентов. Это влияние носит название *преддетерминации*. Дело в том, что у насекомых цитоплазма яйца как бы преформируется к дальнейшему развитию еще до оплодотворения, причем многие ее компоненты, как мы увидим, образуются в питающих клетках. Эти клетки отличаются высокой степенью плоидности ($100n$) и обеспечивают зависимость яйцеклетки от материнского генома. Пример такой зависимости — сцепленная с полом мутация *deep orange (dor)*, исследованная у *Drosophila melanogaster* А. Гареном и В. Герингом (табл. 4.1).

Таким образом, будут ли эмбрионы развиваться дальше или погибнут, зависит от материнского генотипа. Значит, в яйцах, откладываемых самками, носительницами гена *dor*, отсутствуют какие-то вещества, содержащиеся в яйцах самок дикого типа. Инъекции цитоплазмы “дикого типа” в дефектные яйца устраня-

Зависимость состояния яйцеклетки от генотипа родителей у *Drosophila melanogaster*

Генотип родителей	Генотип оплодотворенных яиц	Фенотип
$dor/dor \text{ } \varnothing \times dor/dor \text{ } \sigma$	$dor/dor \text{ } \varnothing \text{ } dor/Y \text{ } \sigma$	погибает в период эмбриогенеза
$+dor \text{ } \varnothing \times dor/Y \text{ } \sigma$	$+dor \text{ } \varnothing$	нормальное развитие
	$dor/dor \text{ } \varnothing$	то же
	$+Y \text{ } \sigma$	—"
	$dor/Y \text{ } \sigma$	—"
$dor/dor \text{ } \varnothing \times +Y \text{ } \sigma$	$+dor \text{ } \varnothing$	погибает в период эмбриогенеза
	$dor/Y \text{ } \sigma$	

ют нарушения эмбрионального развития и спасают зародыши от гибели. Ген *dor* контролирует синтез птеридинов, которые необходимы не только для пигментообразования, но выступают в качестве кофакторов гидроксирования компонентов фолиевой кислоты. Поэтому вместе с инъецируемой цитоплазмой в яйцо *dor/dor* вносятся также недостающие птеридины, что и приводит к видимому эффекту. Следовательно, присутствие некоторых специфических цитоплазматических фракций в определенном участке яйца может детерминировать судьбу этого участка в развитии.

КАК ФОРМИРУЕТСЯ ООЦИТ?

Как гены контролируют формирование градиентов, а, следовательно, и план строения будущего организма в ходе оогенеза?

Естественно, что наиболее удобным объектом исследования этого контроля является дрозофила в силу ее хорошей генетической изученности. Яйцеклетка дрозофилы развивается из общей с трофоцитами клетки-предшественника. Эти клетки выделяются очень рано, после того, как ядра, дающие начало зародышевому пути, попадают в область полярной плазмы, в образовании которой важную роль играет ген *oscar*. Каждая такая клетка претерпевает 4 деления, так что возникает 16 клеток, одна из которых будет половой. Она исходно имеет метку в цитоплазме в виде специфической области, названной *спектросомой*. Остальные клетки становятся питающими (трофоцитами) и соединены с яйцеклеткой цитоплазматическими мостиками, по которым в нее поступают различные вещества, принимающие участие в формировании градиентов (рис. 4.8). Хромосомы трофических клеток претерпевают политенизацию, что существенно активизирует их функционирование в процессе обслуживания яйцеклетки. Из материнской мезодермы образуется около 1000 мелких фолликулярных клеток, окружающих дифференцирующийся ооцит с трофичес-

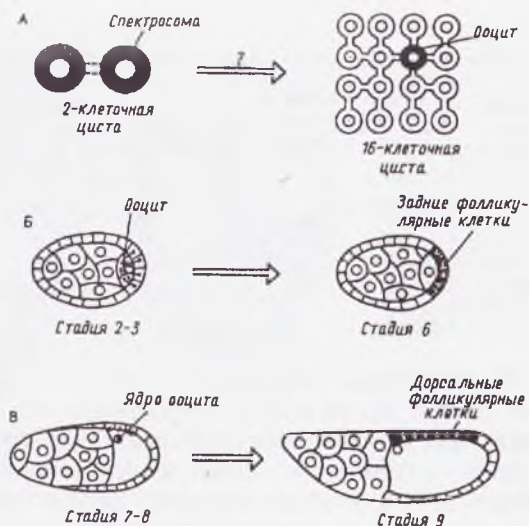


Рис. 4.8. Три асимметричных события, которые генерируют формирование полярности в ходе оогенеза (по: Snustad, 1997).

А — первое деление половой клетки асимметрично относительно спектросомы, которая “достается” только одной из дочерних клеток, она и становится ооцитом. Дальнейшие три деления лишены спектросомы клеток ведут к образованию 16-клеточной цисты с расположенным в центре ооцитом и 15 вспомогательными клетками, окружающими его. Эти клетки соединены друг с другом и с ооцитом цитоплазматическими канальцами, по которым в ооцит транспортируется специфическая мРНК. *Б* — неизвестный механизм обуславливает расположение ооцита в задней части цисты. Наружный ее покров образован фолликулярными клетками. Матричная РНК, синтезированная геном *gurken*, локализована в задней части ооцита, отсюда *gurken*-сигнал поступает к прилежащим терминальным фолликулярным клеткам, которые отвечают реализацией “задней” программы. *В* — задние фолликулярные клетки посылают “ответ” ооциту, обуславливающий поляризацию микротрубочеч цитоскелета и миграцию ядра из задней области ооцита к углу переднего кортекса, *gurken* мРНК аккумулируется над ядром; направляют еще один сигнал, обуславливающий дорсализацию обозначенного на рисунке определенного набора фолликулярных клеток

кими клетками. Будущий передний конец эмбриона располагается в области ооцита, прилежащей к трофоцитам, а более выпуклая поверхность яйца становится вентральной частью эмбриона.

Далее начинается активное функционирование материнского генома в трофических и фолликулярных клетках.

КАК ГЕНЫ КОНТРОЛИРУЮТ ФОРМИРОВАНИЕ АНИМАЛЬНО-ВЕГЕТАТИВНОГО ГРАДИЕНТА?

Можно выделить две основные системы генов (о третьей системе см. ниже), особенно важных для формирования градиентов (рис. 4.9; 4.10). *Первая система генов обеспечивает формирование анимально-вегетативного градиента.* Среди этих генов главным является *bicoid*, содержащий гомеобокс, специфическую, консервативную последовательность ДНК из 180 нуклеотидных пар






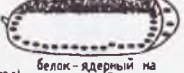


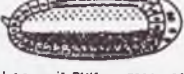
	Передняя система	Задняя система	Дорсо-вентральная система
Яйцо. Продукты поступают из окружающих и клеток	<i>bicoid</i> РНК-передняя 	<i>hunchback</i> РНК-повсеместна <i>nanos</i> РНК-задняя 	<i>Toll</i> белок-повсеместен, <i>spatzle</i> белок (и поэтому <i>Toll</i>) активируется вентрально 
Синцигиальная бластодерма. Материнская РНК транслируется	<i>bicoid</i> белок формирует градиент 	<i>nanos</i> белок-в передней половине 	<i>dorsal</i> белок-цитоплазма- тический  <i>dorsal</i> белок-ядерный на вентральной стороне
Клеточная бластодерма. Зимотическая РНК транскрибируется	<i>hunchback</i> РНК заполняет переднюю область 	<i>stripes of knirps & giant</i> РНК 	<i>dpp & zen</i> РНК-дорсальная  <i>twist & snail</i> РНК-вентральная

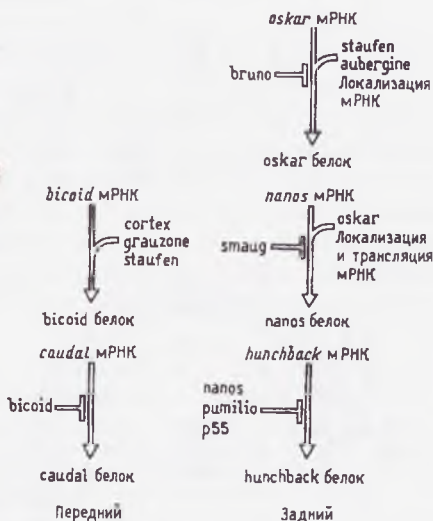
Рис. 4.9. Локализация продуктов генов, определяющих образование полярных градиентов в развивающемся яйце дрозофилы (по: *Lewin, 1998*)

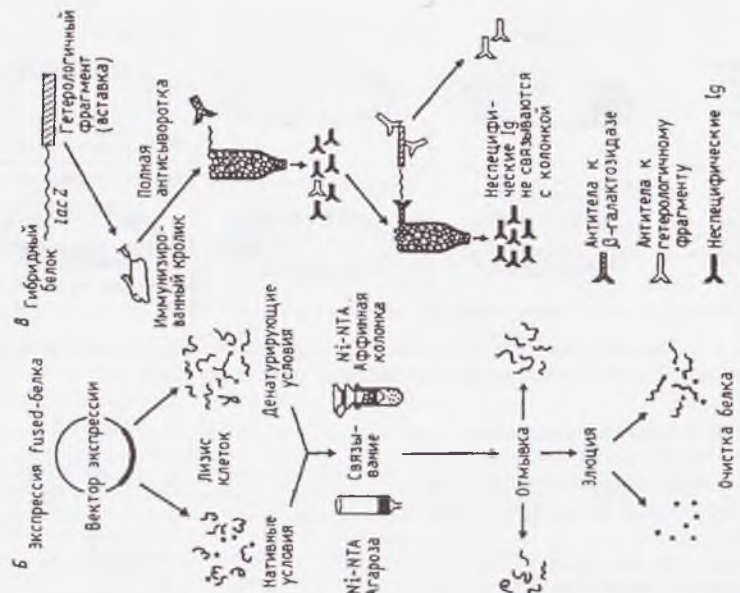
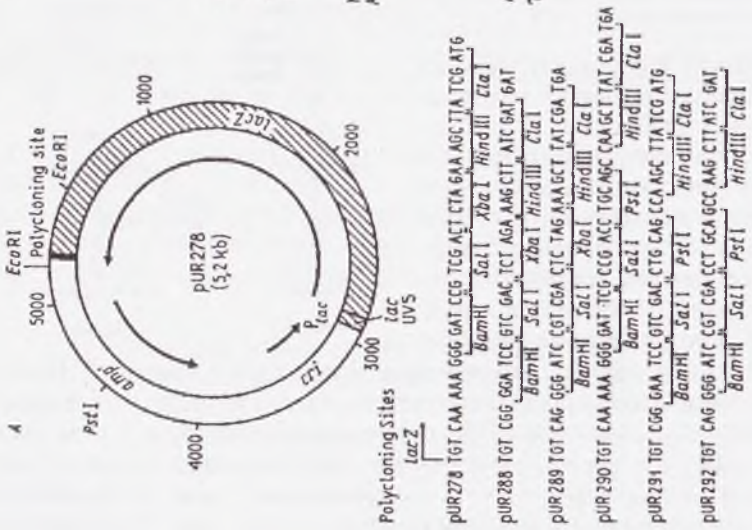
Рис. 4.10. Каскад параллельных событий, ответственных за трансляционный контроль формирования плана тела развивающегося эмбриона дрозофилы.

Показаны цепи взаимодействия генов, детерминирующих формирование переднего и заднего полярных градиентов

(см. ниже). В случае его мутации нарушается развитие головного конца дрозофилы. У эмбрионов, носителей мутации по этому гену, задний конец развивается нормально, но нарушено развитие передних брюшных сегментов, а вместо головы и груди развиваются структуры, свойственные заднему концу.

Если с помощью гибридизации *in situ* с зондом ДНК *bicoid* исследовать локализацию соответствующего транскрипта, то можно проследить транспорт РНК, синтезированной этим геном, из питательных клеток в анимальный полюс развивающегося ооцита. В результате формируется четко выраженный анимально-вегетативный градиент распределения продукта этого гена. Такие продукты принято называть *морфогенами*. Для их изучения используется специальный метод, с помощью которого получают так называемые *fused*-белки. Принцип этого метода объяснен на рис. 4.11.





Для поддержания стабильности этого продукта в переднем полюсе зародыша необходима активность еще двух генов: *exuperantia* и *swallow*. В случае мутаций, нарушающих их активность, градиент распределения белка *bicoid* становится размытым, и он распространяется ближе к заднему полюсу. Такие мутанты напоминают по фенотипу мутантов *bicoid*: у них отсутствуют самые передние структуры, но формируются удлинённые челюсти и грудные структуры (рис. 4.12).

С другой стороны, фолликулярные клетки "поставляют" в ооцит РНК, синтезированную геном *nanos* и концентрирующуюся на противоположном анимальному полюсе (рис. 4.13). У мутантов *nanos* нарушается развитие заднего конца зародыша. Если *nanos* РНК инъецировать в передний конец эмбриона, она может индуцировать формирование в головном конце различных структур, свойственных заднему полюсу. Для активации гена *nanos* необходимы пять генов с материнским эффектом (см. также рис. 4.10; 4.12). Белок *nanos* синтезируется в области заднего полюса и затем транспортируется в область брюшных сегментов, что осуществляется при участии продукта гена *pumilio*.

В формировании плана строения организма на самых ранних этапах созревания ооцита принимает участие еще один важный ген, который активно функционирует не только в материнском, но и в зиготическом геноме. Это ген *hunchback* (рис. 4.13). Он активируется белком *bicoid*, а потому его продукт накапливается, как и *bicoid*, в передней половине зародыша и репрессирует гены, активные в брюшных сегментах, так что в зоне его распределения формируются головные и грудные структуры. Белок *bicoid* присоединяется к пяти сайтам, расположенным выше промотора гена *hunchback*. Все эти сайты имеют общую последовательность:

Рис. 4.11. Схема синтеза гибридных fused-белков (по: Гловер, 1989).

Имея клонированный структурный ген, можно получить его продукт так называемым методом синтеза fused-белка, а затем иммунизировать этим белком какое-либо животное (обычно кролика) и получить соответствующую антисыворотку, после чего возможно определять наличие и локализацию данного белка с помощью иммунохимических и иммуногистохимических методов (иммуноэлектрофорез, иммуноблот-анализ).

A — вектор, используемый для этих целей; кДНК, кодирующая подлежащий изучению пептид, присоединяется к ДНК гена *lacZ* (бактериальная галактозидаза). Вектор вводится в бактериальный геном и активируется транскрипция "сливной" ДНК, в результате чего синтезируется fused-белок, кодирующий бета-галактозидазу и изучаемый пептид.

B — очистка fused-белка, синтезированного в бактериальной культуре.

B — схема получения антител, специфичных по отношению к гетерологичному фрагменту гибридного белка. Кроликов иммунизируют гибридным белком. Для удаления основной массы антител к бактериальной бета-галактозидазе антисыворотку сначала пропускают через колонку с сепарозой с иммобилизованной бета-галактозидазой. Несвязавшийся на колонке материал наносят на другую колонку, содержащую ковалентно связанный гибридный белок: иммобилизованные на сепарозе антитела к бета-галактозидазе сшиты диметилпимелидидатом-2НСI с бета-галактозидазным фрагментом гибридного белка. Связавшиеся антитела элюируют и после заключительного контрольного этапа, т.е. пропускания через колонку с иммобилизованной бета-галактозидазой (не показано), анализируют их специфичность по отношению к чужеродному фрагменту гибридного белка

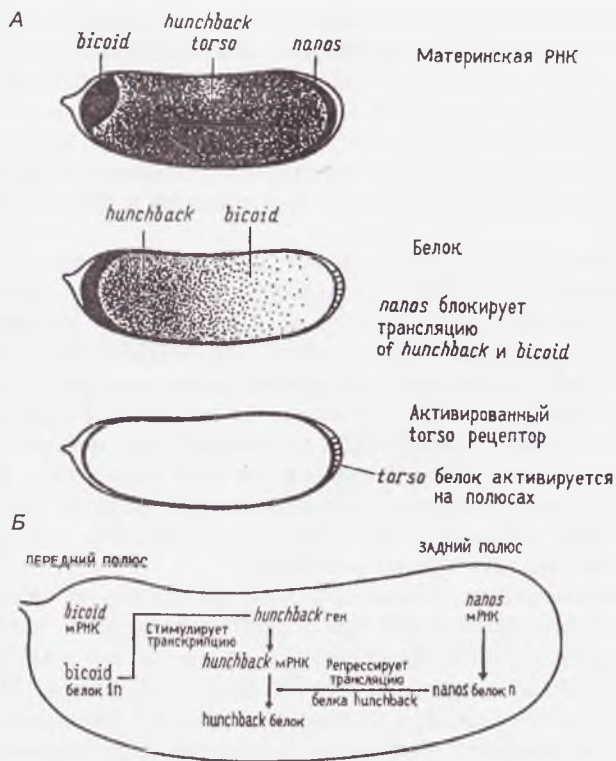


Рис. 4.12. Детерминация анимально-вегетативного градиента в яйце дрозофилы посредством действия трех независимых генных систем (по: Lawrence, 1992).

А — локализация продуктов соответствующих генов в яйце. Б — координация действия этих продуктов в процессе детерминации передне-заднего паттерна

5'-ТСТААТССС-3'. Мутанты, гомозиготные по этому гену, летальны и похожи на мутантов *bicoid*, утрачивающих передние структуры. Передне-задний градиент распределения продукта этого гена может формироваться двояким способом: либо материнская РНК транслируется только в переднем конце, либо зиготическая РНК продуцируется только в переднем конце. Если *hunchback* РНК активно транслируется в хвостовом конце, что можно наблюдать, поставив синтезирующий ее ген под heat-шоковый промотор и обеспечив поступление больших порций этой РНК в том числе и в задний конец эмбриона, то белок *hunchback* нарушает развитие абдоминальных структур и деформирует зародыш наподобие мутантов *nanos*. Очевидно, в норме белок *nanos* блокирует трансляцию материнской РНК *hunchback*. Именно это и является основной его функцией. Если имеют место мутации, нарушающие функционирование как *nanos*, так и *hunchback*, то развивается нор-

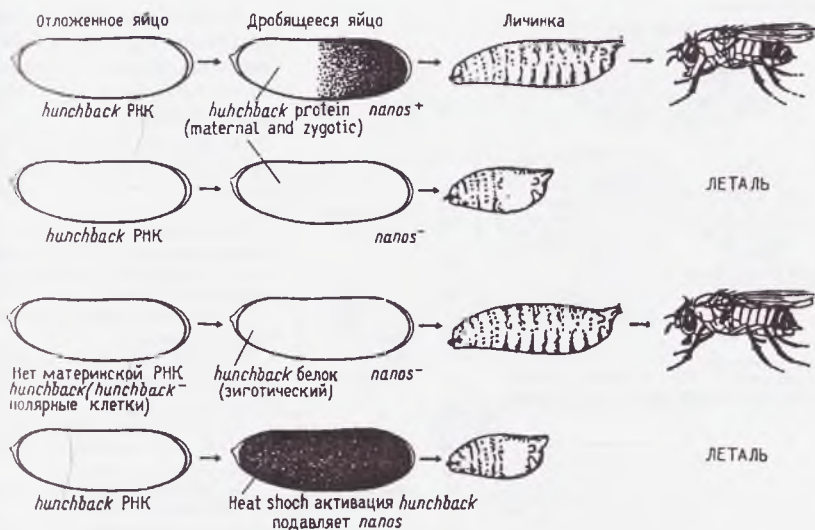


Рис. 4.13. Взаимодействие генов в становлении анимально-вегетативного градиента в развивающемся яйце дрозофилы (по: Lawrence, 1992).

Главная функция продукта гена *nanos* — блокировать *hunchback* РНК в задней области яйца. Если нет материнской *hunchback* РНК, активность гена *nanos* необязательна

мальная муха. Отсюда следует, что продукт гена *hunchback* “мешает” развитию хвостового конца, а блокирующий эффект со стороны гена *nanos* как бы устраняет чинимые им помехи.

КАК ГЕНЫ КОНТРОЛИРУЮТ ФОРМИРОВАНИЕ ДОРСО-ВЕНТРАЛЬНОГО ГРАДИЕНТА?

Вторая система генов контролирует формирование дорсо-вентрального градиента. Последовательность активации этих генов представлена на рис. 4.14; 4.15. Как следует из рисунков, гены ооцита посылают сигнал (неизвестной природы) к рецептору, кодируемому геном *torpedo*, который функционирует в фолликулярных клетках. Белок *torpedo* частично гомологичен рецептору фактора роста (EGF- рецептору) позвоночных и имеет экстрацеллюлярную часть, способную связывать лиганд из ооцита. Затем гены *pipe*, *nudel*, *windbeutel*, функционирующие в фолликулярных клетках, посылают сигнал (также неидентифицированный) в вентральную область ооцита. После оплодотворения гены *snake*, *easter*, кодирующие протеазы, активируют ген *spatzle*, так что “сигнал” возвращается в ооцит. Продукт *spatzle* активирует *toll* на вентральной стороне яйца. Продукт этого последнего активирует продуцируемую геном *pelle* киназу. Она в свою очередь фосфорилирует

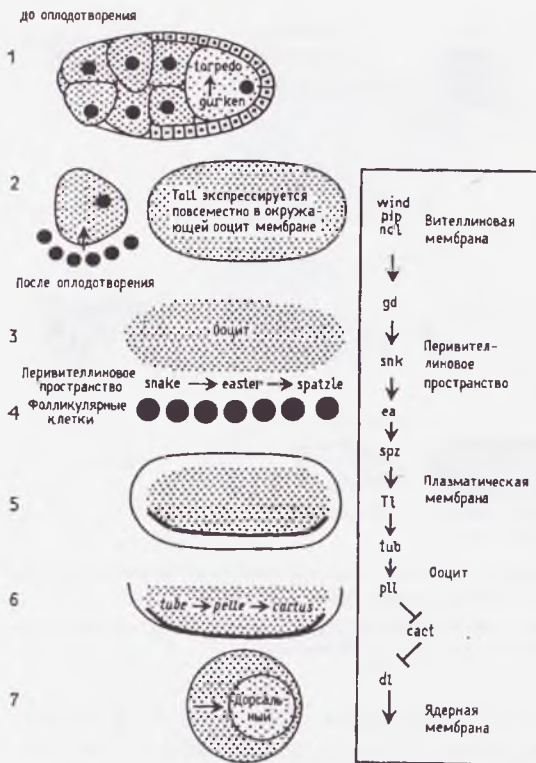


Рис. 4.14. Система генов, контролирующая формирование дорсо-вентрального градиента в яйце дрозофилы (по Lewin, 1998).

1. Гены ооцита посылают неидентифицированный сигнал к рецептору *torpedo* фолликулярных клеток.

2. Гены *pipe*, *nudel*, *windbeutel* и фолликулярных клетках посылают сигнал (неидентифицированный) к вентральной стороне ооцита.

3. Неизвестная функция дефектной гастрულიции.

4. Гены *snake*, *easter* кодируют протеазы, которые могут активировать *spatzle*.

5. Белок *spatzle* активирует белок Toll на вентральной стороне яйца.

6. Toll через белок *tube* (функция неизвестна) активирует *pellet* — киназу, которая фосфорилирует белок *cactus*.

7. *Cactus* высвобождает ранее связанный белок *dorsal*, который вступает в ядро

продукт гена *cactus*. В результате этого процесса высвобождается

белковый продукт гена *dorsal*, поступающий в ядра клеток.

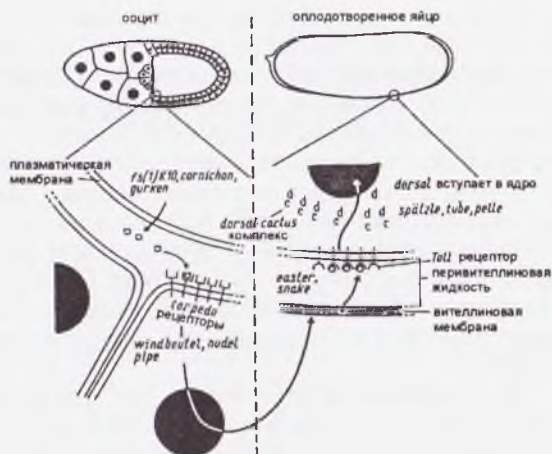
Ген *toll* необходим, следовательно, для формирования дорсо-вентральной полярности. В его отсутствие эмбрион сильно “дорсализован”. Белок *toll* в норме распределен по объему яйца равномерно. Как же в таком случае проявляется его локальный эффект? Оказывается, его лиганд продуцируется локально и быстро связывается с рецепторами Toll. У *toll*-мутантных эмбрионов нет рецепторов, так что лиганд диффузно распределяется в перивителлиновом пространстве. Локальная активация *toll*-рецептора в оплодотворенном яйце зависит от тех сигнальных веществ, которые были синтезированы еще в период оогенеза (функция с опережением, или “упреждающая” функция генов) и накоплены в области вителлиновой мембраны, а позднее транспортированы в вентральную часть эмбриона. Этот транспорт, возможно, сопровождается амплификацией некоторых генов, мутации которых вызывают материнский дорсализующий эффект. Два из таких генов (*snake* и *easter*) кодируют сериновые протеазы, сходные с функционирующими при свертывании крови. Эти протеазы действуют внутри перивителлиновой жидкости, которая лежит между яйцом и вителлиновой мембраной. Если ввести перивителлиновую жидкость

Рис. 4.15. Модель формирования dorзо-вентральной системы градиентов (по: Lawrence, 1992).

На схеме показаны взаимодействия генов, контролирующих этот процесс и их продуктов

от яйца *easter* в перивителлиновое пространство мутантного по *easter* яйца, то происходит полное восстановление нормального развития мутантного зародыша.

Активация toll-рецептора ведет к высвобождению белка dorsal из комплекса dorsal-cactus (рис. 4.15; 4.16), так что создается градиент распределения белка dorsal, действующего как *транскрипционный фактор*. Парадоксально, что концентрация этого белка в ядрах выше в вентральной области и ниже — в дорсальной. По-видимому, снижение концентрации белка dorsal является триггером, разрешающим каскад реакций, трансформирующих клетки в дорсальном направлении.

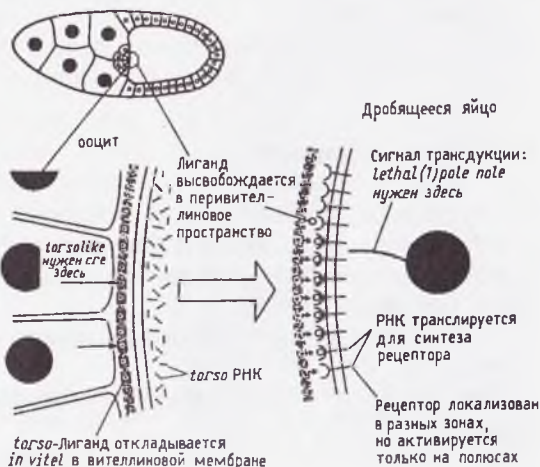


КАК ГЕНЫ КОНТРОЛИРУЮТ ФОРМИРОВАНИЕ ТЕРМИНАЛЬНЫХ СТРУКТУР?

Существует еще и *третья система генов, контролирующая формирование градиентов в оогенезе*. Эта группа генов контролирует формирование терминальных структур, т.е. *акрона* (несегментированного головного конца) и *тельсона* (несегментированного хвостового конца).

Рис. 4.16. Терминальная система генов (по: Lawrence, 1992).

Локальная экспрессия генов в фолликулярных клетках вызывает локальную активацию torso рецептора *in vivo*



Ключевую роль в этом процессе играет ген *torso* (рис. 4.16). При отсутствии его продукта ни акрон, ни тельсон не развиваются, так что эмбрион оказывается полностью сегментированным. У доминантных мутантов по этому гену вся передняя половина зародыша превращается в акрон, а задняя — в тельсон. Подобный эффект можно предотвратить, если мутантным зародышам инъецировать цитоплазму нормальных яиц в передний и задний полюсы. Активация белка *torso* осуществляется как на переднем, так и на заднем концах зародыша продуктом гена *torsoless*, функционирующим в фолликулярных клетках. Соматические мутанты, затрагивающие этот ген только в фолликулярных клетках, обуславливают развитие из окруженного ими яйца зародыша с фенотипом *torso*.

Таким образом, анатомические границы терминальных структур — аксона и тельсона — детерминируются геном *torso*, для активации продукта которого необходимы сигнал из фолликулярных клеток (белок *torsoless*) и взаимодействие с генами *tailless* и *huckebein*.

Итак, гетерогенизация цитоплазмы созревающего ооцита и формирование полярных градиентов, химически преформирующих план строения будущего организма, реализуется на основе взаимодействия трех систем генов и при участии питающих клеток материнского организма, окружающих ооцит.

Рекомендуемая литература

1. Гилберт С. Биология развития: В 3 т. М.: Мир, 1993—1995.
2. Рэфф Р., Кофман Т. Эмбрионы, гены, эволюция. М.: Мир, 1986.
3. Development. Frontiers in biology// Science. 1994. V. 266. P. 513-700.
4. Lawrence P. The making of a fly. The genetics of animal design. Oxford: Blackwell, 1992.
5. Zernicka-Goetz M. Fertile offspring derived from mammalian eggs lacking either animal or vegetal poles// Development. 1998.V.125. P.4803—4808.

Вопросы для повторения

1. Что такое ооплазматическая сегрегация?
2. Что такое полярная плазма? Какова ее роль в развитии?
3. Как материнский генотип влияет на развитие зародыша?
4. Как формируется ооцит?
5. Как гены контролируют формирование анимально-вегетативного градиента?
6. Как гены контролируют формирование дорсо-вентрального градиента?
7. Как гены контролируют формирование терминального градиента?

СЕГМЕНТАЦИЯ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ОРГАНИЗМОВ И ЕЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ

КЛАССИФИКАЦИЯ ГЕНОВ СЕГМЕНТАЦИИ. СЕГРЕГАЦИОННЫЕ И ГОМЕОЗИСНЫЕ ГЕНЫ

В реализации плана строения организма ключевое значение имеет его сегментация, разделение на головной, грудной, брюшной отделы и их производные. Этот процесс является универсальным в животном мире и характеризуется двумя основными признаками — количеством сегментов и их качеством. Соответственно различают две группы генов, ответственных за развитие этих признаков: *сегрегационные* и *гомеозисные*.

Сегрегационных генов, детерминирующих число сегментов у *Drosophila melanogaster*, известно более двух десятков. Их мутации нарушают становление передне-задней (анимально-вегетативной) полярности сегментов, в результате чего происходит их слияние, уменьшается количество и образуются нежизнеспособные уроды. За открытие и изучение этих генов американский генетик Э.Льюис (E.Lewis) (рис. 5.1) и немецкие генетики К.Нюсслайн-Вольхардт (C.Nusslein-Volhardt) и Э.Вишхаус (E.Wischhaus) (рис. 5.2) были удостоены Нобелевской премии.

Различают несколько групп сегрегационных генов. Это — *гены материнского эффекта*, которые контролируют формирование градиентов в ходе оогенеза (о них шла речь выше), *GAP-гены*, *pair-rule-гены*, *гены сегментарной полярности*, последовательно осуществляющие сег-

Рис. 5.1. Американский генетик Эдвард Льюис, один из крупнейших биологов современности. Пионер в области исследования гомеозисных генов. Лауреат Нобелевской премии.

Первым оценил значение гомеозисных генов в развитии и привлек к ним внимание молекулярных биологов





Рис. 5.2. Немецкие генетики Кристина Нюслеин-Вольхардт и Эрик Вишхаус, открывшие сегрегационные гены и успешно развивающие идеи Э.Льюиса. Лауреаты Нобелевской премии

ГЕНЫ	ЭФФЕКТЫ МУТАЦИИ	ВРЕМЯ РАННЕЙ ЭКСПРЕССИИ
GAP-гены <i>hunchback</i> <i>Kruppel</i> <i>knirps</i> <i>giant</i> <i>tailless</i>		<11 ядерных делений
Pair rule гены <i>runt</i> <i>hairy</i> <i>ftz</i> <i>even skipped</i> <i>paired</i> <i>odd paired</i> <i>stolpy paired</i> <i>odd skipped</i>		11-12 ядерных делений
Гены сегментарной полярности <i>engrailed</i> <i>wingless</i> <i>gooseberry</i> <i>cubitus interruptus</i> <i>patched</i> <i>hedgehog</i> <i>dishevelled</i> <i>costal2</i> <i>fused</i>		13 ядерных делений

Рис. 5.3. Три группы генов сегментации дрозофилы (по: Lewis, 1998)

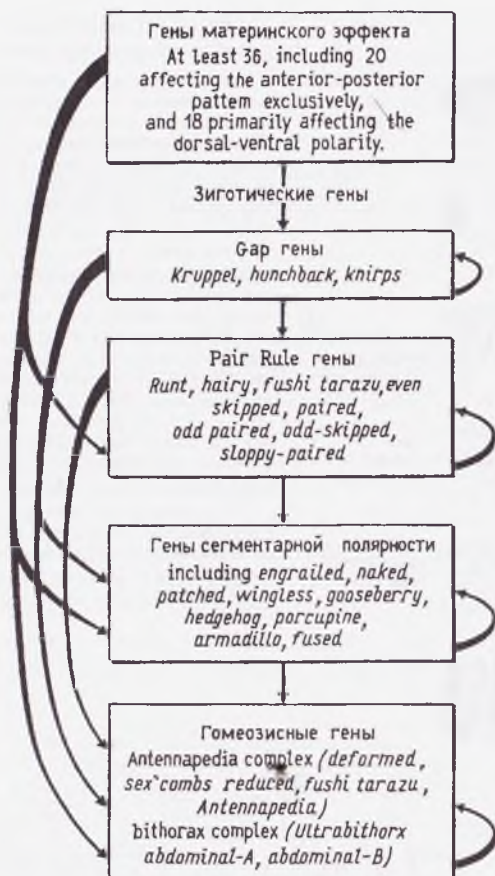


Рис. 5.4. Схема взаимодействий генов, контролирующих сегментацию дрозофилы

ментацию зародыша (рис. 5.3) и подготавливающие почву для функционирования гомеозисных генов (рис. 5.4).

СЕГРЕГАЦИОННЫЕ ГЕНЫ. GAP-ГЕНЫ

Сегрегационные гены последовательно активируются в процессе индивидуального развития (рис. 5.5). В первую очередь активируются *GAP-гены* (от англ. gap — брешь, пролом, щель). Их транскрипция стимулируется продуктами генов материнского эффекта, формирующими градиенты в ходе оогенеза. Они начинают функционировать на синцитиальной стадии развития, когда к 10—11-му циклу клеточного деления ядра мигрируют к перифе-

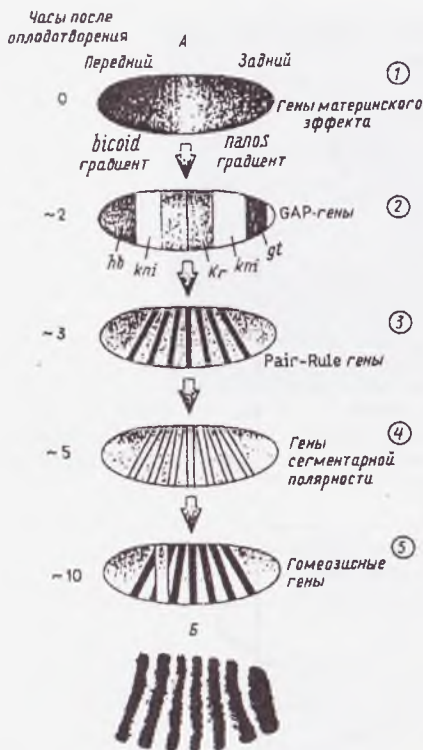


Рис. 5.5. Последовательная активация сегрегационных генов в онтогенезе.

А — каскад генов, осуществляющих процесс последовательного разделения тела развивающегося эмбриона дрозофилы на сегменты: 1) начальная передне-задняя полярность эмбриона устанавливается продуктами генов материнского эффекта, подобными *bicoid* и *nanos*; 2) экспрессия генов *Gap*-группы подразделяет эмбрион на широкие зоны; 3) гены *Pair-rule* (например, *fushi tarazu*) экспрессируются в семи полосках, осуществляя дальнейшее подразделение эмбриона вдоль передне-задней оси; 4) гены сегментарной полярности (например, *engrailed*, эффект которого отражен на схеме) экспрессируются в 14 узких полосках вдоль передне-задней оси; 5) гомеозисные гены, например *Ultrabithorax*, эффект которого показан на схеме, экспрессируются в специфических областях вдоль передне-задней оси; вместе с генами *Pair-rule* и генами сегментарной полярности они детерминируют идентификацию индивидуальных сегментов в развивающемся эмбрионе.

Б — транскрипты гена *fushi tarazu* (*ftz*) локализованы в семи полосках соответственно семи парасегментам (у мутантов *ftz* эти полоски отсутствуют). Гибридизация *in situ* на целом эмбрионе (фотография из работы В. Геринга, цит. по: Lewis, 1998)

Таблица 5.1

Сегрегационные гены

Gap-гены	Pair-rule-гены	Гены сегментарной полярности
<i>Kruppel</i>	<i>hairy</i>	<i>engrailed</i>
<i>knirps</i>	<i>even-skipped</i>	<i>wingless</i>
<i>hunchback</i>	<i>runt</i>	<i>cubitus interruptus</i>
<i>giant</i>	<i>fushi-tarazu</i>	<i>hedgehog</i>
<i>tailless</i>	<i>odd-paired</i>	<i>fused</i>
<i>huckebein</i>	<i>odd-skipped</i>	<i>armadillo</i>
	<i>sloppy-paired</i>	<i>patched</i>
	<i>paired</i>	<i>gooseberry</i>

рии развивающегося эмбриона и “прочитывают” позиционную информацию, возникшую благодаря активности генов материнского организма, формируя на поверхности яйца синцитий (табл. 5.1).

В результате этого процесса зародыш подразделяется на несколько пространственных доменов. Ген *hunchback*, например, экс-

прессуруется в парасегментах 1, 2, 3, 13 и в переднем компартменте 14-го парасегмента (рис. 5.5, А), ген *Kruppel* — в 4, 5, 6 и заднем компартменте 14-го, ген *knirps* — в парасегментах с 7-го по 12-й (рис. 5.5).

Мутации *Gap*-генов вызывают выпадения групп сегментов (рис. 5.6; 5.17), характер их экспрессии изменяется во времени, но зоны экспрессии не перекрываются.

ПАИРЕ-RULE-ГЕНЫ

На фоне специфического распределения продуктов *gap*-генов под их влиянием активируются *Pair-rule*-гены, которые “дробят” зародыш на повторяющиеся домены шириной по два парасегмента, в одном из которых этот ген активен, в другом — нет. Уже к 14-му циклу дробления активность этих генов концентрируется в определенных ядрах. В конце концов, благодаря функционированию генов *Pair-rule* зародыш подразделяется на отдельные сегменты. Нарушение их функционирования ведет к выпадению отдельных (чередующихся) сегментов. Основная “задача” *Pair-rule*-генов заключается в том, чтобы распределить клетки по 14 парасегментам. Они, однако, имеют некоторое значение и в формировании головных структур. Два *Pair-rule*-гена имеют не-

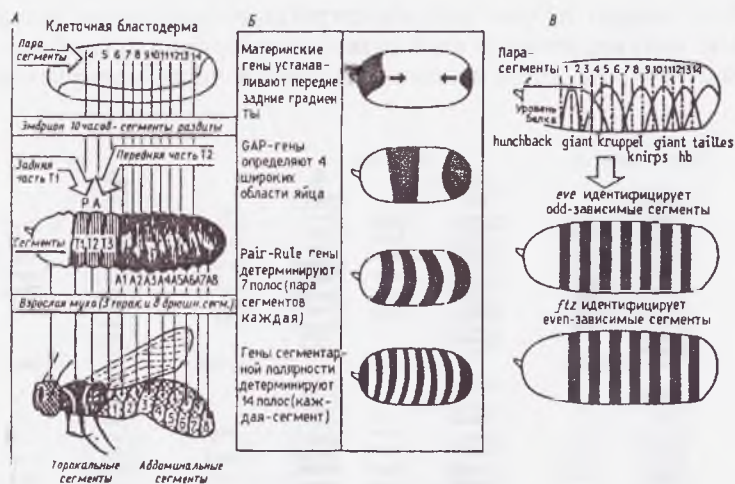


Рис. 5.6. Сегментация в процессе развития дрозофилы (по: Lewis, 1998).

А — процесс развития дрозофилы сопровождается формированием компартментов, которые “обозначают” сегменты и парасегменты (участки тела, включающие заднюю половину одного сегмента и переднюю половину прилежащего сегмента). Б — роль материнских генов в последующем развитии сегментации. В — экспрессия *Gap*-генов подготавливает эмбриона к действию *Pair-rule*-генов, которые, функционируя в пределах участков тела, обозначенных благодаря активности *Gap*-генов, осуществляют дальнейшую сегментацию тела, формируя семь полосок

посредственное отношение к распределению клеток — это *fushi tarazu (ftz)* и *even-skipped (eve)*. Ген *ftz* активен в семи полосках, каждая шириной в три ядра. Эти полосы соответствуют четным парасегментам, которые отсутствуют у *ftz*-мутантов. Клетки, лишенные белка *ftz*, погибают, а личинки *ftz* утрачивают абдоминальные сегменты A1, A3, A5 и т.д. (по-японски *fushi tarazu* означает редукцию числа сегментов). Личинки *eve* утрачивают четные сегменты (рис. 5.6).

ГЕНЫ СЕГМЕНТАРНОЙ ПОЛЯРНОСТИ

Различные сочетания белковых продуктов генов *Pair-rule* активируют гены *сегментарной полярности*.

Гены сегментарной полярности детерминируют границы конкретных сегментов. Мутации, нарушающие их функционирование, влекут за собой нарушения в развитии отдельных сегментов — четных или нечетных, в зависимости от того, какой из генов сегментарной полярности мутировал (рис.5.7). Известно около 15 генов сегментарной полярности, которые фактически создают пространственную дифференцировку внутри каждого сегмента, поскольку области их экспрессии совпадают с границами парасегментов, подразделяющих сегменты на переднюю и заднюю половины.

Как следует из рис. 5.4, все сегрегационные гены, последовательно активируемые в ходе развития эмбриона дрозофилы, оказывают друг на друга взаимные влияния через кодируемые ими

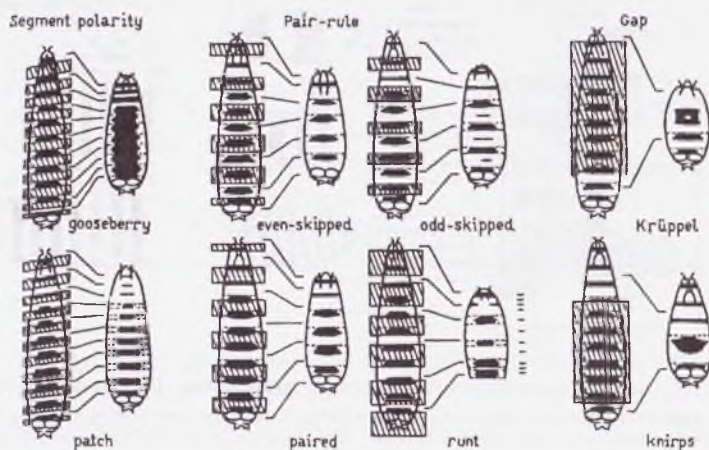


Рис.5.7. Дефекты сегментации тела личинок дрозофилы, обусловленные мутациями генов сегментации (цит. по: *Nature*. 1980. V. 287. P. 796, 1980)

продукты. Экспрессия сегрегационных генов подготавливает “почву” для функционирования ключевой системы генов, обеспечивающих качественную спецификацию сегментов, — системы *гомеозисных генов*.

■ Рекомендуемая литература

1. Гилберт С. Биология развития: В 3 т. М.: Мир, 1993—1995.
2. Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1975.
3. Корочкин Л.И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 2000.
4. Рэфф Р., Кофман Т. Эмбрионы, гены, эволюция. М.: Мир, 1986.
5. Development. *Frontiers in biology// Science*. 1994. V. 266. P. 513-700.
6. Lawrence P. The making of a fly. The genetics of animal design. Oxford: Blackwell, 1992.

? Вопросы для повторения

1. Что такое гены сегментации? Их классификация.
2. Что такое *Gap*-гены?
3. Что такое *Paire-rule*-гены?
4. Что такое гены сегментарной полярности?
5. Каково значение сегрегационных генов?

ОТКРЫТИЕ ГОМЕОЗИСНЫХ ГЕНОВ, ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ

ЧТО ТАКОЕ ГОМЕОЗИСНЫЕ ГЕНЫ?

Название этой группы генов происходит от термина “гомеозис”, который ввел в 1894 г. один из классиков генетики У.Бэтсон. Под гомеозисом он понимал превращение одной части тела в другую. Гомеозисные гены, следовательно, не представляют собой нечто самостоятельное, но являются частью специфической системы генов, контролирующей сегментацию тела насекомых, в частности дрозофилы и других организмов. Примером гомеозисных мутаций является превращение антенны в ногу (*Antennapedia*) или аристы в ногу (*aristapedia*) (рис. 6.1). Один весьма курьезный случай отмечен в хирургической практике: с головы одного пациента хирургам пришлось удалить половой член, в котором при гистологическом анализе обнаружили все свойственные нормальному органу структуры. Возможно, это был вариант гомеозисной мутации у человека.

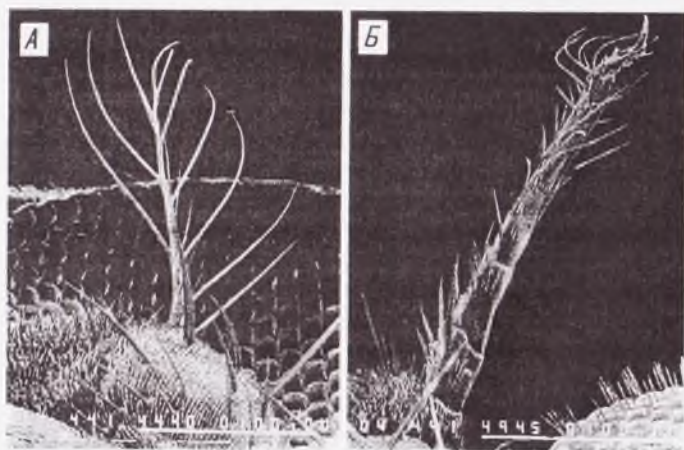


Рис. 6.1. Гомеозисная трансформация *lawe*, в результате которой ариста дрозофилы превращается в элементы конечности (по: Симонова, 1998).

А — контрольная муха, видна нормальная ариста; Б — гомеозисная трансформация

ГЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ ANT-C И BX-C

Гомеозисные гены, которых у дрозофилы описано около полусотни, как уже отмечалось, контролируют *качественные особенности сегментов* и в свою очередь подразделяются на два комплекса: *Antennapedia-Complex (ANT-C)* и *Bithorax-Complex (BX-C)*.

Гены, принадлежащие к *ANT-C*, контролируют развитие головных сегментов, в том числе интеркалярного, максиллярного, мандибулярного, лабиального, а также грудных сегментов. При утрате функции гена *Antp* область тела, включающая заднюю часть первого грудного сегмента T1, весь второй грудной сегмент T2 и переднюю часть T3, приобретают свойства головных сегментов, что проявляется в образовании головных структур в грудной области. Наоборот, в случае эктопической активности гена *Antp*, вызванной, например, мутацией, которая нарушает нормальную для данной области тела репрессию данного гена (например, мутация типа *gain-of-function*), происходит образование грудных структур на голове. Очевидно, ген *Antp* участвует в выборе программ развития в направлении головы или груди. Активное состояние гена *Antp* детерминирует образование некоторых структур грудного отдела посредством подавления развития в направлении головных структур. При подавлении экспрессии этого гена высвобождается тормозившаяся им способность к формированию головных структур.

Гены комплекса *BX-C* ответственны за спецификацию грудных и брюшных сегментов.

Рассмотрим действие гомеозисных генов на примере *BX-C* комплекса. Этот комплекс состоит из трех "отделов": *Ultrabithorax (Ubx)*, ответственного за развитие грудных сегментов, а также *abdomen-A* и *Abdomen-B*, контролирующих дифференцировку брюшных сегментов. Все они построены и функционируют по единому принципу, потому рассмотрим организацию и функционирование только одного из них, а именно *Ubx*.

ОСОБЕННОСТИ ГОМЕОЗИСНЫХ ГЕНОВ НА ПРИМЕРЕ ЛОКУСА *UBX*

Гены, входящие в состав этой области генома, характеризуются четырьмя особенностями.

1. *Собраны в кластер в небольшом участке 3-й хромосомы (3R, 58.8 ед. карты, зона 89E цитогенетической карты)*. В этот кластер, занимающий по крайней мере два плотных диска политенных хромосом (рис. 6.2), входят следующие гены, в порядке их расположения: *bithorax (bx)*, *Contrabithorax (Cbx)*, *Ultrabithorax (Ubx)*, *bithoraxoid (bxd)*, *postbithorax (pbx)*.

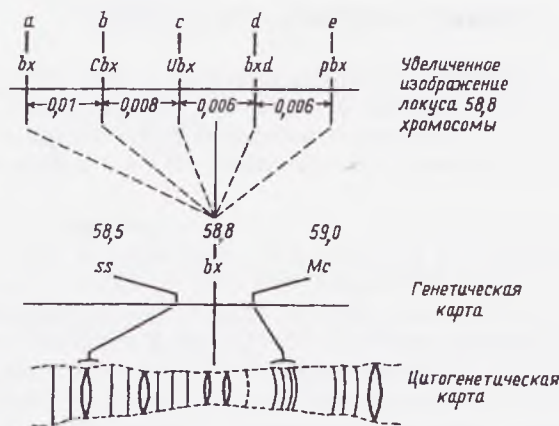


Рис. 6.2. Генетическая и цитогенетическая организация участка *bithorax* хромосомы 3 (по: Lewis, 1963)

Пониманию функционального значения этих генов помогают их мутации (рис.6.3).

- Мутация *bithorax* ведет к превращению передней части заднегруди в переднюю часть среднегруди. Фенотипически такие мухи характеризуются наличием двух нормальных и двух дефектных крыльев. Такие преобразования “плана строения” связаны с дифференцировкой передней части жужжальца в переднюю часть крыла.
- Мутация на другом конце кластера — *postbithorax* — является как бы дополнительной к первой и

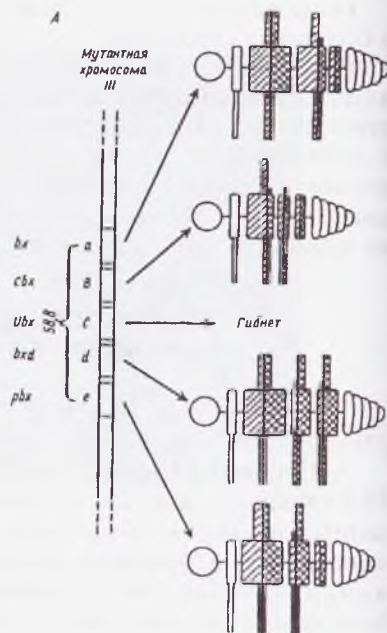


Рис. 6.3. Гомеозисные гены дрозофилы.

А — влияние гомеозисных мутаций на развитие (по: Lewis, 1963). Б — четырехкрылая дрозофила, полученная путем сочетания мутаций *bithorax* и *postbithorax* (по: Lawrence, 1992)

обуславливает превращение задней части заднегруди в заднюю часть среднегруди. Если мутации *bx* и *pbx* объединить в одной особи, то заднегрудь целиком превратится в среднегрудь, так что муха будет иметь двойную среднегрудь и соответственно четыре крыла.

- Мутация *bithoraxoid* сходна по проявлению в фенотипе с *pbx*, но в этом случае первый брюшной сегмент развивается как заднегрудь и несет поэтому жужжальца и ноги. Муха, обладательница этой мутации, кроме дополнительных дефектных крыльев (всего их шесть) имеет восемь ног вместо обычных шести.
- Мутация *Ultrabithorax* в гомозиготе обычно летальна. У нескольких жизнеспособных особей такого типа были обнаружены все описанные выше дефекты, поэтому рассматриваемый субкомплекс и носит название этой мутации.
- У мутантов *Contrabithorax* задняя часть среднегруди развивается в заднюю часть заднегруди. Такие мутанты заметны по своим дефектным крыльям.

2. Колинеарность в расположении генов и контролируемых ими признаков. Действительно, легко заметить, что положение генов в комплексе *BX-C* соответствует последовательности контролируемых ими органов: переднегрудь (проторакс) — среднегрудь (мезоторакс) — заднегрудь (метаторакс) — переднебрюшные сегменты — заднебрюшные сегменты.

3. Цис/транс-эффект. Это означает, что действие двух мутантных генов у одной особи зависит от их положения в двух родительских хромосомах. Например, особи $\frac{bx +}{+ Ubx}$ имеют вид мутанта,

а особи $\frac{bx \ Ubx}{+ \quad +}$ выглядят как дикий тип. Это разновидность эффекта положения, когда одни и те же гены ведут себя по-разному, если находятся в разных хромосомах.

4. Полярность проявления. Эта особенность заключается в том, что, например, трансгетерозиготная особь $\frac{bxd +}{+ pbx}$ испытывает в развитии превращения по типу *pbx*, а не *bxd*. Трансгетерозиготы

$\frac{bx +}{+ pbx}$ и $\frac{Ubx +}{+ bxd}$ проявляют себя соответственно как *pbx* и *bxd*.

Иными словами, аллели дикого типа, лежащие справа от мутантного локуса, инактивируются, так что обнаруживает свое действие их рецессивный мутантный аллель.

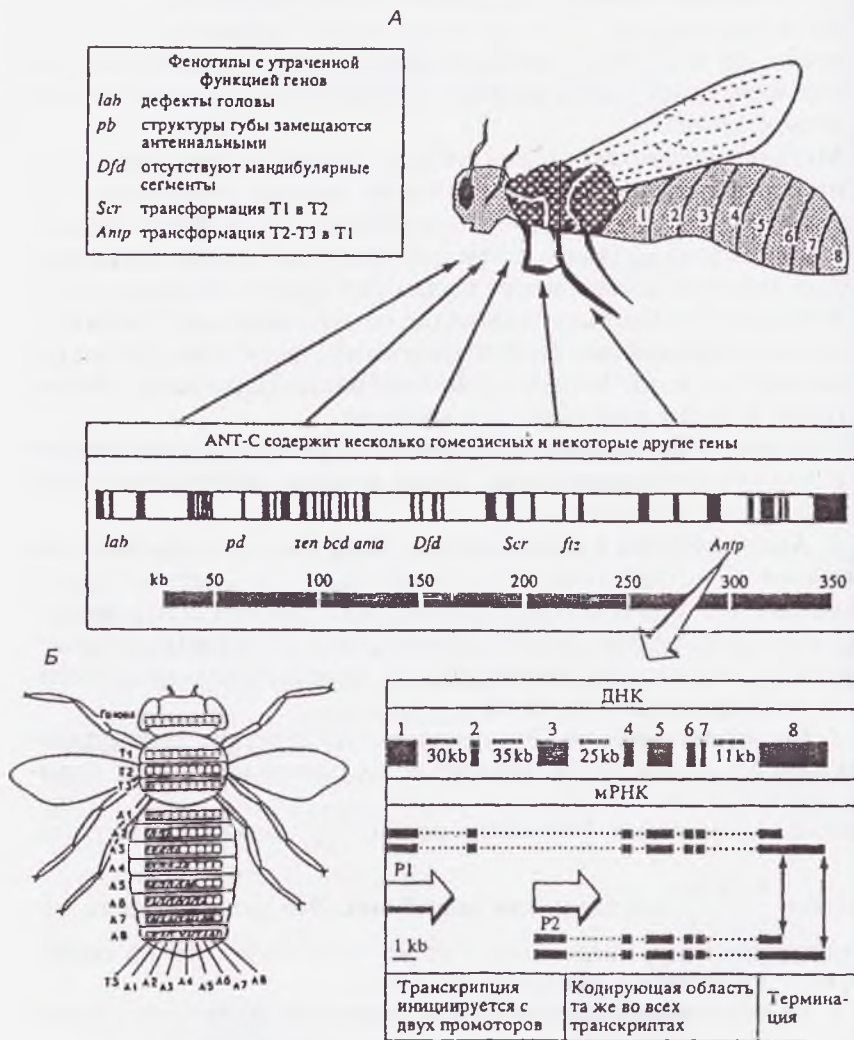
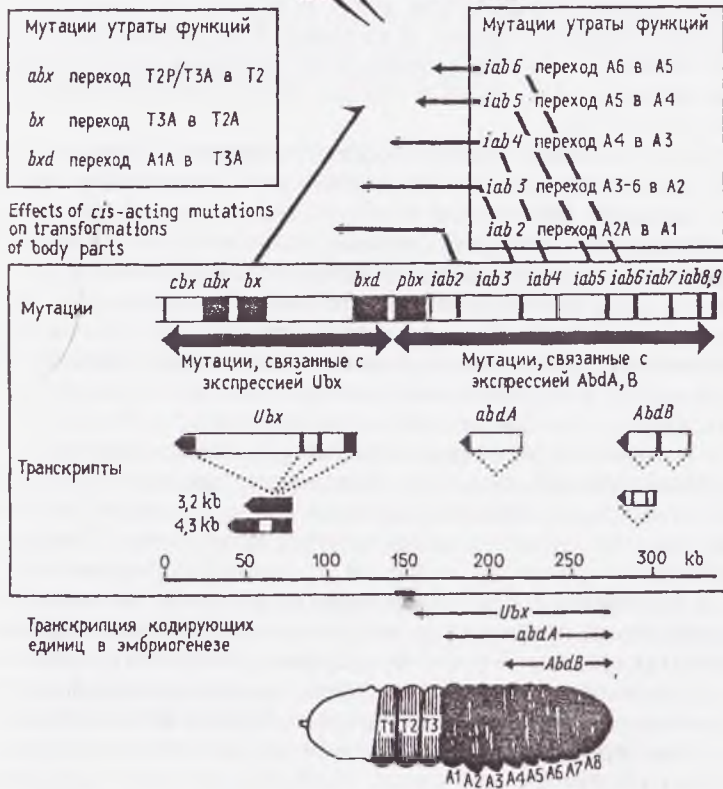


Рис. 6.4. Функции гомеозисных генов.

А — функция гомеозисных генов комплекса *ANT-C* обеспечивает "идентификацию" большинства передних сегментов мухи; гены варьируют в размерах и перемежаются другими генами; ген *Antr* — очень большой и имеет альтернативные формы экспрессии (по: Lewis, 1998). Б — генетическая регуляция генов комплекса *bithorax* (модель Льюиса); второй торакальный сегмент является базисным; в каждом последующем (более каудальном) сегменте активируется дополнительный ген (гены); в терминальном восьмом брюшном сегменте экспрессируются все гены (по: Spierer et al., 1995). В — локус *bithorax* (*BX-C*) имеет три кодирующих единицы. Серия регуляторных мутаций действует на последовательные сегменты мухи. Сайты регуляторных мутаций обозначают области, внутри которых делеции, инсерции и транслокации формируют данный фенотип (по: Lewis, 1998)

В



ГИПОТЕЗА Э.ЛЬЮИСА О МЕХАНИЗМЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГОМЕОЗИСНЫХ ГЕНОВ И ЕЕ ЭВОЛЮЦИОННЫЙ СМЫСЛ

Перечисленные выше особенности гомеозисных генов, естественно, должны были найти какое-то объяснение в терминах феногенетики. Такое объяснение было предложено Э.Льюисом, лауреатом Нобелевской премии из Пасадины. Он исходил из двух постулатов: 1) серия мутантов *bithorax* напоминает оперон бактерий; 2) аллели дикого типа продуцируют вещества, дающие морфогенетический эффект, тогда как мутанты не способны синтезировать их. Например, аллель *pbx* обуславливает синтез веще-

ства S_e , $bx-S_a$ и т.д. Продукт e^+ (или a^+) подавляет потенциальное развитие заднегруди по типу среднегруди, продукт гена bx подавляет потенциальное развитие 1-го брюшного сегмента по типу заднегруди и т.д. (рис. 6.4)

Естественно, утрата способности синтезировать ингибиторы потенциального морфогенеза ведет к осуществлению подавленных формообразовательных тенденций. Свидетельством в пользу данной гипотезы является отсутствие эффекта даже нескольких доз мутантного гена, если в геноме присутствует хотя бы один аллель дикого типа.

Предположение Э.Льюиса несет определенный эволюционный смысл. Действительно, мутация bx → bx^+ может быть аналогична тем, которые обусловили в историческом прошлом превращение многоножек в предков современных шестиногих насекомых, т.е. сначала брюшные сегменты предков образовывали торакальные структуры, но мутация типа bx → bx^+ подавила эту способность. Мутация типа bx → bx^+ могла привести на каком-то этапе эволюционного развития к превращению четырехкрылого предка в двухкрылого. Следовательно, зачатки (например, имагинальные диски), формирующие сегменты, первоначально обладали широким потенциалом развития, который был сужен последовательным рядом мутаций, подобно тому, как в ходе онтогенеза осуществляется последовательное сужение (но с помощью эпигенетических механизмов) проспективных потенций. Этот способ исторического развития является хорошим примером единства онто- и филогенеза. Оно основывается на единстве наследственного материала, реализующего и онтогенетическую, и филогенетическую программы. В некоторых случаях гомеозиса примерно ясен и тот путь онтогенетических преобразований, который мог иметь эволюционную значимость. Так, образование из зачатка крыла жужжалец (гальтеров) объяснимо снижением уровня пролиферации в крыловом имагинальном диске. Уменьшение числа циклов пролиферации могло в данном случае привести к тому, что для образования крыла просто нехватало клеток.

Таким образом, смысл гомеозисных мутаций — изменение плана индивидуального развития с возможным филогенетическим выходом.

Из гипотезы Э.Льюиса вытекают следующие важные следствия.

- В самом ВХ-С как бы преформирована структура сегментов (принцип колинеарности). Реализацию плана сегментарного строения обеспечивает сама функциональная организация этого сложного локуса.
- Каждый ген, контролирующий особенности строения сегмента, должен функционировать посегментно, его продукты должны выявляться в тканях соответствующих сегментов.

- Координированное функционирование генов *VX-C* и других генов сегментации предполагает наличие каких-то *регуляторных* участков, обеспечивающих такую координацию.
- Коль скоро предполагается эволюционный смысл гомеозисных генов, они должны быть *высококонсервативны*, и принципы генетического контроля сегментации, осуществляемого ими, должны быть *универсальными*, присущими самым разнообразным представителям животного мира.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГОМЕОЗИСНЫХ ГЕНОВ

Представления Э.Льюиса были блестяще подтверждены с помощью методов молекулярной генетики. В 1981 г. в группе американского молекулярного биолога Д.Хогнесса был выделен большой фрагмент ДНК размером 200 килобаз (1 кб = 1000 пар нуклеотидов), содержащий *VX-C*. Была построена рестриктивная карта этого фрагмента, т.е. с помощью различных рестриктаз — ферментов, расщепляющих ДНК, удалось “расщепить” его на множество кусочков разной длины. Это позволило:

- изучить с помощью электрофореза и смежных методов структуру ДНК у разных мутантов и определить, насколько она различается, содержит ли делеции или вставки и в каком участке расположены *VX-C*;
- с помощью гибридизации *in situ* с ДНК политенных хромосом исследовать распределение различных изолированных участков ДНК на цитологической карте;
- с помощью гибридизации клонированных фрагментов ДНК с препаратами РНК или на срезах *in situ* выявить распределение комплементарных транскриптов по тканям и время их появления.

Из изложенного можно сделать ряд важных выводов.

- Область (или домен) *Ubx* рассматривается как сложный локус, характеризующийся пятью классами мутаций: *anterobithorax (abx)*, *bx*, *Ubx*, *bx^d*, *pbx*. В этом локусе обнаружено два типа транскрипционных единиц: внутри *Ubx*-единицы картированы мутации *bx^d* и *pbx*. Подавляющее большинство мутаций *VX-C* связано со вставками или вырезанием мобильных генетических элементов (МГЭ). При этом делеция МГЭ в одном пункте *VX-C* может сопровождаться вставкой этого же элемента в другое место комплекса. Например, мутация *pbx* вызывается делецией участка ДНК длиной 17 кб, а *Cbx* — инсерцией идентичного фрагмента. Таким образом, эти мутации дают как бы противоположный эффект: *pbx* превращает заднюю часть заднегруди в заднюю часть среднегруди, а *Cbx* — заднюю часть среднегруди в заднюю часть заднегруди. Возможно,

описанный фрагмент ДНК длиной в 17 кб кодирует направление развития закладок.

■ При анализе участка ДНК в 70 кб, содержащего *Ubx*, было выявлено его экзон-интронное строение; большинство интронов имеют размеры в несколько килобаз, самый большой — 20 кб. Первичный транскрипт — большой, затем он процессируется (разбивается) на три фрагмента размерами 3,7; 4,3; 4,7 кб.

■ Время первого появления транскриптов *VX-C* очень раннее — уже на 2—4-м часах после оплодотворения яйца, т.е. на стадии бластодермы, когда происходит процесс первичной детерминации тканевых закладок. Таким образом, гены морфогенеза функционируют как бы с опережением, задолго до осуществления контролируемых ими формообразовательных событий.

На основании изложенных данных можно предположить, что суть *клеточной детерминации* заключается в создании паттерна транскрипционно активных локусов, специфичного для данной ткани или клеточного типа. Однако определенного момента этот специфический рисунок функциональной организации генома не имеет выхода в специфику клеточного фенотипа, поскольку для активной продукции тканеспецифических веществ необходимо наличие сложного аппарата белкового синтеза. Следующий за клеточной детерминацией первый этап клеточной дифференцировки является, вероятно, процессом неспецифическим, направленным на формирование такого аппарата, и сопровождается высокой транскрипционной активностью генов *house-keeping*.

■ Как и предвидел Э.Льюис, гомеозисные гены функционируют повсеместно. При этом оказалось, что образуемый их транскриптами “тигровый” рисунок возникает очень рано, до четкого проявления признаков самой сегментации. Налицо, таким образом, еще один пример своеобразной химической преформации.

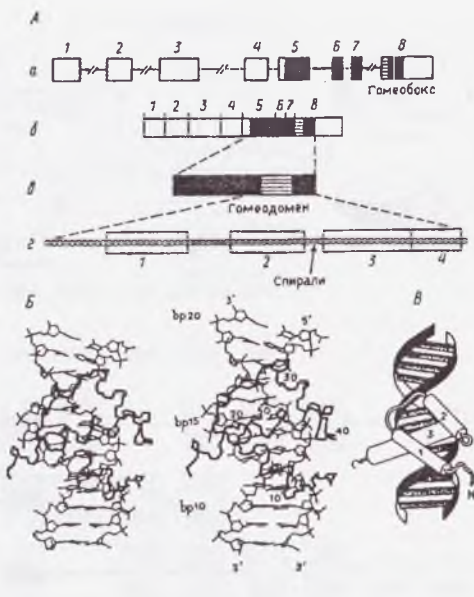
■ Экспрессия гомеозисных генов тканеспецифична. Так, ген *Ubx* транскрибируется в эктодерме и ее производных. В мышцах посегментная экспрессия менее выражена, в энтодермальных производных ее нет. При гибридизации *in situ* на срезах ножные имажинальные диски в этом случае мечены, крыловые — нет. По всей вероятности, сегментоподобное распределение некоторых изоферментов в органах и тканях дрозофилы связано с функцией генов сегментации, в том числе и гомеозисных генов.

■ Благодаря методам генной инженерии удалось выявить распределение продуктов гомеозисных генов. Эти продукты, содержащиеся преимущественно в ядрах клеток, локализованы коррелированно с транскриптами, при этом характер их качественного и количественного распределения зачастую регулируется генами, расположенными в пределах данного комплекса.

Рис. 6.5. Тонкая структура гомеобокса.

Гомеозисные мутации происходят в генах, кодирующих специальный класс транскрипционных факторов. Эти белки родственны высококонсервативному ДНК-связывающему домену — гомеобоксу, который найден практически у всех эукариот, начиная от дрожжей и кончая человеком. 60 аминокислот гомеодомена организованы в специфический ДНК-связывающий мотив, состоящий из трех основных альфа-спиралей, как показано на стереограмме, из которой следует, что гомеобоксу соответствующего белка дрозофилы ко-кристаллизуется со связывающим сайтом.

А — схема строения гена, мРНК и белка Antennapedia (по: Дондуа, 1998): а — ген Antennapedia; б — экзоны (1—8), транскрипты которых образуют мРНК (заштрихованная зона — гомеобокс, черная — транслируемая область мРНК), в, г — структура гомеодомена (кружками обозначены аминокислоты, прямоугольниками — спиральные структуры гомеодомена). Б — стереограмма, демонстрирующая, как три альфа-спирали и N-терминальное плечо организованы в комплексе гомеобокс-ДНК. Эта диаграмма показывает только основные атомы белка. Каждый десятый остаток нумеруется, когда пары оснований 10, 15 и 20 связывающего сайта ко-кристаллизуют с белком. В — схема, суммирующая взаимоотношения альфа-спирали и N-терминального плеча с соответствующей зоной двуспиральной ДНК. Цилиндры представляют альфа-спирали, ленты — сахарно-фосфатную основу ДНК, горизонтальные полоски — пары нуклеотидов (по: Kissinger et al., 1990)



ГОМЕОБОКС И ГОМЕОДОМЕН

Особенно важным открытием было обнаружение в 3-экзонах всех проклонированных гомеозисных генов (и большинства генов сегментации) высококонсервативной области ДНК из 180 пар оснований. Эту короткую последовательность В.Геринг назвал *гомеобоксом*. Соответствующая последовательность из 60 аминокислот в кодируемых этими генами белках, обогащенная аргинином и лизином, была обозначена термином *гомеодомен*. Гомеодомены являются составной частью белков-регуляторов транскрипции и принадлежат, следовательно, к числу *активирующих транскрипцию факторов*. Они характеризуются специфической структурой (рис.6.5) типа “спираль-поворот-спираль” (helix-turn-helix — НТН), которая была впервые обнаружена у ДНК-связывающих белков прокариот и, очевидно, выполняет сходные функции у эукариот. Аминокислотные последовательности гомеодомена образуют три альфа-спирали, при этом первая и вторая расположены антипараллельно, а третья почти под прямым углом к ним. Вторая и третья спирали гомеодомена входят в состав НТН. Третья спираль, распознающая, взаимодействует с молеку-

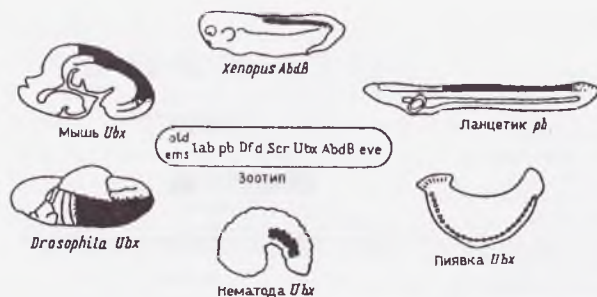


Рис. 6.6. Районы экспрессии отдельных генов *Hox* показаны для трех хордовых, членистоногого, нематоды и кольчатого червя (по Slack et al., 1993).

Животные из далеко разошедшихся в ходе эволюции таксонов имеют гены *Hox*, при этом каждый ген *Hox* экспрессируется в четких пространственных границах в ходе развития зародыша

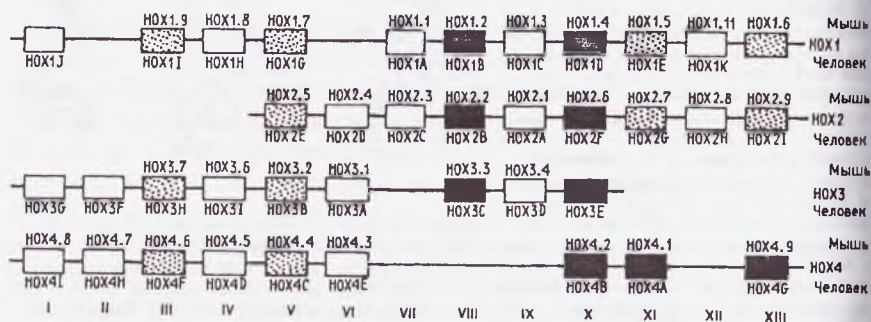


Рис. 6.7. Кластеры генов *Hox* у человека и мыши (по: Murtha et al., 1991)

лой ДНК и располагается в ее большой бороздке. Аминокислотные остатки N-терминального конца гомеодомена “укладываются” в малой бороздке ДНК. Последняя спираль гомеодомена *Antennapedia* представлена либо единой структурой, либо двумя, образующими слабый перегиб.

Гомеодомены могут быть включены в состав генов, как собранных в кластер, так и диспергированных по геному. В.Геринг разделил “кластерированные” гомеодомены дрозофилы на 6 классов: *labial*, *proboscipedia*, *Deformed*, *Sex comb reduced*, *Antennapedia* (куда включены гены *Antp*, *Ubx*, *abd-A*) и *Abd-B*. Дисперсные гомеодомены подразделяют более чем на 16 классов. Показано, что гомеодомены имеют специфическое сродство к определенным участкам ДНК, которые очень часто характеризуются наличием последовательности ТААТ. Отмечено, что гомеодомены одного и того же типа могут взаимодействовать с разными сайтами связывания ДНК и, наоборот, разные гомеодомены могут взаимодействовать с одним и тем же сайтом связывания ДНК.

Активирующая транскрипцию функция гомеодоменов может быть модифицирована взаимодействием гомеодоменов с другими белковыми молекулами.

A

Дрозофила

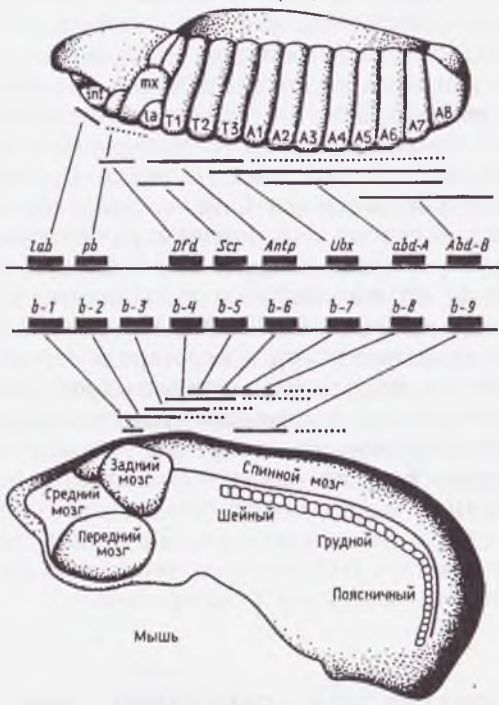
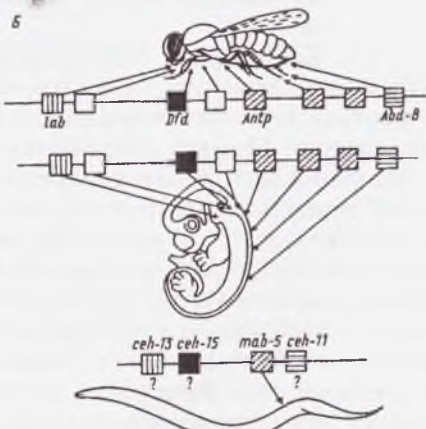


Рис. 6.8. Экспрессия гомеозисных генов у представителей разных таксонов.

А — паттерн экспрессии гомеозисных генов дрозофилы и мыши (по Lewis, 1998). Вверху, экспрессия гомеозисных генов в эпидермисе эмбриона дрозофилы в возрасте 10 часов; торакальные (грудные) и абдоминальные (брюшные) сегменты обозначены T1-T3 и A1-A8. Внизу, экспрессия гомеозисных генов *Hoxb* в центральной нервной системе эмбриона мыши в возрасте 12 дней. Прерывистые линии — распространение экспрессии в каудальном направлении. Обращает на себя внимание, что в различных отделах развивающегося мозга мыши прерываются активности разных *Hoxb*-генов.

Б — коллинеарный принцип организации и экспрессии генов у дрозофилы (вверху), мыши (в центре) и червя *Caenorhabditis elegans* (внизу)



<i>Antp</i>	ERKRGQTYTR	YQTLLEKEF	MFNRYLTRR	RIETIAHALCL	TERQIKIWFQ	NRRMKWKK
<i>mab-5</i>	•S•T•••S•	S•••••	•YMK•••K•	•Q•SET•H•	•••••	•••••
<i>Lab</i>	TWNS•TWF	NK•LT•••••	•••••	•A•	•NT•Q•N•T•V•	•••••
<i>ceh-13</i>	•MGTN•TWF	•T•H•LT•••••	•••••	•TAK•VN•T•	•T••SN•K•Q•A•V•	•••••
<i>Dfd</i>	•P••TA•••	•H•I•••••	•Y•••••	•••••	•T•V•S•••••	•••••
<i>ceh-15</i>	GE••TA•••	•N•V•••••	•TKK•••••	•••••	•V•S•M•••••	•••••
<i>Abd8</i>	SVRKK•KP•SK	F•••••	•L•A•VSKKQ	•W•I•RN•Q•	•••••	•N•••••
<i>ceh-11</i>	SS•K•••••	Q•••••	SV•AK•QSS•VSKKQ	•E•LRLQI•Q•	•D•••••	•A•••••

Гомеобоксодержащие гены (с повсеместным сохранением принципа коллинеарности) были найдены практически у всех живых организмов (губок, гидры, пиявок, нематод и др.), что и можно было ожидать, учитывая их регулирующие процесс транскрипции функции (рис. 6.6). Эти гены богато представлены и у млекопитающих. Гомеобоксодержащие гены, которые собраны у представителей этого класса животных в кластер, принято в настоящее время называть *НОХ*-генами. Они особенно хорошо изучены у мыши и человека. В геноме млекопитающих обнаружено 38 *НОХ*-генов, собранных в 4 кластера (рис. 6.7). Кластеры занимают область примерно по 120 кб каждый и расположены в четырех разных хромосомах: у мыши — II, VI, XI, XV, у человека — II, VII, XII, XVII. Расположение генов в кластере в основном соответствует расположению гомологичных генов в хромосомах дрозофилы (рис. 6.8). При этом, если гомологичные гены занимают одинаковое положение в хромосомах животных разных видов, их называют *ортологичными*. Если же гены одного вида животных занимают одинаковую позицию в разных кластерах и характеризуются наибольшей гомологией, их называют *паралогичными*. Как следует из рис. 6.7, четыре кластера *НОХ*-генов позвоночных имеют сходную организацию, так что в каждом кластере имеется 13 идентичных позиций.

РОЛЬ ГОМЕОБОКСОДЕРЖАЩИХ ГЕНОВ В РАЗВИТИИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Какова роль *Нох*-генов в эмбриогенезе млекопитающих? Ее можно выяснить путем блокады функциональной активности соответствующих генов или путем индукции их эктопической экспрессии (функционирования в необычном месте). Ранее для подавления экспрессии конкретных генов использовали обработку эмбрионального материала антителами против соответствующих генопродуктов, в настоящее время все более распространенным становится так называемый метод *нокаута* (knockout) — замещение нормального аллеля мутантными. Это довольно сложный метод, требующий много времени, но зато очень точный и эффективный. Принцип его представлен на рис. 6.9.

На первом этапе переносят дополнительный селективируемый маркерный ген в трансфецирующую плазмиду в такой позиции, что его экспрессия происходит лишь при правильном встраивании векторной последовательности в ген-мишень. Например, маркерный ген устойчивости к неомицину (*neo*), помещенный в инсертируемый фрагмент ДНК плазмиды без собственного промотора, может экспрессироваться только будучи под контролем другого промотора хромосомной ДНК. Для этого инсерция экзо-

генной ДНК должна произойти в область гена-мишени без сдвига рамки считывания. При случайной интеграции маркерный ген не будет экспрессироваться. Тогда отбор устойчивых к неомицину эмбриональных стволовых клеток (которые используются в экспериментах такого рода) приводит к увеличению частоты клонов, где произошла гомологичная рекомбинация между экзогенной и геномной ДНК и нормальный аллель был замещен мутантным. Нужные колонии, как показано на рисунке, изолируют, затем из них выделяют ДНК, проверяют ее на наличие нужной последовательности ДНК, инъецируют трансформированные эмбриональные стволовые клетки в бластоцисту. Далее бластоциста пересаживается в матку приемной матери. Родившихся мышей используют для получения с помощью генетических методов (см. рис. 6.9) линии “нокаутированных” животных.

Для получения *эктопической экспрессии* генов используют трансгенных животных. В этом случае изучаемый ген вводят в геном другого животного под промотором, который активируется в клетках, где данный ген в норме не функционирует. Необычный промотор заставляет его работать в необычном месте.

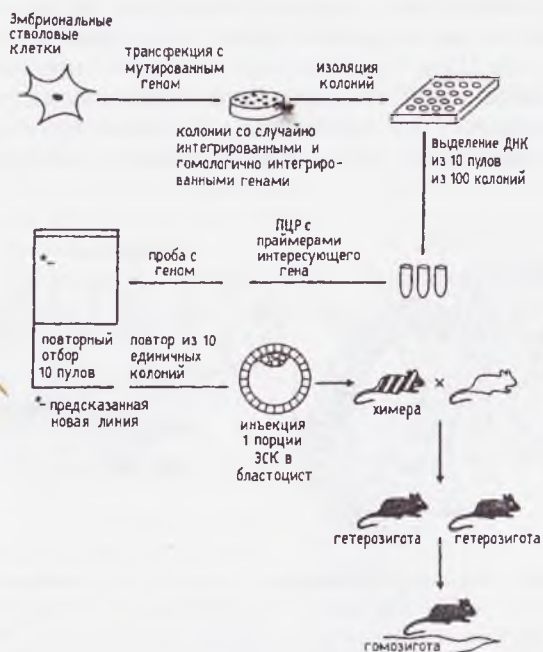


Рис. 6.9. Схема получения “нокаутированных” мышей (по: Горбунова, Баранов, 1997)

ПРИНЦИП КОЛИНЕАРНОСТИ И ГОМЕОБОКС-СОДЕРЖАЩИЕ ГЕНЫ

Что же дало использование описанных выше методов для понимания функций гомеозисных генов? Прежде всего было выявлено, что у позвоночных, как и у дрозофилы, выполняется *принцип коллинеарности*, т.е. корреляции между положением генов в комплексе *НОМ-С* и расположением зон их экспрессии вдоль оси тела. Так, у млекопитающих активность *НОХ*-генов вдоль переднезадней оси тела зародыша соответствует последовательности этих генов в кластере: передние границы экспрессии генов *Hoxa-1* и *Hoxb-1*, расположенных в самом начале кластера (в 3'-положении), находятся в передней области головы зародыша. Ген *Hoxa-5*, расположенный в средней части кластера, экспрессируется в грудной области зародыша, *Hoxb-7* — в туловище, а гены *Hoxd-9*, *Hoxd-10*, *Hoxd-11*, *Hoxd-12*, замыкающие кластер, экспрессируются в задних отделах зародыша (рис. 6.10).

Принцип коллинеарности сохраняется и в случае более поздних морфогенетических событий. Так, у птиц и мышей обнаружено, что экспрессия *НОХ*-генов кластера D в ходе развития зачатка конечности удовлетворяет этому принципу: самый дистальный (5' конец) ген *Hoxd-13* экспрессируется в узкой полоске, занимающей дистальную часть заднего края почки конечности, граница экспрессии гена *Hoxd-12* несколько сдвинута в проксимально-переднем направлении. Еще шире область экспрессии гена *Hoxd-11*, перекрывающаяся с зонами экспрессии генов *Hoxd-12* и *Hoxd-13* и простирающаяся еще дальше в том же направлении. В целом

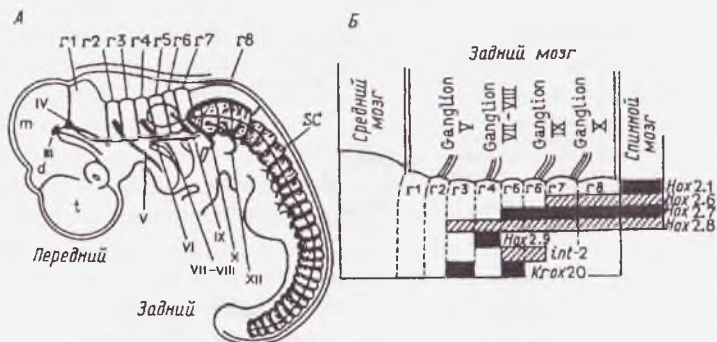


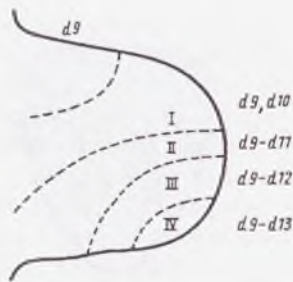
Рис. 6.10. Роль гомеобокс-содержащих генов в формировании паттерна эмбрионального заднего мозга позвоночных (по: Wilkinson, Krumlauf, 1990)

А — сагиттальный вид на эмбриона шпыленка на стадии 18 ромбомеров. Восемь ромбомерон (своеобразных сегментов развивающегося мозга) обозначены как r1-r8; III—XII — черепномозговые нервы. Видно, что V, VII, IX выходят из мозга через ромбомеры r2, r4, r6; SC — спинной мозг; m — мезенцефалон; d — диэнцефалон; t — теленцефалон. Б — схематическое представление экспрессии генов кластера *Hox-2*, *Krox-20* и *int-2* (гомолог FGF- фактор роста фибробластов) в ромбомерах r1-r8

Рис. 6.11. Экспрессия *Hox*-генов в зачатке конечности птиц (Дондуа, 1997; цит. по: Tabin, 1992).

I—IV — зоны, в которых закладываются соответственно первый, второй, третий и четвертый пальцы

зона, расположенная на заднем дистальном крае почки конечности, характеризуется экспрессией пяти *Hox*-генов: *Hoxd-9* — *Hoxd-13*, далее следует зона, где экспрессируются четыре *Hox*-гена: *Hoxd-9* — *Hoxd-12*, далее идут полосы экспрессии трех (*Hoxd-9* — *Hoxd-11*), двух (*Hoxd-9* — *Hoxd-10*) и, наконец, одного — *Hoxd-9* генов (рис. 6.11).



Как следует из рис. 6.10, у млекопитающих в отличие от дрозофилы регионализация тех или иных структур обеспечивается скорее не специфической активностью отдельных гомеозисных генов, а перекрытием зон активности наборов этих генов, так что каждая обособленная область той или иной структуры обязана своим происхождением функционированию специфического, свойственного именно этой области набора гомеозисных генов.

ГОМЕОЗИСНЫЕ ГЕНЫ И МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Внимание к гомеозисным генам велико еще и потому, что они имеют прямое отношение к регуляции морфогенетических процессов. У дрозофилы их эффекты выявляются особенно отчетливо. Характерной особенностью развития этого объекта является самостоятельная реализация двух различных программ — личиночной и имагинальной.

Популяции клеток, которые дают начало личиночным и имагинальным тканям, разделяются очень рано — еще на стадии бластодермы. Клетки, формирующие впоследствии взрослую, имагинальную ткань, выделяют в специфические структуры, так называемые *имагинальные диски* (рис. 6.12).

Последние возникают как выпячивания гиподермы, состо-

Рис. 6.12. Схема расположения имагинальных дисков в личинке дрозофилы (А), а также органов и частей тела имаго, развивающихся из имагинальных дисков (Б) (по: Nothiger, 1972)

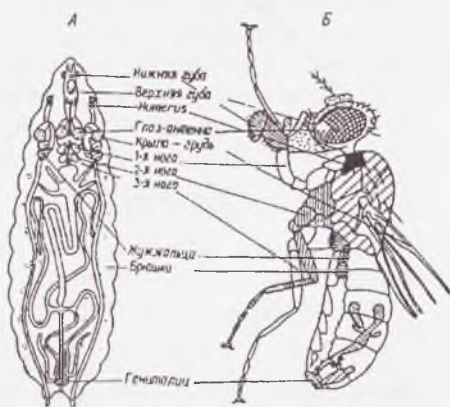
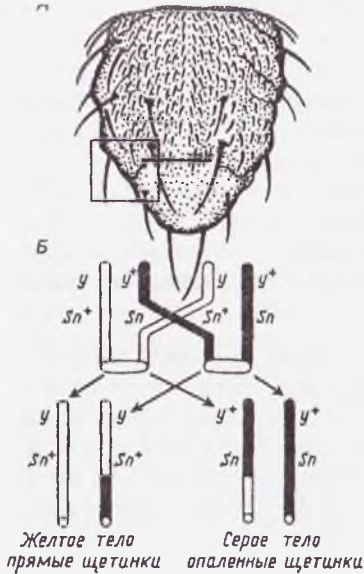


Рис. 6.13. Схема, объясняющая появление клонов клеток разного генотипа в случае соматического кроссинговера (по: Инге-Вечтов, 1988).



Мозаичные участки тела (двойные пятна) у дрозофилы как результат соматического кроссинговера. А — на тораксе мухи участок с желтой окраской тела и нормальными щетинками (светлый) и участок с "опаленными" щетинками, но с серой окраской (в квадрате). Б — схема соматического кроссинговера: генотипы образовавшихся клеток различаются между собой и отличаются от исходной формы

ящие сначала из 10—40 клеток. Затем этот зачаток претерпевает ряд изменений. Так, имеют место:

- размножение клеток, так что их количество возрастает до нескольких тысяч;
- определенная ориентация митотического веретена в ходе деления, так что клеточные деления могут быть как симметричными, так и асимметричными;
- активные движения клеток и их пассивные перемещения;
- локальные различия в величине и форме клеток;
- локальная гибель клеток (апоптоз).

Чтобы исследовать взаимоотношения различных клеток в ходе развития имагинальных дисков, используют метод генетического маркирования с помощью соматического кроссинговера (рис. 6.13).

Таблица 6.1



Оказалось, что морфогенез заключается в образовании *компарментов*. Что это такое? Дело в том, что клеточные клоны, потомки отдельных клеток-предшественниц, объединяются и образуют поликлон. Появляется целый ряд поликлонов, которые формируют морфогенетические зоны. Эти зоны отделены друг от друга четкими границами и обозначаются термином *компармент*. Ф.Крик и П.Лоуренс (F.Crick, P.Lawrence) предположили, что гомеозисные гены как раз и ответственны за образование компарментов и являются своеобразными *генами-селекторами*, поскольку именно они “выбирают” путь развития клетки. Этот путь определяется бинарными решениями — к примеру, стать ли клетке передней или задней, дорсальной или вентральной, грудной или крыловой.

Для образования 8 компарментов необходима активность трех селекторных генов, последовательно принимающих бинарные решения:

Таблица 6.1, как и все данные о гомеозисных генах, наводит на мысль, что существуют специфические регуляторные гены, которые при их активации “запускают” целый каскад структурных генов, обеспечивающих в конечном итоге дифференцировку различных тканевых и органных структур.

ГЕНЫ, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ГОМЕОЗИСНЫХ ГЕНОВ

Обнаружены *две группы* генов, контролирующих активность гомеозисных генов: *Polycomb (Pc)* и группа *trx*.

Группа Pc. Мутации в локусах группы *Polycomb* обуславливают появление фенотипа, который наблюдается при мутациях по гомеозисным генам. На ранних стадиях развития паттерны экспрессии гомеозисных генов в эмбрионах, мутантных по генам *Pc*, не отличаются от паттернов экспрессии этих генов в эмбрионах дикого типа. Но на более поздних стадиях развития транскрипция гомеозисных генов в мутантных линиях продолжается в тех районах, где она в норме должна быть репрессированной. Показано, что белковые продукты семейства генов *Pc* поддерживают и стабилизируют экспрессию конкретных гомеозисных генов, преобразуя ее в стабильное наследуемое состояние, способное сохраняться на протяжении всего периода развития дрозофилы.

Известно около 30 генов группы *Pc*, при этом их белковые продукты различны, но в каждом найден домен, отвечающий за белок-белковые взаимодействия. Белок *Pc*, по которому названо все семейство белков *Polycomb*, гомологичен основному структурному компоненту гетерохроматина — белку HP1. Гомология ограничивается 37 аминокислотами хромомена (домена, ответственного за связывание с хроматином) в N-концевой части двух

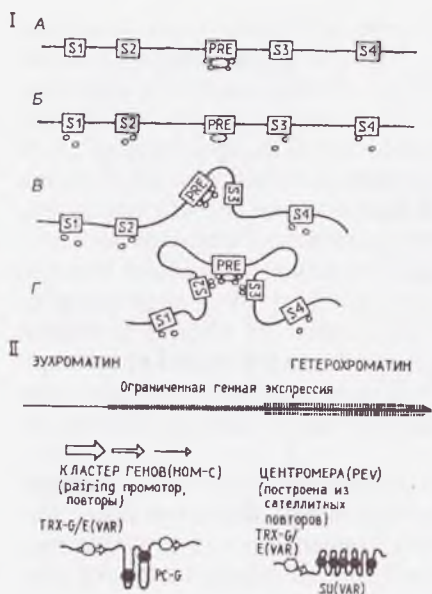


Рис. 6.14. Регуляция функционирования гомеозисных генов (по: Reuter et al., 1998).

II — модель организации репрессированного хроматина в результате формирования комплексов со специфическими белками Pc-G и Su(VAR). Белок Su(VAR) — структурный компонент конститутивного гетерохроматина с повышенным средством к спутниковым повторам. В противоположность этому белок Pc-G связывается с эухроматиновыми сайтами. Это индуцирует формирование более конденсированной, более плотной структуры хроматина. Активаторы хроматина антагонистичны комплексам белков TRX-G/E(VAR) и создают его конфигурацию, способную к транскрипции

антагонистичны комплексам белков TRX-G/E(VAR) и создают его конфигурацию, способную к транскрипции

белков, поэтому мутации, которые затрагивают хромодомен, нарушают способность белка к связыванию с хроматином. Показано также, что белок Pc связывается только с эухроматиновыми районами. Удаление С-конца Pc-гена не влияет на связывание белкового продукта с хроматином.

Предполагается, что белки семейства группы Pc способны репрессировать гомеозисные гены путем создания гетерохроматин-подобных репрессорных структур, поэтому, как и в случае гетерохроматина, эффект белка Pc может распространяться на большие расстояния. Так, в гомеозисном комплексе bithorax (BX-C), когда происходит его репрессия, белок Pc покрывает большие районы ДНК (рис. 6.14). Среди других хорошо изученных белков группы Pc следует отметить белок Posterior sex combs (Psc). Он имеет множественные сайты связывания на политенных хромосомах, почти полностью совпадающие с сайтами связывания белка Pc. Как и Pc-белок, Psc не связывается с гетерохроматином. Они взаимодействуют друг с другом в едином комплексе. Белок Psc включает 1603 аминокислотных остатков, содержит так называемый мотив RING, домен “цинковых пальцев” — C3HC4. Однако ДНК-связывающего домена в Psc не найдено. За белок-белковые взаимодействия в Psc отвечает домен RING. Гомологи Psc найдены у млекопитающих. Они представляют собой протоонкогены. В

связываемый с ДНК белковый комплекс входит еще один белок — Ph, состоящий из 1589 аминокислот и содержащий один “цинковый палец”.

Аналогичную локализацию на политенных хромосомах имеет и другой белок из группы Pc — Scm-Sex comb on midleg. Его размер — 877 аминокислот, он также имеет “цинковые пальцы”. Найдена также гомология по домену SPM, который ответствен за непосредственное взаимодействие белков Scm и Ph с образованием гетеродимера. Недостаточность по двум различным генам Pc часто приводит к летальному эффекту. Поскольку у млекопитающих найдены гомологи генов группы Pc, можно предполагать высокую степень консерватизма тех молекулярных механизмов регуляции гомеозисных генов, которые организуются Pc-системой.

Группа *trx*. Существует, однако, система регуляция гомеозисных генов, *антагонистическая белкам Pc*. Это гены и белки группы *trithorax* (*trx*), активирующие транскрипцию. Мутации генов *trx* повторяют проявление гомеозисных трансформаций, вызванных мутациями в гомеозисных генах, так модифицируя структуру хроматина, что происходит активация транскрипции. Как и в случае Pc-генов, белки семейства *trx* формируют взаимодействующие с хроматином комплексы. Собственно белок *trx* представлен двумя изоформами длиной 3358 и 3726 аминокислот, которые отличаются по N-концевой части. Он содержит ДНК-связывающий домен (DBD), а также несколько доменов, способных принимать участие в белок-белковых взаимодействиях: домен “цинковых пальцев” СЗНС4, консервативный домен SET, гомологичный доменам, содержащимся в продуктах протоонкогенов мыши и человека. Этот домен часто встречается у ДНК-связывающих белков и белков-активаторов транскрипции. Локализация белков группы *trx* на политенных хромосомах дрозофилы совпадает с таковой белков группы Pc.

В группу *trx* также входит еще несколько белков: *brahma* — длиной 1638 аминокислот, GAGA-фактор, антирепрессор, активатор транскрипции с двумя “цинковыми пальцами” и несколькими лизинбогатыми доменами, *ash1*-белок, необходимый для белок-белкового взаимодействия. Белковые комплексы *trx*-группы создают такую структуру хроматина, которая способствует активации гомеозисных генов (рис 6.14).

В ДНК найдены участки, на которых собираются репрессорные комплексы в регуляторных зонах гомеозисных генов *Sex combs reduced*, *Antennapedia*, *Proboscipedia*, *Abdominal-A*, *Abdominal-B*, *Ultrabithorax*, а также в генах белков группы Pc. Такие участки ДНК были обозначены как PRE (Polycomb Responsible Element). Это, следовательно, регуляторные элементы, на которых образуются комплексы, состоящие из белков, продуктов генов группы Pc.

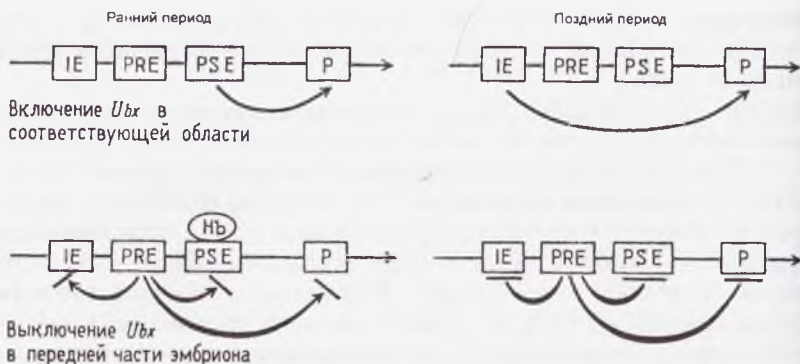


Рис. 6.15. Модель регуляции экспрессии *Ubx* посредством PRE-сайта (по: Pirrotta, Rastelli, 1994).

Промотор *Ubx*-гена (P) регулируется множеством парасегментальных энхансеров (PSE) на расстоянии более чем 80 кб. Эти последние активируются генами сегментации в соответствующей области (включение *Ubx*, верхняя панель) и репрессируются *Gap*-генами *hb* и *tl* (выключение *Ubx*, нижняя панель). Экспрессия имажинальных структур зависит от отдельного набора имажинальных энхансеров (IE), которые активируются позднее и не имеют прямого "входа" от *Gap*-генов, определяющих экспрессию домена (поздний). Репрессированный комплекс собирается на сайте PRE на стадии расширения зародышевой полоски и распространяется (показано черными стрелками), поддерживая репрессированное состояние парасегментарных энхансеров в тех частях эмбриона, где они были репрессированы *Gap*-генами (*Ubx* выключен)

PRE способны поддерживать прилежащие к ним энхансеры в неактивном состоянии в процессе многих клеточных делений и даже всего развития дрозофилы (рис. 6.15). Некоторые элементы PRE содержат много сайтов связывания GAGA-фактора — продукта гена *Trl*. Этот белок индуцирует и поддерживает открытую форму хроматина, он обеспечивает также другим ДНК-связывающим белкам возможность доступа к ДНК.

Для действия продуктов *trx* необходимы те же последовательности ДНК, что и для белков группы *Pc*. Очевидно, белки обеих групп конкурируют за одни и те же белки или участки связывания, что приводит к образованию альтернативных комплексов, которые способствуют либо активации, либо репрессии транскрипции.

“ГЕНЫ-ГОСПОДА” И “ГЕНЫ-РАБЫ”. ОПЫТЫ В.ГЕРИНГА

Итак, дифференциальная транскрипция обеспечивается взаимодействием продуктов многих регуляторных генов, контролирующих в конечном итоге функциональное состояние соответствующих участков ДНК. Было выдвинуто также предположение о существовании как бы “суперрегуляторных” генов, способных запускать последовательные каскады генов, реализующих



Рис. 6.16. Шведский молекулярный биолог Ян-Эрик Эдстрем. Один из основоположников разработки микрометодов исследования.

Микрометоды позволяют проводить молекулярный анализ отдельных изолированных клеток и даже их фрагментов. В свое время работы этого ученого сыграли революционизирующую роль в молекулярной биологии и генетике



Рис. 6.17. Швейцарский генетик Вальтер Геринг. Один из самых ярких биологов современности.

Внес неоценимый вклад в исследование гомозисных генов. Доказал существование генов, непосредственно регулирующих морфогенетические процессы

в конце концов программу специфической клеточной дифференцировки. Для таких генов выдающийся шведский цитолог Я.Э.Эдстрем (J.-E. Edstrom, рис. 6.16) еще в начале 60-х годов XX в. предложил термин “Master Genes” (“гены-господа”), а для контролируемых ими структурных генов соответственно — “Slaves-Genes” (“гены-рабы”).

В.Геринг (W.Gehring) (рис. 6.17) проверил эти соображения экспериментально. Он использовал в своих опытах очень интересную модельную систему. С помощью микроинъекций генноинженерных конструкций получали два типа линий трансгенных дрозофил. В геном первого типа трансгенных *D.melanogaster* вводили так называемую GAL4-систему, где она попадала под разные геномные тканеспецифические энхансеры и, следовательно, активировалась в разных участках тела мухи. GAL4 — это дрожжевой активатор транскрипции, и подобный же эффект он может оказывать, будучи помещенным в геном дрозофилы. Однако его эффект распространяется лишь на те гены, перед которыми расположена так называемая последовательность UAS (upstream activating sequence), содержащая пять GAL4-связывающих сайта. Эту последовательность вводили в геном второго типа трансгенных дрозо-

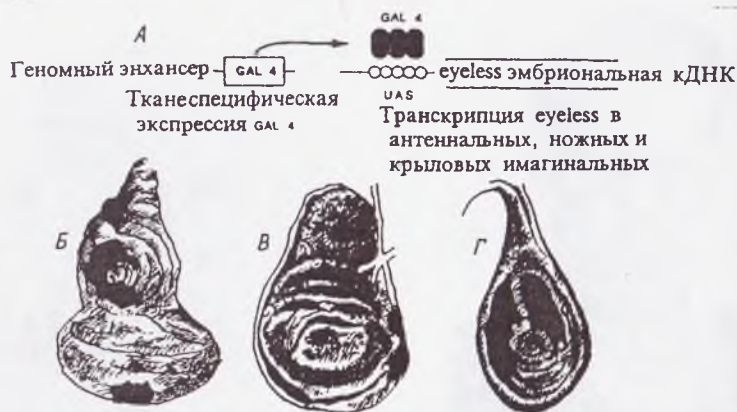


Рис. 6.18. Экспрессия гена *ey* в органах-мишенях (по: Gehring, 1995).

А — схем эктопической индукции *ey* посредством системы GAL4. На Б—Г показано X-gal-окрашивание бета-галактозидазы имажинальных дисков личинок третьего возраста, демонстрирующее активацию репортерного конструкта *UAS-lacZ* посредством GAL4 enhancer-trap линией E-132. Б — глазо-антеннальный диск: верхняя часть диска — антеннальная, нижняя — глазная. Активность бета-галактозидазы определяется в частях антеннального диска, соответствующих нескольким антеннальным сегментам, и на периферии диска, которая дает начало глазной кутикуле. Окрашивание наблюдается также в задней части глазного имажинального диска. В — крыловой имажинальный диск. Активность бета-галактозидазы определяется в проксимальных зонах будущего крылового пузыря, а также в части, соответствующей области стержня и вентральной плевры. Г — ножной имажинальный диск, характеризуется экспрессией *lacZ* в областях, соответствующих *tibia* и *femur*

фил. Если к ней “прицепить” еще и репортерный ген бактериальной галактозидазы *lacZ*, то с помощью окрашивания специальным реактивом (X-gal) можно обнаружить, где эта последовательность будет активирована в результате воздействия продукта GAL4 (рис. 6.18). Геринг скрещивал линии этих двух типов между собой, причем к UAS-последовательности был присоединен ген *eyeless* (*ey*), мутация которого вызывает отсутствие глаз у мухи (именно поэтому Геринг предположил, что этот ген запускает серию генных взаимодействий, осуществляющих морфогенетические реакции образования глаза).

Легко заметить, что в такого рода опытах могут получаться сочетания, в которых ген *ey* будет через UAS-последовательность активироваться в эктопических местах. Это связано с тем, что GAL4 у разных линий находился под контролем разных энхансеров, в том числе и таких, которые функционировали в области крыльев, антенн, ног и т.д. В результате Герингу удалось получить мух, у которых глаза могли появиться в самых невероятных местах — на ногах, крыльях, антеннах (рис. 6.19). Более того, тот же самый эффект достигался и в тех случаях, если вместо гена *ey* дрозофилы использовался гомеобокс-содержащий ген *Small eye* (*Sme*, *Pax-6*) мыши, гомологичный гену *eyeless*!

Рис. 6.19. Образование глаза в необычном месте тела дрозофилы, продемонстрированное в опытах В.Геринга (1995).

Сканирующая электронная микроскопия: эктопический глаз в области головы, формирующей антенну (стрелка)



Американские эмбриологи доказали, что сходный эффект может быть получен и у позвоночных животных. Оказалось, что эктопическая экспрессия гена *Pax6* обуславливала формирование хрусталиковых волокон, ганглиозных клеток, мюллеровских клеток, фоторецепторов и других структур, свойственных эндогенному глазу, в необычном месте. При этом ген *Pax6* вызывает эктопическую экспрессию множества генов, транскрипционно активных в период развития эндогенного глаза, включая такие гены, как *Rx*, *Otx2*, *Six3* и др. Формирование эктопического и эндогенного глаз может быть супрессировано доминантно-негативной формой гена *Pax6*. Таким образом, ген *Pax6* необходим для запуска каскада генов, контролирующими глазообразующие формообразовательные процессы, как у дрозофилы и, вероятно, других насекомых, так и у позвоночных животных.

Из опытов В.Геринга можно сделать ряд заключений.

1. Действительно существуют “гены-господа” и “гены-рабы”.
2. Сложнейшая морфогенетическая реакция, завершающаяся формированием целого органа, может быть запущена одним, “главным” геном, который, следовательно, является ответственным за процессы морфогенеза, разрешая или запрещая (в случае мутации) целый сложный комплекс формообразовательных событий.
3. Морфогенетические процессы основываются на молекулярно-генетических событиях, специфика формы обуславливается спецификой последовательных ткане- и органоспецифических синтезов, разрешенных активацией “главного” гена.
4. Соответствующие молекулярно-морфогенетические системы являются высококонсервативными и обеспечиваются в высшей степени гомологичными молекулярногенетическими системами у самых разнообразных таксономических единиц.
5. Следует, очевидно, расстаться с широко распространенной идеей неких специфически биологических полей, берущей начало с Аристотеля и утверждающей, будто формообразовательные процессы детерминируются особыми факторами наподобие электромагнитных полей, лежащих вне развивающейся системы. Допускалось, таким образом, наличие двух независимых “сил”, ре-

гулирующих процессы индивидуального развития — генетических, которые контролируют молекулярные процессы, и “механических” (биополе), которые контролируют становление формы организма.

В действительности оправдывается предсказание Т.Моргана, что развитие формы напрямую связано с функцией генов и со специфичностью их продуктов, из взаимодействия которых и складывается путь от специфики молекул к специфике формы. Следовательно, формообразовательные события зависят от внутренних процессов, а не от таинственных внешних сил. И совершенно очевидно, что ключевая роль в этих процессах принадлежит гомеозисным генам.

В то же время следует отметить, что феномен, обозначаемый как *мозгогенетическое поле*, реально существует, но под таким полем следовало бы понимать равнодействующую межклеточных взаимодействий, которая имманентна самой развивающейся системе и так или иначе направляет формообразовательные перемещения клеточного материала.

Вместе с тем специфика таких перемещений связана с особенностями адгезионных поверхностных клеточных белков, детерминирующих клеточное сродство (или, напротив, антагонизм), и в конечном итоге определяется активностью соответствующих генов.

Рекомендуемая литература

1. Дондуа А.К. Роль кластерных гомеобоксодержащих генов в морфогенезе животных // Онтогенез. 1997. Т.28. С. 3—17.
2. Корочкин Л.И. Новое в учении о гомеозисных генах // Онтогенез. 1987. Т. 18. С. 565—572.
3. Корочкин Л.И. Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999.
4. Холанд П., Гарсия-Фернандес Х. Гены Нох, эволюция развития и происхождение позвоночных // Онтогенез. 1996. Т. 27. С. 273—279.
5. Brand H., Perrimon N. Targeted gene expression as means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. 1993. V. 118. P.401—419.
6. Halder O., Gallaert P., Gehring W. Induction of ectopic eyes by targeted expressed of the eyeless gene in *Drosophila* // Science. 1995. V. 267. P.1778—1792.
7. Lawrence P. The making of a fly. The genetics of animal design. Oxford: Blackwell. 1992.

Вопросы для повторения

1. Что такое гомеозисные гены?
2. Что такое генные комплексы ANT-C и BX-C?
3. Что такое *Ubx*?
4. Каково возможное эволюционное значение гомеозисных генов?
5. Что дал молекулярно-генетический анализ гомеозисных генов?
6. Что такое гомеобокс и гомеодомен?
7. Какова роль гомеобокс-содержащих генов в развитии млекопитающих?
8. В чем заключается принцип коллинеарности применительно к гомеозисным генам?
9. Какова роль гомеозисных генов в морфогенезе?
10. Как регулируется активность гомеозисных генов?
11. В чем суть и значение опытов Вальтера Геринга?

ЭМБРИОНАЛЬНАЯ ИНДУКЦИЯ И ГЕНЫ, ЕЕ КОНТРОЛИРУЮЩИЕ

ЧТО ТАКОЕ ЭМБРИОНАЛЬНАЯ ИНДУКЦИЯ?

Под эмбриональной индукцией понимают взаимодействие эмбриональных закладок, ведущее к формообразовательному эффекту. Этот эффект достигается через реакцию ткани-мишени, которая становится детерминированной к определенному типу развития. Далее детерминированное состояние реализуется в процесс дифференцировки.

Первичной эмбриональной индукцией принято называть (как оказалось, не совсем точно) взаимодействие хордомезодермы и презумптивной нейроэктодермы в ходе гастрюляции, обуславливающее процесс первичного органогенеза — формирование нервной трубки. В результате этого взаимодействия запускается цепь морфогенетических (формообразовательных) событий. В зависимости от типа образуемых при этом структур различают следующие варианты первичной эмбриональной индукции:

- *архенцефалическая* — в результате нее образуются *передний мозг, ног, глаз, хрусталик;*
- *дейтеренцефалическая* — *средний мозг, задний мозг, слуховые пузырьки;*
- *мезодермально-энтодермальная* — представлена тремя вариантами:
 - 1) *спино-каудальная* — *спинной мозг, хвостовая хорда, сомиты;*
 - 2) *туловищно-мезодермальная* — *туловищная хорда, сомиты, почечные канальцы, мезотелий, кровяные островки;*
 - 3) *энтодермальная* — *глотка, пищевод, кишечник.*

Явление первичной эмбриональной индукции открыл в 20-е годы XX в. выдающийся немецкий эмбриолог Г. Шпеман (рис. 7.1). Он считал, что весь процесс индивидуального развития складывается из цепи эмбриональных индукций, шаг за шагом определяющих формирование, дифференцировку органов и их систем и становление внешнего облика развивающейся особи, ее регионализацию (рис. 7.2).

Г. Шпеман, проводя опыты по трансплантации участка губы бластопора от одного зародыша тритона на брюшную часть другого зародыша, получил удивительный результат: на брюшной сто-

Рис. 7.1. Ганс Шпеман. Первооткрыватель эмбриональной индукции. Лауреат Нобелевской премии. Создатель современной экспериментальной эмбриологии.

Исследования Шпемана и его учеников придали учению об индивидуальном развитии совершенно новый вид



роне экспериментального зародыша формировалась вторая нервная пластинка, развивавшаяся позднее в нервную трубку. На каждой ее стороне образовывались слуховые пузырьки, ряды сомитов и таким образом позникала вторая закладка осевых органов (рис. 7.3). Эти опыты и заложили основы учения об эмбриональной индукции, до сих пор занимающего центральное место в биологии индивидуального развития. В 50—60-е годы XX в. голландский эмбриолог П. Ньюкооп продемонстрировал, что первым индуцирующим событием в развитии зародыша является не воздействие хордомезодермы на презумптивную нервную пластинку, а стимуляция энтодермой преобразования смежных клеток в хордомезодермальную закладку. По сути дела, это событие и является истинно первичной эмбриональной индукцией (рис. 7.4).

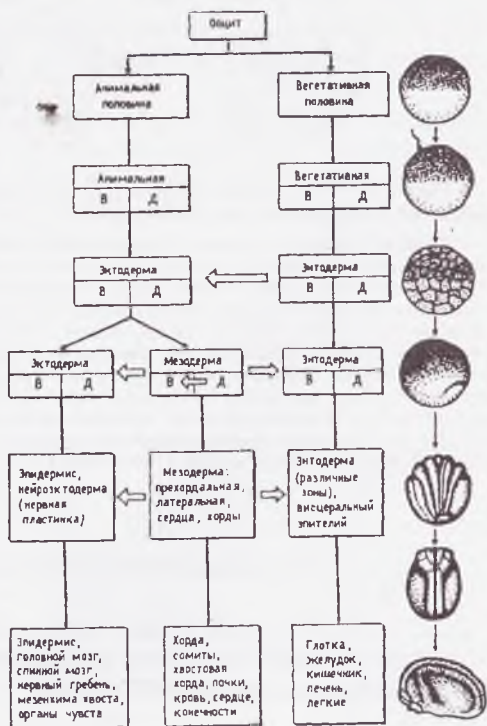


Рис. 7.2. Схема цепи индукций, сопровождающих индивидуальное развитие (по: Михайлов, 1988).

Стрелками показано направление воздействия; В -- ventральная; Д -- дорсальная



Рис. 7.3. Трансплантация кусочка индуцирующей ткани в развивающийся эмбрион тритона (по Tiedeman, 1963).

В результате трансплантации образуется вторая система осевых органов. У представленной на фотографии личинки тритона видна вторая голова с глазом (E.i.)

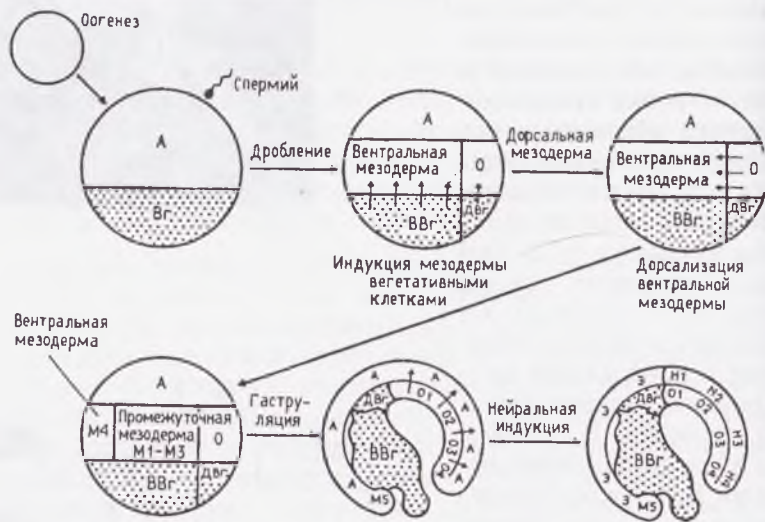


Рис. 7.4. Схема, иллюстрирующая индукционные взаимодействия в раннем развитии *Xenopus* (по: Smith et al., 1985).

В процессе оогенеза возникает анимально-вегетативная полярность. После оплодотворения происходит перераспределение цитоплазмы, оно делит вегетативную часть на дорсо-вегетальную (ДВг) и вентро-вегетативную (ВВг) области. В период дробления осуществляется индукция мезодермы. Область ДВг индуцирует в лежащих над ней дорсальных краевых клетках активность организатора (О), тогда как область ВВг индуцирует осевую мезодерму (М). Полярность мезодермы (М1, М2, М3, М4) является отражением полярности подстилающих ее вентральных клеток. В период гаструляции вентральная и боковая мезодерма перемещаются по сторонам зародыша (на рисунке не показаны), а дорсальная мезодерма распространяется (О1, О2, О3, О4) и индуцирует лежащие над ней эктодермальные клетки. Индукция побуждает эктодермальные клетки к превращению в нейральные клетки (Н1, Н2, Н3, Н4). Таким образом, полярность энтодермы передается нейральной ткани. Неиндуцированная эктодерма (А) становится эпидермисом (Э).

ЧТО ТАКОЕ ИНДУКТОР И КОМПЕТЕНТНАЯ ТКАНЬ?

Каждая эмбриональная индукция характеризуется тремя факторами: *индуктор, компетентная ткань, взаимодействие индуктора и компетентной ткани.*

Индуктор

Индуктор (более старое название — организатор) — тканевая вкладка, воздействующая на компетентную ткань. Характеризуется рядом особенностей: *образованием индуцирующих агентов, созреванием способности к индукции, автономностью созревания.*

Образование индуцирующих агентов. Эффект эмбриональной индукции, как будет показано ниже, обусловлен индуцирующими агентами. В исследованиях лабораторий Х.Тидемана, С.Тойвонена, Т.Ямады было показано, что это низкомолекулярные белки, которые выделяются индуцирующей тканью и воспринимаются компетентной тканью, вызывая формообразовательный эффект. Предполагалось существование двух индуцирующих агентов — нейтрализующего и мезодермализующего, от соотношения которых зависит региональная специфичность индуцирующего эффекта. Рис. 7.5 иллюстрирует эту, так называемую двухградиентную гипотезу эмбриональной индукции. Как мы увидим, в действительности механизм влияния индуцирующих агентов более сложен. Они образуются еще в период оогенеза и распределяются по объему развивающегося яйца неравномерно, формируя градиенты распределения, важные для нормального процесса эмбрионального развития. Х.Тидеман (рис. 7.6) обнаружил, что индуктор находится в связанном с белком-ингибитором инактивированном состоянии, так что акт индукции сопровождается высвобождением индуктора из этой связи.

Таким образом, поступающие в компетентную ткань молекулы индуктора являются как бы триггерным сигналом к началу цепной реакции — удалению ингибитора и высвобождению собственных белков-индукторов. Открытие ингибиторов позволило объяснить на молекулярном уровне явление открытой Дж.Гольцфрете-

Рис. 7.5. Схема двухградиентной гипотезы (M/N-гипотеза) эмбриональной индукции (по: Саксен, Тойвонен, 1961).

Согласно этой гипотезе, в развивающемся яйце существует два типа эмбриональных индукторов — мезодермальный (M) и нейтральный (N). Первый индуцирует нейральные структуры, второй — мезодермальные производные. Региональная специфичность зависит от количественного соотношения концентраций этих индуцирующих агентов в соответствующей области зародыша. Нейтральный агент в чистом виде должен индуцировать только переднеголовые структуры, добавление мезодермального агента ведет к сдвигу индукции в сторону заднеголовных структур, мезодермальных производных в зависимости от количества мезодермального агента

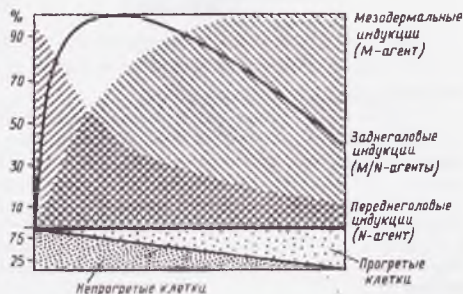




Рис. 7.6. Хейнц Тидеман. Немецкий эмбриолог.

Впервые выделил фактор, ответственный за индукцию мезодермальных производных. Разработал оригинальную модельную систему, позволившую анализировать специфику формообразовательных процессов в зависимости от соотношения концентраций индукторов

ром так называемой самонейрализации, дифференцировки без воздействия индуктора (рис. 7.7). Уже давно известно, что дифференцировка эктодермы гастротомы может быть вызвана различными веществами и без добавления индуцирующих агентов — щелочи, мочевины, тиоцианата, кислоты. Общее в них то, что они более или менее токсичны для эктодермы. Дифференцировка

эктодермальных эксплантатов (кусочков ткани, вырезанных из зародыша и помещенных в среду для культивирования) может быть

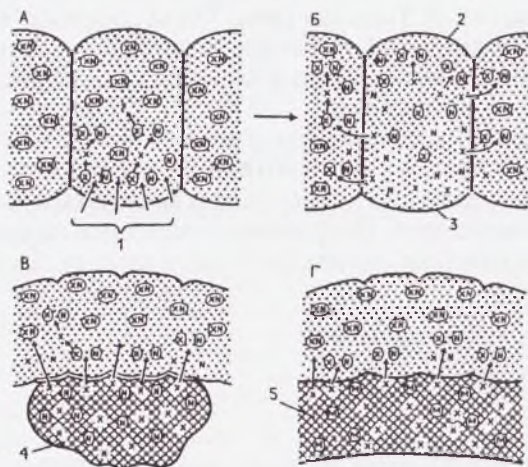


Рис. 7.7. Схема, иллюстрирующая представления Дж. Гольцфретера (1948) о механизме самонейрализации и ее связи с индуцирующим действием убитых и нормальных тканей индуктора.

А и Б — компетентная эктодерма, содержащая агенты X и N в форме неактивного соединения XN. При действии солевого раствора это соединение расщепляется, высвобождающиеся агенты X продолжают лавинно расщеплять группы XN, а высвобождающийся нейроген N вызывает нейрализацию.

В и Г — при действии убитой эктодермы и нормальной хордомезодермы в эктодерму переходит один агент X, освобожденный убиванием в эктодерме и обособленный от мезодермального агента M в мезодерме. 1 — солевой раствор; 2 — наружная поверхность эктодермы, покрытая поверхностной оболочкой; 3 — внутренняя "обнаженная" поверхность эктодермы; 4 — убитая эктодерма; 5 — хордомезодерма

вызвана изменением состава среды. Очевидно, такого рода экстремальные воздействия, переводящие клетку в состояние, которое граничит с лизисом, способствуют разрыву связи индуктор-ингибитор, так что индуцирующие факторы, прикрепленные вместе с ингибитором к мембранным структурам, могут высвободиться из этих структур и “организовывать” дифференциальную экспрессию генов в самодифференцирующихся клеточных системах.

Созревание способности к индукции. Оно заключается в регионализации — постепенном приобретении каждой частью индуцирующей ткани способности индуцировать определенный набор структур. Ткань индуктора не сразу приобретает способность к индукции всего того спектра структур, который образуется под ее влиянием в ходе эмбриогенеза. На самых ранних стадиях созревания она обладает способностью индуцировать лишь образование пигментных клеток, затем переднеголовных структур и, наконец, мезодермальных структур. Индуцирующая хордомезодерма постепенно расчленяется на зоны, дающие разный региональный эффект (рис. 7.8).

Автономность созревания индуктора. Зависит ли процесс созревания индуктора от окружающих тканей или является автономным? Ответ на это вопрос был получен с помощью метода эксплантации. Кусочки ткани индуктора вырезали из зародышей амфибий на ранней стадии развития и культивировали в физиологическом растворе для амфибий. Через определенные промежутки

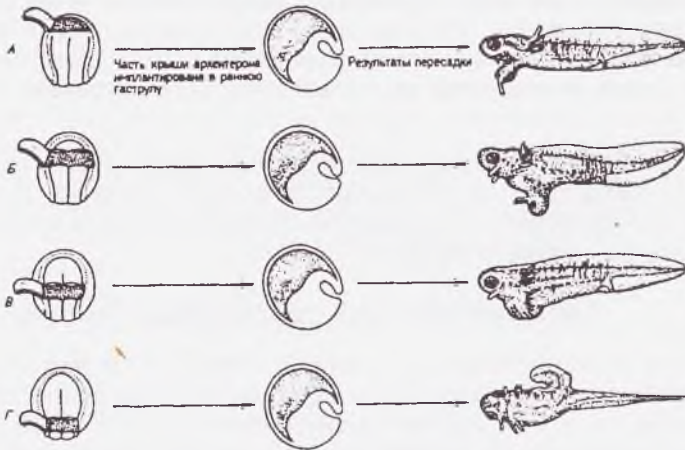


Рис. 7.8. Региональная специфичность индукции (по: Mangold, 1933).

Может быть обнаружена посредством имплантации различных участков крыши архентерона (обозначены серым цветом) в бластоцель зародыша обыкновенного тритона на стадии ранней гастралы. У животных-хозяев сформировались различные дополнительные структуры: *A* — голова с балансами. *B* — голова с балансами, глазами и передним мозгом. *B* — задняя часть головы, задний мозг и слуховые пузырьки: *Г* — туловишно-хвостовые структуры

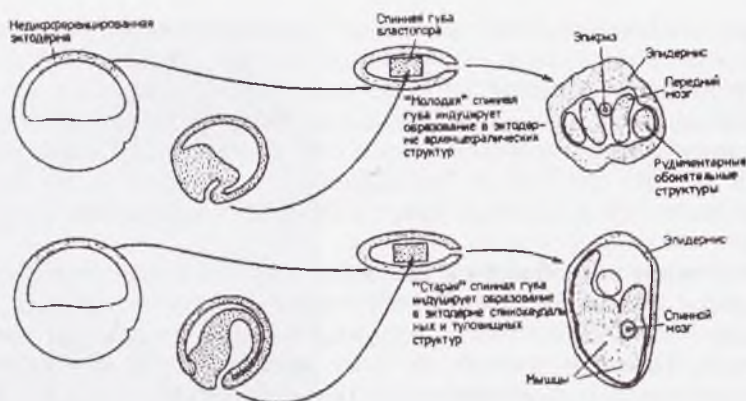


Рис. 7.9. Методика “сэндвича”, разработанная Дж.Гольтфретером (по: Гилберт, 1994).

Участки спинной губы бластопора, взятые на стадии ранней (“молодые”) и поздней (“старые”) гастролы, помещены между двумя слоями эктодермы ранней гастролы. Возраст спинной губы бластопора определяет специфичность индуцируемых структур

времени сравнивали индуцирующие способности этих эксплантатов и ткани индуктора, входящей в состав развивающегося зародыша. Делали это с помощью так называемого метода сэндвича (рис. 7.9): изолировали презумптивную нейроэктодерму и в нее “заворачивали” кусочки индуктора. Получалось некоторое подобие сэндвича или пельменя. Такой “пельмень” помещали в физиологический раствор и через несколько дней анализировали гистологически, какие структуры были индуцированы в компетентной ткани. Оказалось, что индуцирующие свойства ткани изменяются во времени совершенно одинаково в случае, когда кусочки ткани находятся в составе зародыша и когда изолированы в культуре.

Следовательно, *созревание индуктора осуществляется автономно, независимо от окружающих тканей зародыша. В ходе созревания изменяются индуцирующие свойства ткани в строго определенном направлении и закономерно.*

Компетентная ткань (реагирующая система)

Это та тканевая закладка, которая подвергается действию индуктора и отвечает на него формообразовательным процессом. Как и индуцирующая ткань, ее характеризуют три свойства: *компетентность, автономность созревания, эффект минимальной массы.*

Компетентность. Это физиологическое состояние реагирующей системы, в котором она способна воспринимать воздействие индуктора. Дело в том, что клетки реагирующей системы должны пройти определенные фазы развития, прежде чем они приобре-

Рис. 7.10. Постепенная утрата компетенции в ходе гаструляции, определяемая методом "эктодермальной складки" (по: Ньюкооп, 1959).

По оси ординат — относительное расстояние, на которое распространяется активирующее и трансформирующее действие

тут способность к восприятию сигналов индуктора к детерминации и дифференцировке.

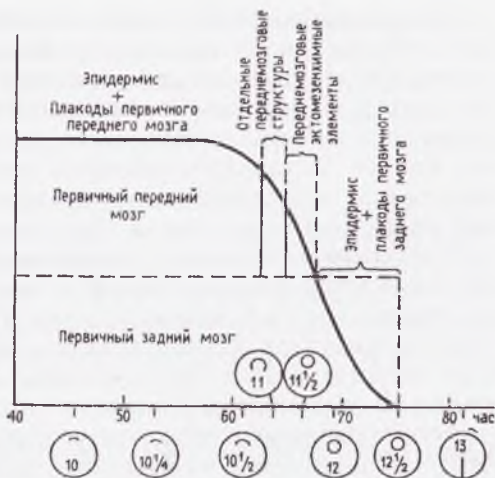
До сих пор неизвестны молекулярно-генетические основы компетенции, но предполагают, что она может быть связана с образованием рецепторов, способных "опознавать" молекулы индуктора и обеспечивать их транспортировку внутрь клетки.

Таким образом, реагирующая система, подобно индуктору, должна созреть для осуществления индукции. Это созревание реализуется в данном случае на уровне изменения компетенции. На рис. 7.10, заимствованном из работы П. Ньюкоопа, демонстрируются изменения компетенции в ходе эмбриогенеза.

Автономность созревания. Вполне закономерен вопрос, изменяется ли компетенция реагирующей системы под влиянием развития окружающих тканей или наподобие созревания индуктора — автономно?

Эксперименты, посвященные решению этого вопроса, сходны с описанным выше опытами по определению особенностей созревания индуктора. В них также используются методы эксплантации и сэндвича, только тестируются свойства компетентной ткани, а потому она культивируется разные промежутки времени. Сравнивается спектр морфологических структур, образованных компетентной тканью сэндвича через разные промежутки времени ее культивирования. Полученные результаты сопоставляются с данными опытов, проведенных с компетентной тканью, изолированной из целого зародыша (через те же промежутки времени, через которые исследовали компетентную ткань в условиях эксплантации) и подвергнутой действию индуктора. Оказалось, что временные изменения компетенции тканевой закладки совершенно идентичны независимо от того, находится ли она в эксплантате или в целом зародыше.

Следовательно, созревание компетентной ткани, как и созревание индуктора, автономно, строго направлено, закономерно и не зависит от тканевого окружения.



В созревании компетентной ткани важную роль играет не только клеточный, но и тканевый уровень. Оказалось, что презумптивная нейроэктодерма гетерогенна и состоит из двух клеточных популяций. С помощью электронного микроскопа в нейроэктодерме у тритона были обнаружены электронноплотные и прозрачные клетки. Если на эксплантаты презумптивной эктодермы подействовать мезодермализующим индуктором, то электронноплотные клетки дегенерируют, а прозрачные дают начало различным производным мезодермы. С помощью электрофореза диссоциированные клетки презумптивной эктодермы удается разделить на две группы (по их компетентности): 1) реагирующие на нейтрализующий индуктор и гибнущие при обработке мезодермализующим агентом и 2) с противоположным типом реакции на эти агенты. В дальнейшем оказалось, что изменения в компетенции диссоциированных клеток презумптивной эктодермы коррелируют с изменениями в их чувствительности к разрушающему действию индуктора. Следует обратить внимание на то, что морфогенетические процессы вообще обычно сопровождаются гибелью значительных масс клеток (см. раздел “Апоптоз” с.190), и это обеспечивает последовательную смену популяций клеток в ходе онтогенеза. Начиная с самых ранних этапов развития она наблюдается в различных тканях — нервной, мышечной и др. Гибель клеток в ходе дифференцировки имагинальных дисков у насекомых была описаны многими авторами.

Эффект минимальной массы. Чтобы компетентная ткань реагировала на действие индуктора, кроме всего прочего, необходимо наличие в ней определенного, минимального количества клеток, т.е. требуется некоторый “порог массы”. Впервые это обнаружил К.Гробстайн у цыпленка, но более демонстративны опыты на амфибиях Г.В.Лопашова. Он сращивал 2—10 фрагментов, выделенных из области презумптивной головной мезодермы ранней гастролы. Эксплантаты из одного фрагмента развивались в поперечно-полосатые мышцы без хорды или каких-нибудь других тканевых компонентов. Однако при совместном культивировании 2—4 таких фрагментов они образовывали компактную массу, в которой развиваются участки хорды. Комбинация 4—5 таких фрагментов приводила к образованию мышц, хорды и эпидермиса. При культивировании 6—10 фрагментов возникали мозговые структуры, обычно на другом конце эксплантата. Суммарную картину развития можно представить следующим образом:

- 1 фрагмент — мышцы;
- 2—4 фрагмента — мышцы + хорда;
- 4—5 фрагментов — мышцы + хорда + эпидермис;
- 6—10 фрагментов — мышцы + хорда + эпидермис + ЦНС.

Г.В.Лопашов предположил, что на стадии ранней гастролы в зоне будущей мезодермы изменяются свойства в направлении от

краевой зоны к эктодерме. Между эктодермальной и мезодермальной компетенцией этой зоны (т.е. способностью формировать эктодермальные и мезодермальные производные) существуют определенные соотношения, так что увеличение общего количества презумптивных мезодермальных тканей приводит к нейтрализации надголовной ткани.

С какими событиями связан эффект минимальной массы? Некоторые авторы предполагают, что он обусловлен необходимостью пороговой концентрации белка-индуктора для осуществления стимулирующего эффекта. Чем больше клеток в кусочке, тем выше концентрация в нем молекул индуктора, скапливающихся в межклеточных щелях. Однако прямых доказательств этой гипотезы пока что не получено.

Взаимодействие индуктора и компетентной ткани

Это взаимодействие характеризуют следующие три параметра: *проникновение индуцирующих агентов в компетентную ткань, пространственные закономерности взаимодействия, временные закономерности взаимодействия.*

Проникновение индуцирующих агентов в компетентную ткань. Длительное время шел спор, достаточно ли для реализации акта индукции простого соприкосновения тканей индуктора и реагирующей системы или необходимо проникновение молекул индуцирующих агентов из ткани индуктора в компетентную систему (рис. 7.11).

В опытах Ж.Браше, К.Гробстайна, Л.Саксена и др. было показано, что отделение индуктора от компетентной ткани с помощью мембранных фильтров, предотвращающих их контакт, не допускающих диффузию индуцирующих агентов, не предотвращает индукцию. Более того, если прокультивировать индуцирующую ткань в физиологическом растворе, затем удалить ее и поместить в этот раствор компетентную ткань, последняя обнаружит спо-

Рис. 7.11. Возможные механизмы передачи индукционных влияний (Lehtonen, цит. по: Михайлов, 1988).

А — диффузия; Б — взаимодействие молекул матрикса с комплементарными структурами мембран клеток-мишеней; В — взаимодействие между поверхностными мембранными структурами клеток ткани-индуктора и реагирующей ткани; Г — взаимодействие через межклеточные соединения

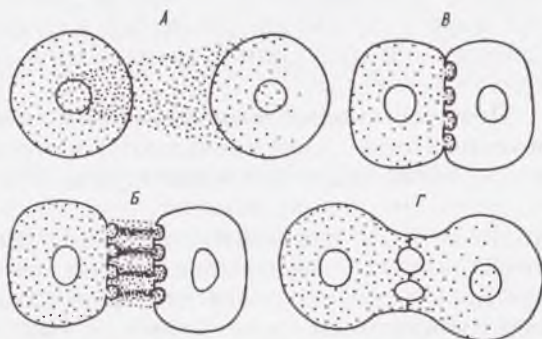




Рис. 7.12. С.Тойвонен. Финский эмбриолог. Автор двухградисентной теории первичной эмбриональной индукции. Классик экспериментальной эмбриологии

способность ко всем формообразовательным процессам, происходящим в ходе обычной индукции. Это наводит на мысль, что для осуществления индуцирующего эффекта важен не контакт индуктора и компетентной ткани, а транспорт индуцирующих агентов в компетентную ткань.

Прямые доказательства этого положения были получены еще в 60-е годы XX в. группой финского эмбриолога С.Тойвонена (рис. 7.12).

Суть проведенных ими эксперимен-

тов такова. Получили антисыворотку против индуктора и поместили ее флуоресцеином изотиоцианата так, чтобы она светилась в ультрафиолетовом свете. После этого готовили сэндвич из компетентной ткани (использовали эктодермы тритона) и ткани индуктора, который культивировали 1, 3, 6 и 12 часов. По прошествии этих промежутков времени изучали, во-первых, морфогенез, а во-вторых, с помощью меченой антисыворотки (антисывороткой обрабатывали срез с сэндвича так, что в месте расположения индуктора он связывался с антисывороткой и светился) распределение индуцирующего вещества в сэндвиче. Оказалось, что оно в течение 3 часов культивирования не проникает в эктодерму, и морфогенетические процессы отсутствуют. После 3-го часа культивирования индуцирующий агент начинает проникать в эктодерму. При этом обнаруживаются первые признаки морфогенеза. Через 6 часов вся эктодерма “заполнена” индуцирующим агентом — и морфогенез в полном разгаре. Налицо, таким образом, корреляция между разворачиванием во времени процесса эмбриональной индукции и транспортировкой индуцирующих веществ в эктодерму.

Пространственные закономерности взаимодействия индуктор-компетентная ткань. Они проявляются в строгом соответствии положения ткани индуктора и реагирующей системы друг относительно друга. Это вполне понятно, поскольку, как мы видели, ткань-индуктор (или, как называл ее Г.Шпеман, организатор) характеризуется процессом регионализации, т.е. дифференциацией индуктивных свойств своих частей и, следовательно, отчетливой пространственной организацией. К.Равен и Дж.Клоос показали,

что ткань организатора (каковым у амфибий является крыша первичной кишки) приобретает в ходе развития *кранио-каудальный* и *медио-латеральный градиенты*.

Первый проявляется в том, что прехордальная пластинка становится переднеголовным индуктором, а в каудальном направлении способность к индукции переднеголовных структур постепенно падает. Второй выражается в максимальной способности медиальной зоны к индукции нервной системы. В латеральном направлении эта способность падает и заменяется свойством индуцировать образование лишь некоторых производных нервного гребня.

Временные закономерности взаимодействия индуктор-компетентная ткань. Эти закономерности проявляются в величине времени контакта тканей организатора и реагирующей системы для достижения положительного эффекта индукции.

Они изучаются с помощью использования сэндвичей, из которых в любой момент времени можно легко удалить ткань индуктора. Оказалось, что минимальное необходимое для осуществления индукции время контакта двух взаимодействующих систем весьма различно для разных животных (и для разных видов индукции). Так, для получения эффекта архенцефалической индукции в эктодерме аксолотлей достаточно 5 минут контакта с тканью организатора, в то время как для тритона это время достигает 4 часов. Чтобы получить спино-каудальные и туловищно-мезодермальные структуры для зародышей аксолотля, необходимо 10-часовое взаимодействие этих систем, а для тритонов время контакта еще более продолжительное.

Г.Эйял-Гилади обнаружила, что в зависимости от времени контакта ткани организатора и реагирующей системы может измениться эффект индукции, так что индуцируемые структуры располагаются в следующий ряд: нормальный эпидермис — производные нервного гребня (пигментные клетки) — передне-головная индукция — каудальная структура.

Следовательно, для регионализации (или, как говорят, индивидуации) основное значение имеет не продолжительность контакта, а строгое *пространственно-временное соответствие* физиологически активного состояния индуктора и реагирующей системы. Нарушение этого соответствия ведет к нарушению эффекта индукции.

КАКОВА МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА ИНДУКТОРА?

Эктодерма ранней гаструлы амфибий используется как тест-система для выявления молекул-индукторов (морфогенов).

Биологическое тестирование различных веществ на их индуцирующий эффект и выявление активных в этом отношении моле-

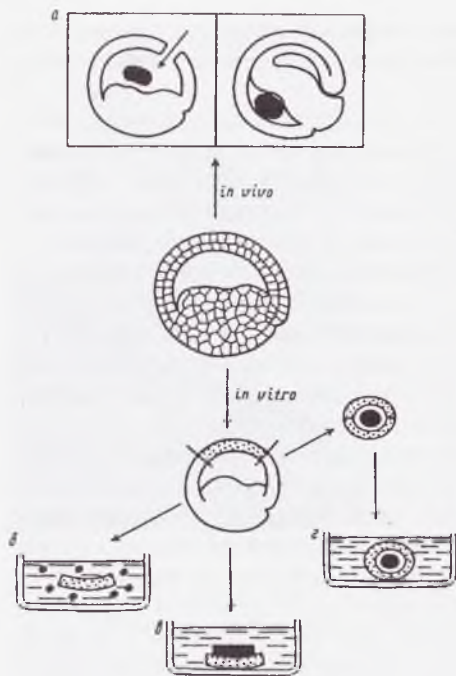


Рис. 7.13. Методы биотестирования индуцирующих агентов с использованием в качестве реагирующей ткани ЭРГ (эктодермы ранней гастрюлы) амфибий (по: Михайлов, 1988).

a — морфоген (индуцирующий агент) имплантируется в бластоцель зародыша и в ходе гастрюляции прижимается к вентральной эктодерме, вызывая индуцирующие эффекты; *b* — морфоген в виде раствора добавляется в культуральную среду с фрагментом ЭРГ; *v* — морфоген (им может быть и живая ткань-индуктор) приводится в прямой или транс-фильтровый контакт с фрагментом ЭРГ; *z* — морфоген между двумя фрагментами (метод "сэндвича")

кул (которые обычно называют морфогенами) осуществляется, как правило, с помощью эктодермы ранней гастрюлы (ЭРГ) в связи с тем, что именно в этой эмбриональной закладке разворачиваются события, обозначаемые как первичная эмбриональная индукция.

ЭРГ представляет собой пласт клеток анимальной половины ранних зародышей. Ее принято подразделять на анимальную, вентральную и дорсальную зоны. Первые две обычно развиваются в эпидермисе, значительная часть дорсальной зоны образует зачаток ЦНС, при этом ее наружный слой формирует выстилку полости нервной трубки, а в образовании самой ткани мозга участвуют клетки внутреннего слоя эктодермы гастрюлы. Области дорсальной эктодермы, прилежащие к верхней губе бластопора, дифференцируются в мезодермальном направлении.

Для тестирования биологической активности морфогенов используют два подхода: 1) имплантацию морфогенов *in vivo* и 2) комбинирование морфогенов с эктодермой *in vitro* (рис. 7.13).

Независимо от способа биотестирования индукторы (ткань, экстракт, фракция) приводятся в контакт с внутренней поверхностью ЭРГ амфибий. Каковы критерии оценки индуцирующего влияния на ЭРГ амфибий? Эффекты морфогенов оцениваются в основном на гистологическом уровне спустя 5—14 суток от момента воздействия. При этом в эктодерме обнаруживаются разные типы дифференцированных клеток, эпидермис, малодифференцированная ткань, эпителиальные пузыри, клетки мезенхимы, меланофоры (пигментные клетки), погибшие клетки.

К первому морфогенетическому взаимодействию в ходе развития амфибий относят открытое выдающимся голландским эмбриологом

II Ньюкоопом взаимодействие между анимальной и вегетативной частями зародыша на стадии морулы. К этому моменту (64-клеточный зародыш) клетки вегетативного полюса способны оказывать выраженное мезодермализующее влияние на анимальную половину зародыша. В результате этого воздействия в экваториальной зоне зародыша возникает зачаток мезодермы, а остальные клетки анимальной половины детерминируются в эктодермальном направлении. Разные зоны вегетативного полюса индуцируют в эктодерме мезодермальные территории (дорсальную, вентральную) с различной судьбой.

Источником последующих индукционных влияний является зачаток мезодермы. В процессе развития он разделяется на две зоны — дорсальную и вентральную. В период гаструляции-нейруляции различные участки мезодермы приходят в контакт с другими тканями зародыша и оказывают на них индуцирующее влияние. В результате к концу нейруляции в пределах каждого из трех зародышевых листков (эктодерма, мезодерма, энтодерма) имеются определенные компартменты, содержащие клетки-предшественники соответствующих линий дифференцировки.

Следовательно, к этому моменту развития развития дефинитивный план тела уже достигнут и стабилизирован. Отсюда можно сделать вывод, что морфогены, ответственные за "построение" данного плана, действуют главным образом на стадии бластулы-нейрулы.

ГЕНЫ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА ИНДУКТОРОВ

I. Мезодермальная индукция

Как уже отмечалось, первое индуцирующее событие в эмбриогенезе заключается в стимуляции презумптивной (будущей) энтодермой образования презумптивной мезодермы. Оказалось, что если эксплантировать клетки анимального и вегетативного полюса со стадии бластулы *Xenopus laevis*, то они сформируют только эктодерму и энтодерму, но эктодерма может быть индуцирована к формированию мезодермальной ткани в комбинации, содержащей вместе эктодермальные и энтодермальные клетки. Эти наблюдения позволили предположить, что вегетативная энтодерма продуцирует индуцирующий образование мезодермы сигнал в период стадии дробления. Энтодерма, кроме того, может определять дорсо-вентральный паттерн мезодермы: дорсальные вегетативные клетки индуцируют дорсальную мезодерму, в то время как латеральные и вентральные вегетативные клетки — вентролатеральную мезодерму (мезенхима, кровь и небольшое количество мышц). Трансплантированные дорсальные вегетативные бластомеры могут индуцировать эктопические дорсальные осевые струк-

туры, в связи с чем эти клетки принято называть энтодермальным организатором, или центром Ньюкоопа.

Какова молекулярная природа мезодермальных индукторов? Их идентификация была облегчена культивированием эмбриональных тканей амфибий в среде, содержащей предполагаемые индуцирующие факторы, а также инъекцией в бластомеры соответствующей мРНК. Таким способом было обнаружено несколько субстанций, индуцирующих образование мезодермы.

Vg1 — локализованный в вегетативной части зародыша индуцирующий мезодерму фактор, член суперсемейства transforming growth factor-beta (TGF-бета), локализован в вегетативной области ооцитов и эмбрионов *Xenopus* на стадии дробления. TGF-родственные молекулы формируют дисульфидсвязанные димеры, которые дробятся, высвобождая зрелые COOH-terminal-пептиды как сецернируемый биологически активный димер. Белок *Vg1* является уникальным по своей способности индуцировать дорсальную мезодерму и организовывать полную дорсальную ось. Продукция зрелого *Vg1* может быть достаточной для индукции дорсальной мезодермы.

Активин — один из самых известных белков, источников индукции дорсальной мезодермальной ткани. Это доказывается в экспериментах по обработке активином эксплантатов ткани анимального полюса эмбрионов. При высоких дозах активина формируются “эмбриониды”, обнаруживающие рудиментарные осевые и головные структуры. Несмотря на отсутствие синтезирующей активин материнской РНК, активиноподобная активность определяется в ооцитах и ранних эмбрионах: по-видимому, этот белок образуется еще в период оогенеза или передается в созревающий ооцит из окружающих фолликулярных клеток. Микроинъекция активиновой мРНК в эксплантаты клеток анимального полюса индуцирует образование дорсальной мезодермы. В отличие от экспрессии *Vg1*, инъекции активиновой мРНК организуют только часть дорсальной оси: отсутствуют нотохорда и головные структуры. Предполагается, что градиент распределения активина может детерминировать характерный мезодермальный паттерн. Однако по-видимому, не только одна концентрация индуктора устанавливает соответствующий паттерн. Есть основания считать, что реагирующая ткань также содержит определенную информацию о паттерне, в частности о том, что формировать нотохорду под влиянием активина могут эксплантаты клеток проспективного дорсального анимального полюса.

Рецепторы для семейства TGF-бета, принадлежащие к одному из двух классов — *tnf I* и *tnf II*, кодируют цитоплазматическую серин-треонин киназу и функционируют как гетеродимерный комплекс. У *Xenopus* мРНК для активинового рецептора типа

II экспрессируется по материнскому типу и распределяется равномерно. Экспрессия “урезанного” рецептора, у которого отсутствует домен цитоплазматической киназы, блокировала активность активина в анимальном полюсе. Микроинъекция этого доминантного тормозящего рецептора в ранний эмбрион полностью ингибировала формирование мезодермы, о чем свидетельствуют как гистологические, так и молекулярные критерии. Эти наблюдения подтверждают роль активина в эндогенной мезодермальной индукции.

Естественным ингибитором активина является активинсвязывающий белок *фоллистатин*. У *Xenopus* фоллистатин экспрессируется по материнскому типу и блокирует активинопосредованную индукцию на анимальном полюсе эксплантата, однако, в отличие от действия фоллистатина в ранних эмбрионах, не тормозит индукцию мезодермы Vg1. Функции активина были исследованы по множеству систем позвоночных. У цыпленка активиновая мРНК экспрессируется в гипобласте (индуцирующая ткань) в период формирования осевой мезодермы, а растворимый активин индуцирует осевую организацию в эпибласте (реагирующая система). У рыб известен доминантный активинингибирующий мутант, у которого блокируется формирование мезодермы и всей системы осевых органов. У мышей мутация гена, кодирующего активин бета-В не вызывает серьезных дефектов в развитии, но при этом функционирует второй активиновый ген, возможно, компенсирующий вызванный мутацией дефект.

Bone morphogenetic protein (BMP) — способен стимулировать образование кости и у эмбрионов *Xenopus* экспрессируется по материнскому типу. BMP4 индуцирует вентральную мезодермальную ткань, включая кровь и вентролатеральные молекулярные маркеры. Кроме того, экспрессия BMP4 в эксплантатах клеток анимального полюса модифицирует индукцию активином, вызывая супрессию формирования дорсальной мезодермы. У эмбрионов BMP4 тормозит формирование переднедорсальных структур, оказывая “вентрализирующий” эффект на мезодерму. Изоляция рецепторов BMP2 и BMP4 у позвоночных позволила исследовать функции BMP у эмбрионов. Так, экспрессия доминантных ингибиторных мутантов, сходных с таковыми по туловищному активиновому рецептору, блокировала индукцию мезодермы BMP4 в эксплантатах анимального полюса и опосредованную BMP4 вентрализацию эмбрионов. Под влиянием эмбриональной экспрессии индукция эндогенной мезодермы не блокировалась, но возникала “дорсализация” мезодермы, вызывая формирование эктопических дорсальных осевых структур. Отсюда следует, что действие BMP несущественно для индукции мезодермы, но включено в дорсо-вентральную организацию мезодермы и в формирование

вентральной мезодермы в особенности. Туловищный рецептор BMP не блокирует активность активина. Туловищный рецептор активина тормозит индукцию мезодермы BMP4. Это подтверждает, что путем блокирования эндогенного формирования мезодермы туловищный рецептор активина тормозит несколько различных TGF-бета-родственных факторов. В индукцию мезодермы включен дополнительный TGF-родственный ген — ген *nodal* мыши. Этот ген экспрессируется перед началом гастрюляции, что существенно для формирования мезодермы и осевых структур. Эмбрионы, гомозиготные по его нарушению, утрачивают способность к формированию организованной мезодермальной ткани, и вследствие этого не формируются первичная полоска (primitive streak) и осевая организация.

Fibroblast growth factor (FGF) — это первый очищенный фактор, демонстрировавший способность индуцировать образование мезодермы в эксплантатах клеток анимального полюса. Транскрипты и белок для нескольких форм FGF- и FGF-рецепторов *Xenopus* экспрессируются по материнскому типу. FGF-белок индуцирует вентро-латеральную мезодерму, включая мезенхиму и небольшое количество мышц, но неспособен индуцировать дорсальную мезодерму и дефинитивную вентральную ткань, кровь. Экспрессия доминантного ингибирующего FGF-рецептора тормозит индукцию мезодермы FGF в эксплантатах клеток анимального полюса. У таких эмбрионов наблюдаются дефекты в развитии туловища и задней части при нормальном состоянии передних отделов. Отсюда следует, что FGF-сигнал требуется для формирования туловищной и задней мезодермы, включая нотохорду и мышцы. В то же время активин-сигнал зависит от функционального FGF-сигнала. Следовательно, FGF-сигнал необходим для ответа туловищных клеток и клеток заднего отдела развивающегося эмбриона на индукцию активинном, однако формирование передне-дорсальных мезодермальных структур не зависит от FGF-сигнала. Неясно, стимулируются ли сигнальные пути активина и FGF внутри одной клетки или в различные периоды внутри общей клеточной популяции.

Wnt — это семейство состоит из генов, родственных гену сегментарной полярности *wingless Drosophila*. Индукция эктопических дорсальных осевых структур после сверхэкспрессии мышинового *wnt-1* у эмбрионов *Xenopus* стимулировала исследование генов *wnt Xenopus (Xwnt)*. Инъекция *Xwnt-1* или *Xwnt-8* мРНК индуцировала формирование полной дорсальной оси, включая головные структуры. Однако мРНК *Xwnt-8* проявляла слабую или не проявляла совсем мезодерминдуцирующую активность в эксплантатах клеток анимального полюса, показывая, что формирование эктопической оси является результатом модификации дорсо-вентраль-

ного паттерна предсуществующей мезодермы. Дополнительные исследования продемонстрировали, что ген *wnt* может действовать как модификатор компетенции, изменяя ответ клетки на воздействие индуцирующего агента и усиливая формирование дорсальных мезодермальных структур. В то же время показано, что активность этого гена определяется на стадии гастролы в вентральной, а не в дорсальной мезодерме. В связи с этим предполагается, что его продукт способствует трансформации дорсальной ткани в вентральную.

Экспрессия мышинного гена *wnt-3A* ограничивается примитивной полоской, презумптивной осевой мезодермой. Нарушение его функционирования обуславливает отсутствие организованных мезодермальных структур позади передних конечностей.

Noggin — этот ген кодирует сецернируемый полипептид, восстанавливающий способность к формированию дорсальной оси у облученных ультрафиолетом эмбрионов. Он экспрессируется одинаково в ооцитах и дробящихся эмбрионах *Xenopus*. Его транскрипты локализуются в дорсальной губе бластопора (организатор Шпемана) на стадии гастролы и позднее — в нотохорде. Ноггин не индуцирует мезодерму в эксплантатах клеток анимального полюса, но может дорсализовать эксплантаты вентральной маргинальной зоны гастролы. Следовательно, ноггин может функционировать как дорсализующий модификатор мезодермального паттерна.

II. Нейральная индукция

Мезодермальная индукция и мезодермальный паттерн связаны непосредственно со сложными клеточными движениями в ходе гастрюляции. Осевые мезодермальные структуры формируются из дорсальной маргинальной зоны, при этом изменения тканевого взаиморасположения в результате гастрюляционных движений обеспечивают дополнительные индуктивные события, включая феномен нейральной индукции. Значительный вклад в изучение нейральной индукции внесли Л.Саксен и А.Т.Михайлов (рис. 7.14).

То, что центральная нервная система позвоночных возникает в процессе гастрюляции в результате взаимодействия дорсальной эктодермы и подстилающей ее дорсальной мезодермы, было впервые продемонстрировано Г.Шпеманом и О.Мангольд в экспериментах по трансплантации ткани организатора. Предполагалось, что при этом функционирует два рода сигналов. Впячивающаяся в ходе гастрюляции хордомезодерма (презумптивная нотохорда) посылает вертикальный сигнал вышележащей эктодерме, и мезодермальные организующие сигналы распространяются горизонтально внутри эктодермы. Мангольд показала, что передне-задний паттерн (*A-P*) индуцированной нервной ткани отражает *A-P*-характер индуцирующей мезодермы.



Рис. 7.14. Лаури Саксен, финский эмбриолог (слева) и Александр Трофимович Михайлов, российский эмбриолог.

Л. Саксен внес решающий вклад в разработку двухградиентной теории первичной эмбриональной индукции. А. Т. Михайлов — ведущий российский специалист в области экспериментальной эмбриологии, автор ряда оригинальных исследований по проблемам эмбриональной индукции. В настоящее время — профессор Университета в Ла-Корунье (Испания)

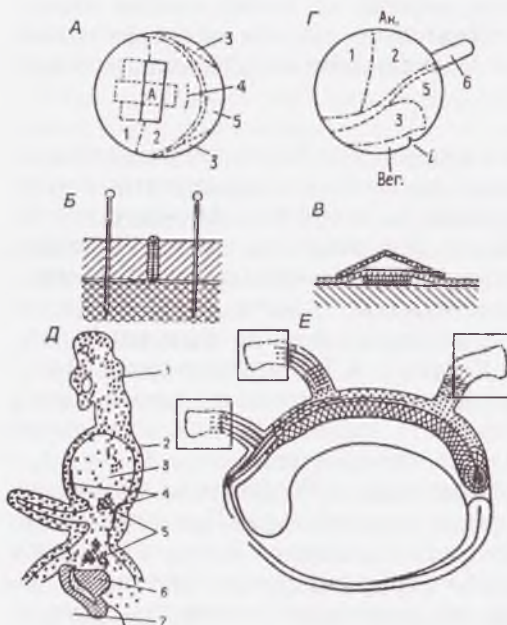


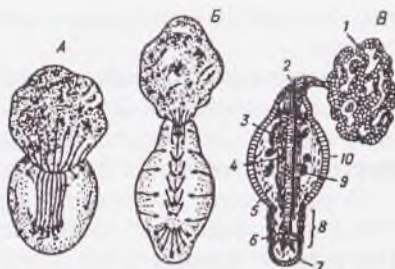
Рис. 7.15. Метод эктодермальной складки Ньюкоопа (по: Newkooop et al., 1952).

А — из презумптивного эпидермиса берут полоску эктодермы. Б и В — показано как ее складывают и помещают между двумя кусочками агары. Г — полоску имплантируют в различные участки гаструлы: 1 — презумптивная эктодерма; 2 — презумптивная нервная пластинка; 3 — презумптивная мезодерма; 4 — бластопор; 5 — презумптивная хорда; 6 — имплантат. Д — дифференцировка эктодермальной складки, имплантированной в заднеголовный участок зародыша на стадии гаструлы: 1 — атипичный эпидермис; 2 — эпидермис; 3 — соединительная ткань; 4 — хроматофоры; 5 — ганглии; 6 — нервная ткань; 7 — задний мозг (хозяина). Е — сводка результатов, полученных методом эктодермальной складки и рассматриваемых с точки зрения гипотезы активации-трансформации Ньюкоопа. Складки разделены на три участка: 1) дистальный, остающийся недифференцированным (выделены квадратами); 2) промежуточный участок с эктомезенхимными индукциями (слегка заштрихован) и 3) проксимальный, об-

разующий нейральные структуры (сплошные линии). Первичное активирующее действие вызывает дифференцировку переднеголовных структур, в более проксимальном участке за ним следует трансформирующее действие мезодермального субстрата, приводящее к дифференцировке заднеголовных структур (точки). Таким образом, распространение индуцирующего влияния имеет не только вертикальный, но и горизонтальный вектор

Рис. 7.16. Экзогастрюляция зародыша амфибий, вызванная гипертоническим солевым раствором (по: Гольцфретер, 1933).

После обработки таким раствором материал презумптивной хордомезодермы зародыша вместо того, чтобы впячиваться внутрь в ходе гаструляции, выворачивается наружу, так что презумптивная эктодерма остается в "одиночестве", без подстилающего ее индуктора. А, Б, В — последовательные этапы процесса. 1 — масса эктодермы; 2-10 — различные развивающиеся органы



В опытах П. Ньюкоопа была отчетливо показана роль горизонтального уровня в передаче сигналов и осуществлении эмбриональной индукции (рис. 7.15). Роль вертикальных сигналов в нейральной индукции была подтверждена в экспериментах по экзогастрюляции (рис. 7.16). Дифференцировка мезодермы в экзогастрюле происходит, однако нейральные структуры не образуются, демонстрируя, что в таких условиях индуцирующие сигналы не доходят до эктодермы. Однако недавно было показано, что молекулярные нейральные маркеры экспрессируются в эктодерме экзогастрюлы. По-видимому, молекулярно-генетические системы, обуславливающие специфическую нейральную дифференцировку и специфические формообразовательные процессы, разделены и функционируют автономно, независимо друг от друга.

В то же время следует отметить, что в презумптивной эктодерме имеется своеобразная региональная преформированность к специфическому ответу на индуктивный стимул. Она выявляется с помощью молекулярных маркеров: так, эпидермальный маркер Epi1 экспрессируется в презумптивной не-нейральной эктодерме, но не в будущей нервной пластинке. Это обстоятельство обуславливает дифференциальный ответ дорсальной и вентральной эктодермы на нейральную индукцию. Рекомбинанты хордомезодермы и дорсальной эктодермы характеризуются выраженной экспрессией нейральных маркеров, в то время как вентральная эктодерма экспрессирует эти маркеры на очень низком уровне в ответ на те же самые сигналы. Однако вентральная эктодерма способна продуцировать полный спектр нейральных производных.

Диссоциация презумптивной эктодермы на клетки с их последующим культивированием обеспечивает дополнительный импульс к нейральной дифференцировке. В отсутствие какой-либо обработки интактные эксплантаты клеток анимального полюса дифференцируются в атипичский эпидермис, но если такие эксплантаты подвергали диссоциации с последующим культивированием в виде отдельных клеток в течение нескольких часов, то в реагрегатах наблюдались нейральная дифференцировка и экспрессия нейральных маркеров. Этот результат показывает, что клеточные взаимодействия тормозят нейральную дифференцировку, а

диссоциация на отдельные клетки способствует снятию этой репрессии.

Молекулярная природа нейроиндуцирующих факторов была выяснена в основном благодаря исследованиям, проведенным на цыпленке и на *Xenopus*. Был выявлен целый ряд секретируемых факторов, способных индуцировать паттерн нервной ткани.

Noggin — это, пожалуй, основной нейроиндуцирующий агент. Был изолирован благодаря способности дорсализовать мезодерму. Транскрипты ноггинового гена экспрессируются в ткани организатора на стадии гаструлы и в нотохорде на более поздних стадиях развития, вызывая в обоих случаях нейроиндуцирующий эффект. Добавление белка ноггина к эктодерме бластулы, компетентной к образованию мезодермы и нейральной индукции, стимулирует появление нейральных маркеров в отсутствие определимой мезодермы, демонстрируя прямую индукцию нервной ткани. Обработка ноггином индуцирует появление общих и передних нейральных маркеров, но в эксплантатах не выявляются маркеры заднего и спинного мозга. Предполагается, что ноггин является начальным передним индуктором, однако в индуцированной к нейральному развитию ткани экспрессируется также фоллистатин. Он непосредственно индуцирует передние нейральные структуры, являясь, возможно, независимым индуктором переднеголовных структур (рис. 7.17).

Были, в частности, проведены эксперименты по прямой индукции нервной ткани ноггином, который добавляли в среду, где культивировали клетки анимального полюса бластулы *Xenopus*. При этом наблюдали селективную экспрессию нейральных и мезодермальных специфических транскриптов. В качестве маркеров служили: *NCAM* — молекула клеточной адгезии, экспрессируемая в нервной системе, изоформа бета-тубулина, свойственная заднему и спинному мозгу, экспрессирующийся в нервной ткани ген промежуточных филаментов *XIF3* и мышечный актин.

Notch — ген открыт и впервые выделен у дрозофилы. Он кодирует трансмембранный белок, участвующий в определении судьбы клеток нейроэктодермы, выборе

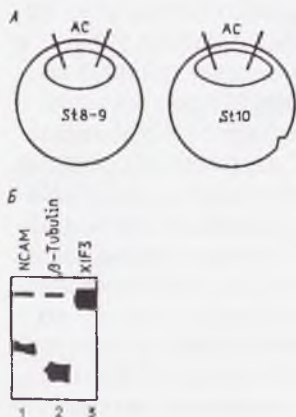


Рис. 7.17. Действие ноггина на развитие анимальной эктодермальной шапочки (по: *Lamb et al., 1993*).

А — отмеченная на схеме зона раннего эмбриона *Xenopus* исследовалась и эксплантировалась в рингеровском растворе, к которому добавлялся ноггин. Развитие эксплантата продолжалось до стадии, примерно соответствующей стадии 20 эмбрионального развития, затем из эксплантата выделяли РНК, которую гибридизовали с ДНК-зондами для *NCAM* (нейроспецифический агрегационный поверхностный белок), бета-тубулина, *XIF3* (белок филаментов). Б — результаты этой гибридизации, демонстрирующие индукцию ноггином синтеза нейроспецифических белков

ими нейрального или эпидермального пути развития. Плейотропный эффект этого гена (например, при развитии крыльев) указывает на его участие в детерминации судьбы и многих других клеток. У *Xenopus* обнаружен гомолог гена *Notch* (*Hotch*), который экспрессируется, как и у дрозофилы, по материнскому типу (т.е. продукт его появляется в яйце еще до оплодотворения, в ходе оогенеза). Его продукт локализуется в дорсальной эктодермы нейрулы, включая и презумптивную нервную пластинку, и не-нейральную эктодерму. Активация мутации *Hotch*, вызывающей утрату большей части экстрацеллюлярной области, вызывала нарушения развития, сходные с выявленными у дрозофилы, — гипертрофию нервной трубки и отсутствие передних эктодермальных структур. Этот эффект не является результатом прямой нейральной индукции, поскольку экспрессия гена в компетентной эктодерме не сопровождается дифференцировкой нервной ткани. Однако мутация *Hotch* вызывает усиленный ответ эктодермального эксплантата на действие нейрального индуктора, что может быть результатом увеличения периода компетенции в эктодермальной ткани и нарушения ее способности дифференцироваться в эпидермальном направлении. Кроме того, эти результаты показывают, что *ген Hotch в презумптивной нервной пластинке действует как фактор, регулирующий пропорцию некоммитированных клеток, способных отвечать на воздействие нейрального индуктора.*

Wnt — члены этого семейства генов обуславливают развитие ограниченного разнообразия фенотипических паттернов в развивающейся центральной нервной системе. У нормальных мышей ген *wnt-1* экспрессируется в области среднего и заднего мозга. В случае его мутации наблюдается утрата среднего мозга и мозжечковых структур, в то время как остальные отделы ЦНС, как и другие эмбриональные образования, не страдают. Гиперэкспрессия гена *wnt-1* в вентральной зоне нервной трубки вызывает существенные расстройства в морфогенезе нервной трубки. Эти изменения обусловлены увеличением клеточной пролиферации в ее вентральной области, в то время как при дальнейшей экспрессии вентральных маркеров последующих нарушений развития дорсовентрального паттерна не обнаружено. *Следовательно, ген wnt-1 функционирует как регулятор клеточной пролиферации*

Dorsalin — член семейства TGF-beta. Соответствующий ген выделен из спинного мозга цыпленка. Транскрипты этого гена впервые обнаруживаются при замыкании нервной пластинки в трубку. Экспрессия гена ограничивается нервной трубкой и нервными валиками. Трансплантация нотохорды в дорсальную область нервной трубки тормозит экспрессию гена *dorsalin 1*, что совпадает с эктопической индукцией вентральных структур, включая мотонейроны вентральных рогов спинного мозга. Очевидно, ограничение экспрессии этого гена проистекает из тормозящих вентральных сигналов. В эксплантатах нервной пластинки *dorsalin 1* стиму-

лирует дифференцировку определенных клеток, производных нервного гребня (дорсальная ткань) и тормозит дифференцировку мотонейронов (вентро-латеральная ткань).

*Основываясь на изложенных результатах, можно прийти к заключению, что клеточная дифференцировка вдоль дорсо-вентральной оси контролируется соотношением локальной концентрации двух диффундирующих сигналов — один из них продуцируется дорсальной нервной трубкой (*dorsalin1*), второй — вентрально локализованной нотохордой.*

При этом первоначально вся нервная трубка компетентна к экспрессии гена *dorsalin1*, но эта способность впоследствии ограничивается дорсальной третью нервной трубки вследствие диффундирующего сигнала из нотохорды, который одновременно индуцирует дифференцировку мотонейронов.

Белок *dorsalin1* стимулирует дифференцировку клеток нервного гребня в дорсальной части нервной трубки, его диффузия в вентральном направлении подавляет вентральные сигналы, устанавливая таким образом верхнюю границу дифференцировки мотонейронов.

Следовательно, и в этом случае морфогенетические процессы, как и клеточная дифференцировка, осуществляются в результате взаимодействия стимулирующих и тормозящих сигналов.

Какой ген отвечает за продукцию вентрального сигнала, производного нотохорды? В настоящее время биологи убеждены, что у позвоночных наилучший кандидат на эту роль — гомолог гена *hedgehog*.

Hedgehog — выполняет у дрозофилы функции гена сегментарной полярности и синтезирует секретлируемый фактор, контролирующий паттерн распределения клеток в ходе сегментации и развития имагинальных дисков. Его гомолог у позвоночных был изолирован и изучен. Оказалось, что его экспрессия происходит в нескольких тканях, оказывая регулирующее влияние на формирование клеточного паттерна в нотохорде, основании нервной трубки (вентральная область) и почках задних конечностей. Экспрессии гена *hedgehog*, инъецированного зародышам лягушек или знаменитой рыбке *Zebrafish*, а также у трансгенных мышей вызывает эктопическую экспрессию маркеров вентральной части нервной трубки и формирование ее основания в дорсальной и промежуточной частях спинного мозга.

*Следовательно, подобно мезодермальной индукции, нейральная индукция включает индукторы нервной ткани (ноггин), модификаторы нейрального паттерна (белки *notch*, *dorsalin1*, *hedgehog*) и ингибиторы (BMP4).*

ГЕНЫ И НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНДУЦИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ

Гены, контролирующие синтез индукторов, последовательно экспрессируются в ходе развития, после того как прерывистая эктодерма прореагирует на активин А. Именно этот белок удовлетворяет всем критериям, предъявляемым к эндогенным мезодермальным и энтодермальным индукторам.

Японский эмбриолог М.Асашима обнаружил, что синтез активиновой мРНК не определяется до стадии морулы, однако в неоплодотворенном яйце *Xenopus* уже существуют три изоформы активина — А, АВ, В (функционирование с опережением!). Они связаны с вителлогенином в желточных пластинках. Кроме того, фолликулярные клетки, окружающие ооцит, содержат активиновую мРНК, а также вителлогениновый рецептор. Эти факты подтверждают, что активин синтезируется в фолликулярных клетках и других материнских тканях (роль материнского генотипа в созревании ооцита!) и транспортируется в созревающий ооцит в комплексе с вителлогенином (рис. 7.18).

Как оказалось, можно индуцировать образование мезодермы из изолированной эктодермы *Xenopus* с помощью двух типов факторов роста, членов семейств FGF и TGF-бета. При этом члены семейства FGF индуцируют только вентральную мезодерму, ак-

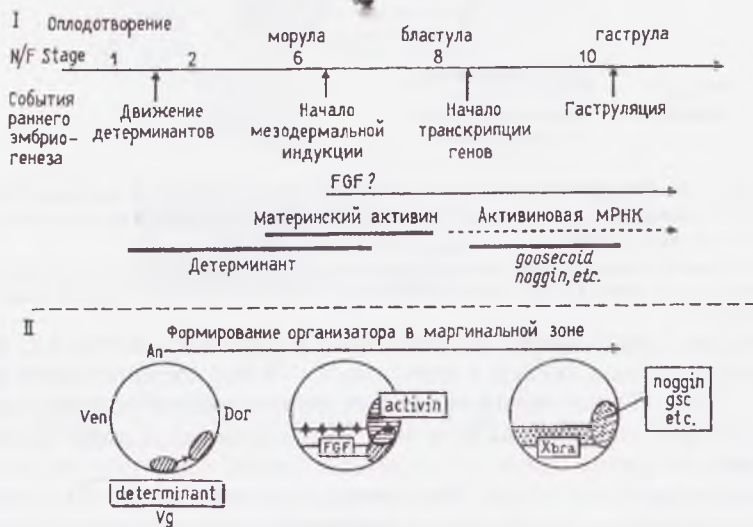


Рис. 7.18. Модель процесса формирования организатора (индуктора) (по: Asashima, 1994).

I — периоды раннего развития у *Xenopus*. II — этапы формирования организатора



Рис. 7.19. Модель накопления активина в ходе оогенеза, эмбриональной индукции и раннего развития *Xenopus* (по Asashima, 1998)

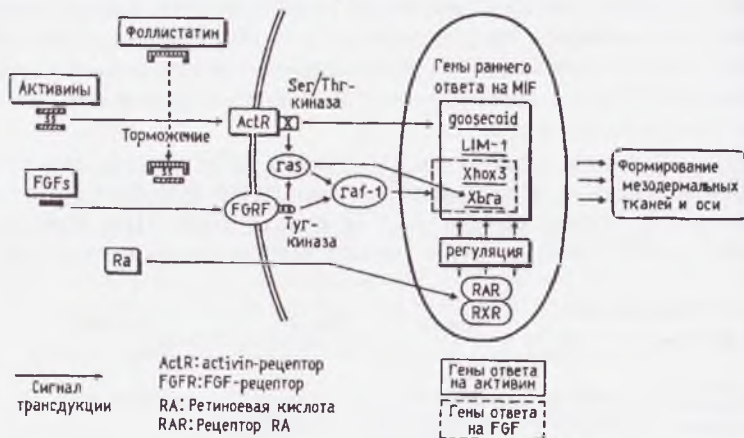


Рис. 7.20. Диаграмма регуляции мезодерма-индуцирующего фактора (MIF) и сигнала трансдукции. Активины связываются с фоллистатином и инактивируются (по: Asashima, 1998).

Этот фактор активирует собственные рецепторы с переносом соответствующего сигнала в цитоплазму и ядро, чтобы вызвать ответ ранних генов и ретиноевой кислоты, которые модулируют сигналы MIF

тивин же (член семейства TGF-бета) индуцирует почти все типы мезодермальных тканей в зависимости от его концентрации (рис. 7.19—7.21). Фоллистагин оказывает регулирующее воздействие на индуцирующие свойства активина. Множественный плейотропный эффект активина связан с его комбинацией с другими биоактивными макромолекулами. Например, почечные канальцы с высокой частотой индуцируются в изолированной эктодерме *Xenopus* активинем A в сочетании с ретиноевой кислотой (RA). В подобных эксплантатах экспрессируются гены *Xlim-1* и *Xlsaax-1*, активность которых зарегистрирована в почечных канальцах нормальных эм-



Рис. 7.21. Контроль *in vitro* клеточной дифференцировки и органогенеза активином и другими факторами (по: Asashima, 1998).

Активин индуцирует различные производные мезодермы в зависимости от их концентрации. Индуцированная мезодерма прогрессивно изменяется из вентрального в дорсальный тип по мере увеличения концентрации

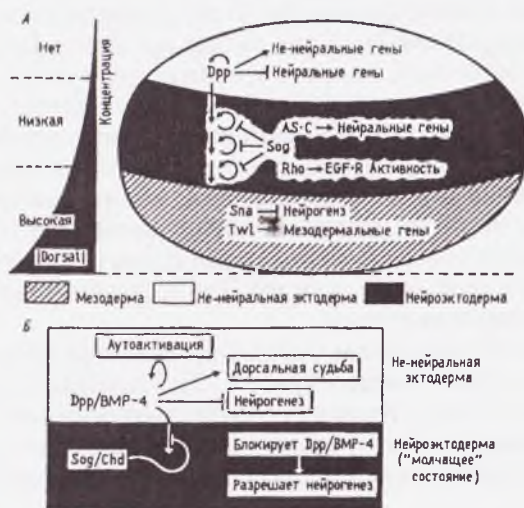


Рис. 7.22. Генная регуляция дифференцировки у дрозофилы, позвоночных и беспозвоночных (по: Bier, 1997).

А — материнский градиент распределения белка Dorsal подразделяет дорсо-вентральную ось эмбриона дрозофилы на три основных тканевых типа. Б — нейральное ингибирование и активация у позвоночных и беспозвоночных. Обяснение в тексте

брионов с помощью гибридизации *in situ* на срезах. При совместном влиянии активина и RA индуцируется также синтез альфа1-субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы.

Таким образом, активин действует как первый молекулярный сигнал в цепи индуктивных событий в ходе эмбриогенеза амфибий.

Для результата индуцирующих влияний активина ключевое значение имеет *время* взаимодействия индуцирующего агента и компетентной ткани (что существенно в ходе эволюционных преобразований!). Так, если презумптивную эктодерму обрабатывать активином в течение короткого промежутка времени (0—6 часов), индуцируются туловищные, дейтеренцефалические и спино-каудальные структуры, в то время как длительное культивирование такой эктодермы с активином (12—24 часа) ведет к формированию головных (архенцефалических структур).

Согласно исследованиям Е. Биера (E. Bier) из Калифорнийского университета, молекулярно-генетические механизмы первичной эмбриональной индукции универсальны и осуществляются как у позвоночных, так и беспозвоночных животных посредством продуктов сходных (если не идентичных) генетических систем. Так, у дрозофилы низкая концентрация белка Dorsal в спинной части развивающегося эмбриона сопровождается транскрипционной активностью гена *decapentaplegic (dpp)*, а также генов *zerknüllt* и *tolloid*. Высокая концентрация Dorsal репрессирует эти гены в вентральной и латеральной областях эмбриона. Белок Dpp инактивирует нейральные гены и, напротив, стимулирует гены, ответственные за развитие клеток в не-нейральном направлении. В зоне нейроэктодермы продукт гена *sog* (short gastrulation) ингибирует белок Dpp, в результате чего снимается транскрипционная блокада с нейральных генов и гена *rhomboid (rho)*, детерминирующих дифференцировку нервных клеток. В вентральной зоне (презумптивная мезодерма) активность нейральных генов подавляется белком Sna (продуктом гена *snail*), а белок Twi (продукт гена *twist*) активирует мезодермальные гены.

У позвоночных аналогом белка Dpp является белок BMP-4, а аналогом белка Sog — хордин (рис. 7.22). Механизмы их действия сходны, так что можно говорить о существовании некоего эволюционно консервативного и универсального способа регуляции ключевых морфогенетических процессов в ходе индивидуального развития.

Следует, однако, отметить, что для детального выяснения молекулярно-генетических механизмов эмбриональной индукции необходимы дополнительные исследования.

Рекомендуемая литература

1. Гилберт С. Биология развития: В 3 т. М.: Мир. 1993—1995.
2. Корочкин Л.И., Михайлов А.Т. Введение в нейрогенетику. М.: Наука, 2000.
3. Михайлов А.Т. Эмбриональные индукторы. М.: Наука, 1988.

4. *Саксен Л., Тойвонен С.* Первичная эмбриональная индукция. М.: ИЛ, 1963.
5. *Тидеман Х., Грунц Х., Кнехель В.* Индуцирующие факторы и молекулярные механизмы дифференцировки у ранних зародышей амфибий//Онтогенез. 1993. Т. 24. С. 5--27.

? Вопросы для повторения

1. Что такое эмбриональная индукция? Назовите ее виды.
2. Что такое индуктор и компетентная ткань?
3. Что такое компетенция?
4. Каковы основные закономерности созревания индуктора и компетентной ткани?
5. Что такое эффект минимальной массы?
6. Как взаимодействуют индуктор и компетентная ткань?
7. Как гены участвуют в регуляции мезодермальной индукции?
8. Как гены участвуют в регуляции нейральной индукции?
9. Что известно о нейральной и мезодермальной индукции?
10. Как гены влияют на процессы эмбриональной индукции?

НЕКОТОРЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕТЕРМИНАЦИИ И ТРАНСДЕТЕРМИНАЦИИ

ЧТО ТАКОЕ ПОЗИЦИОННАЯ ИНФОРМАЦИЯ, ДЕТЕРМИНАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА?

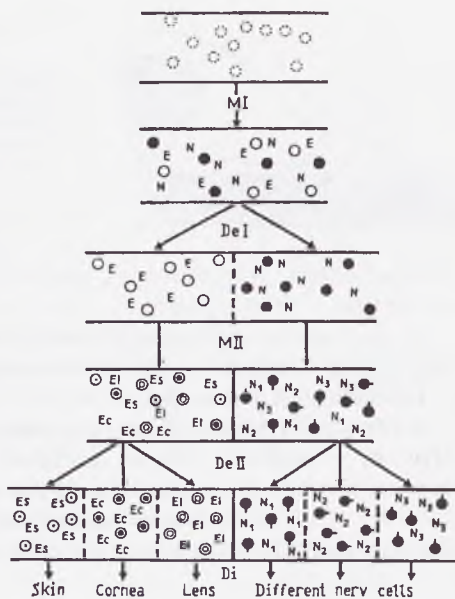
Клетки, занявшие определенное положение в системе развивающегося зародыша, получают некую, как принято говорить, *позиционную информацию*. Как выяснилось в последнее время, эта позиционная информация суть не что иное, как соотношение различных белковых продуктов, неравномерно распределенных вдоль развивающегося зародыша и как бы “обозначающих судьбу” соответствующих его частей. Специфические градиенты распределения этих продуктов активируют в разных клетках различные наборы генов, так что эти клетки под влиянием поступающих в них сигналов приступают к “выполнению программы” *детерминации и дифференцировки*.

Детерминация — центральное событие в ходе индивидуального развития. Классик экспериментальной эмбриологии Г.Шпеман, касаясь детерминации, писал: “Мы обычно следуем определению, данному много лет тому назад К.Гайдером, согласно которому детерминация есть причинная обусловленность будущей судьбы частей зародыша, как возникающая, так и уже возникшая”. Д.П.Филатов (рис. 8.1), один из видных отечественных эмбриологов, определял детерминацию как процесс, как “такое воздействие одних частей развивающегося организма на другие его части, благодаря которому последние при наличии определенных условий



Рис. 8.1. Дмитрий Петрович Филатов. Один из основоположников отечественной экспериментальной эмбриологии. Создал Школу российских эмбриологов

Рис. 8.2. Схема последовательных процессов созревания, детерминации и дифференцировки, происходящих в эктодерме зародышей амфибий (по: Hadorn, 1965)



проходят часть пути своего развития”. Точнее охарактеризовал детерминацию швейцарский генетик и эмбриолог Э.Хадорн. По его мнению, детерминация — это “процесс, в результате которого компетентная клеточная система выбирает один из многих возможных путей развития”. Иными словами, детерминация есть *последовательное сужение перспективных потенций клетки*.

На рис. 8.2 схематически отражена последовательность событий в ходе этого сужения. На первом этапе, обозначенном как созревание (MI), устанавливается *компетенция*, способность реагировать на воздействие индуктора формированием эпидермиса (E) или нервной системы (N). Детерминация I (DeI) ведет к разделению E- и N-систем. Затем следует созревание II (MII), определяющее компетенцию к образованию более узко специализированных компонентов и т.д.

КАК ОБНАРУЖИТЬ СОСТОЯНИЕ ДЕТЕРМИНАЦИИ?

Состояние детерминации принято регистрировать с помощью разработанных еще Г.Шпеманом экспериментальных критериев. Таких критериев два: 1) поведение исследуемых клеток в условиях трансплантации и 2) поведение исследуемых клеток в условиях культивирования *in vitro*.

В первом случае клетки, например будущей нейроэктодермы, уровень детерминации которых оценивается, трансплантируют в область другого зародыша, им чуждую, например в область будущей мышечной ткани. Если трансплантат развивается в мышечную ткань, т.е. следует судьбе соседних клеток хозяина, то составляющие его клетки не детерминированы. Если же трансплантат развивается независимо от окружающих тканей реципиента и дает нейроэктодермальные, а не мышечные производные, — значит он детерминирован к развитию в соответствующем направлении

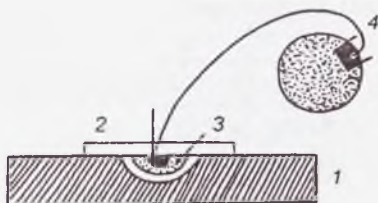


Рис. 8.3. Метод висячей капли.

1 — Предметное стекло с углублением в середине; 2 — покровное стекло с прикрепленной к нему висячей каплей (3) физиологического раствора для культивирования эмбриональной ткани; 4 — кусочек эмбриональной ткани, изолированный из той или иной области эмбриона

и воздействия окружающей тканей не могут внести какие-либо изменения в этот процесс.

Во втором случае подлежащие “оценке” кусочки зародыша изолируют и помещают в культуральную среду, например по методу так называемой висячей капли (рис. 8.3). Если клетки дезагрегируют и образуют недифференцированные ассоциаты, со временем погибая, — значит, они не детерминированы. Если клетки дифференцируются в соответствии со своим предназначением (например, кусочек будущих мышечных клеток развивается в мышечную ткань), то процесс детерминации имеет место.

КАК ИЗУЧАТЬ РЕГИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДЕТЕРМИНАЦИИ?

Региональные особенности процесса детерминации лучше всего рассмотреть на примере развития имагинальных дисков дрозофилы.

Геном дрозофилы, как и других насекомых, содержит две программы развития — личиночную и имагинальную. В соответствии с этими программами развивается два вида органов — личиночные и имагинальные. По своей биохимической характеристике они отличаются друг от друга. Например, личиночные и имагинальные слюнные железы имеют разный спектр изоферментов эстеразы. При этом спектр изоферментов имагинальной слюнной железы (органа взрослой мухи) соответствует таковому имагинального диска и, следовательно, является следствием реализации имагинальной программы развития, которая в своем осуществлении не зависит от личиночной, поскольку, во-первых, известны мутации, когда имагинальные органы и даже их закладки — имагинальные диски — вообще не формируются, тем не менее программа личиночного развития реализуется нормально, во-вторых, с помощью кормления личинок дрозофилы бромдезоксисуридином можно “разделить” личиночную и имагинальную программы, нарушив процессы транскрипции у личинок. На реализации личиночной программы это не отражалось, поскольку развитие личинок в основном зависит от матричной РНК, уже запасенной в эмбриогенезе. Однако как только на стадии куколки приходит

Рис. 8.4. Развитие и пересадка имагинальных дисков у дрозофилы.

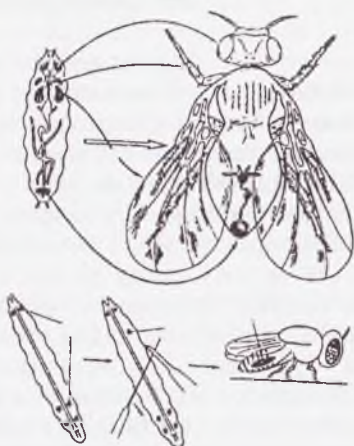
У личинки-донора вырезают имагинальные диски и пересаживают личинкам-реципиентам. В ходе метаморфоза из трансплантата развивается соответствующий взрослый орган

время реализации имагинальной программы, развитие останавливается и куколки погибают. Это, очевидно, связано с тем, что для реализации имагинальной программы необходима новая волна транскрипционной активности генов (подавленная в данном случае ингибитором — бромдеоксиуридином) в клетках имагинальных дисков (ИД), где и должно происходить осуществление этой программы.

У личинки дрозофилы имеется несколько имагинальных дисков, дающих те или иные части тела имаго — взрослой мухи (рис.8.4).

Изучение дифференцировки ИД позволило получить ответ на ряд принципиальных вопросов.

- Когда клетки, в которых реализуется личиночная программа, отделяются от имагинальных? Оказывается, еще на стадии бластодермы.
- Какие факторы контролируют это “отделение”? Очевидно, так называемая *позиционная информация* — эффект положения клеток в определенном пространственном поле зародыша, характеризующимся специфичностью распределения продуктов, синтезированных под контролем регулирующих сегментацию генов. При облучении ультрафиолетом зон, развивающихся в ИД, эти последние не формируются.
- Сколько первичных “примитивных” клеток содержит эмбриональная закладка ИД? Оказалось, что первоначально ИД формируется как выпячивание гиподермы, содержащее 10—40 клеток. Эта закладка претерпевает в последующем своем развитии следующие изменения:
 - 1) размножение, в результате чего количество клеток достигает нескольких тысяч;
 - 2) активное движение и пассивные перемещения;
 - 3) специфическая ориентация митотического веретена;
 - 4) образование локальных различий по величине и форме клеток;
 - 5) локальная гибель клеток.



ЧТО ТАКОЕ КОМПАРТМЕНТ?

Все ли клетки сформировавшегося ИД равноценны? Чтобы ответить на этот вопрос, клетки нужно пометить — *маркировать*. Одним из методов такого маркирования является *индукция соматических рекомбинаций*. В 1936 г. XX в. немецкий генетик К.Штерн обнаружил, что у дрозофилы наряду с мейотическими рекомбинациями происходят митотические рекомбинации. В 1957 г. Г.Беккер показал, что рентгеновское облучение несколько повышает частоту таких рекомбинаций, и в ходе митотического “расщепления” гетерозигот образуются двойные пятна: глаз будет мозаичным по цвету. При этом размер клонов клеток “разного цвета” будет разным в зависимости от времени облучения. Чем раньше проводится облучение, тем меньшее количество клеток-мишеней реагирует и тем большее количество мух приходится анализировать, чтобы увидеть эффект, зато индуцированное пятно займет большую часть органа, так как чем раньше помечена клетка, тем многочисленнее ее потомство. Если же облучение проводить в позднем периоде развития, то можно найти множество относительно маленьких клонов измененных клеток. Следует отметить, что такое маркирование — процесс статистический. В связи с этим необходимо проследить судьбу большого количества клеток у полученного мозаика, чтобы определить действительный ход морфогенетического процесса. По расположению “маркированных” клеток можно воспроизвести картину перемещения клеток в ходе развития ИД:

- если меченые участки расположены рядом, — это означает, что дочерние клетки в ходе морфогенеза оставались вместе;
- если меченый участок вытянут в длину — из этого следует, что он возник в результате деления клеток, митотические веретена которых ориентированы в одном направлении;
- если клетки “пометить” на поздней стадии развития ИД, то оказывается, что “метка” концентрируется в зонах, которые отделены друг от друга четкими пограничными линиями и сохраняются в формирующемся имаго — эти зоны назвали *компартаментами*.

Каждый компартимент представляет собой потомство нескольких детерминированных равноценных клеток — клеток-основательниц. Такая группа клеток называется *поликлоном*. Все члены поликлона всегда собираются в одном компарimente. Границы компаримента строго сохраняются.

Компартимент содержит около 10^3 — 10^4 клеток. Некоторые мутации позволяют обнаружить границы между компариментами, как, например, в случае компариментации мезоторакальных структур кутикулы. Так, некоторые мутации трансформируют задние струк-

туры крыльев и других органов в соответствующие передние. При этом существенное значение имеет топология клеточных популяций для их организации в компартмент. Будет ли клетка развиваться в волосок или в эпителиальном направлении — определится позднее, но будет зависеть от того, к какому компартменту она принадлежит. Нередко границы компартмента можно определить с помощью обычных гистохимических окрасок. Оказалось, например, что некоторым компартментам свойственна высокая активность альдегидоксидазы, и при окраске на этот фермент их границы выявляются очень четко.

Следовательно, региональная детерминация характеризуется образованием компартментов, и каждый ИД представляет собой их совокупность.

Что приводит к образованию компартментов, каковы механизмы региональной детерминации? Ф.Крик и П.Лоуренс предположили, что образование каждого компартмента обусловлено активностью некоторого числа контролирующих их генов (*селекторные гены, гомеозисные гены*). Предполагается, что селекторный ген может включать или подавлять “батарею” структурных генов. В таком случае активность селекторных генов детерминирует тип поликлона и соответственно его отличие от других поликлонов.

Такие последовательные “бинарные” (1, 0; активация, подавление) решения определяют время возникновения новых компартментов. Для региональной детерминации *восьми* компартментов необходимы, как уже отмечалось, *три* селекторных гена.

ДЕТЕРМИНАЦИЯ И ТРАНСКРИПЦИЯ УМЕРЕННО ПОВТОРЯЮЩИХСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Существует предположение, что решающую роль в региональной детерминации играет процесс репрессии первоначально активных гомеозисных генов. Стабильность детерминации обусловлена в таком случае стабильностью репрессии соответствующих гомеозисных генов.

Можно предполагать, что осуществление детерминационного процесса обеспечивается взаимодействием регуляторных белков и специфических зон ДНК, которое обуславливает дифференциальную активность генов. В связи с этим существенный интерес приобретает сопоставление сложности ядерной РНК в различных тканях и на разных стадиях развития. Такие исследования провели Э.Дэвидсон и Р.Бриттен (E. Davidson, R. Britten). Согласно их данным, относительно небольшая часть уникальных последовательностей ДНК представлена в виде копий РНК в той или иной дифференцирующейся ткани. У морского ежа это 10—20% последовательностей (в зависимости от стадии развития), в печени кры-

сы — 11%, в мозге мыши — 18%, в культуре клеток дрозофилы — 4—6%.

В ядрах клеток большинства тканей на разных стадиях развития состав транскриптов РНК с уникальных последовательностей обнаруживает сходство. В частности, 1/3 уникальных последовательностей ДНК морского ежа представлена в виде копий в ядерной РНК бластулы, гастролы, превителлиновых овариальных ооцитах и кишечнике взрослого животного. Ядерная РНК нейрулы и личинок лягушки гибридизуется соответственно с 11.3% и 12.1% уникальной ДНК, при этом имеет место гомология последовательностей нуклеотидов в ядерной РНК нейрулы и личинки. В то же время сложность полисомной мРНК личинки в 2 раза выше, чем сложность полисомной РНК нейрулы: 8,7 и 4,7% уникальной ДНК соответственно. Кроме того, мРНК, которая экспрессируется в эмбрионе, но отсутствует в полисомах кишечника, тем не менее может быть представлена в ядерной РНК кишечника.

Глобиновая мРНК содержится в низких концентрациях в ядрах клеток по крайней мере некоторых неэритроидных тканей, а овальбуминовая мРНК присутствует в ядрах клеток селезенки и печени. Р.Бриттен и Е.Дэвидсон предполагали, что в ядрах клеток различных тканей содержатся транскрипты большинства структурных генов, в то время как в полисомах обнаруживается только часть из них. В то же время они нашли среди ядерных РНК семейства копий умеренно повторяющихся последовательностей ДНК, специфичных для различных тканей и стадий развития. Иными словами, согласно Бриттену и Дэвидсону, в ядрах различных клеток содержатся относительно сходный набор РНК-копий уникальных генов и специфические наборы РНК-копий умеренно повторяющихся последовательностей ДНК.

Очевидно, в преддифференцировочный период, связанный с детерминационными событиями, по крайней мере большинство зон, содержащих структурные гены, транскрибируются конститутивно, образуя набор ядерных предшественников молекул мРНК. В то же время в разных клетках транскрибируются разные интегрирующие регуляторные транскрипционные единицы, представленные семейством умеренно повторяющихся последовательностей. Специфика набора транскрибируемых регуляторных единиц определяется генами-сенсорами, которые опознаются специфическими регуляторными белками, разными для клеток, развивающихся в разных направлениях, и активируют соответствующие регуляторные транскрипционные единицы. Продукты последних несут участки, способные опознавать комплементарные им участки транскриптов конститутивных генов и образовывать соответствующий специфический комплекс (транскрипты конститутивных генов — регуляторные транскрипты). В клетках, которые развиваются в разных направлениях, существуют разные наборы таких

Рис. 8.5. Схема регуляции генной экспрессии на посттранскрипционном уровне (по: Davidson, Britten, 1979)



комплексов. Предполагается, что только те продукты конститутивно транскрибируемых генов подвергаются процессингу с последующим транспортом зрелой РНК в цитоплазму, которые образуют комплекс с транскриптом соответствующей регуляторной единицы. Остальные продукты конститутивно транскрибируемых генов уничтожаются нуклеазами, так что процессы, происходящие на посттранскрипционном уровне, обеспечивают специфическую направленность процессинга, благодаря чему в разных дифференцирующихся клетках созревают разные мРНК (рис.8.5).

ЧТО ТАКОЕ ТРАНСДЕТЕРМИНАЦИЯ?

Тканевая и клеточная дифференцировка является внешним выражением детерминации и проявляется в синтезе специфических РНК, белков, формировании морфологических и функциональных признаков специализации клеток.

Э.Хадорн (рис. 8.6) рассматривает детерминацию как многоступенчатый процесс, тесно связанный с дифференцировкой. Детерминацию он подразделил на два типа: 1) ведущую непосредственно к диффе-



Рис. 8.6. Эрнст Хадорн. Выдающийся швейцарский генетик и эмбриолог.

Открыл явление трансдетерминации. Автор первой фундаментальной книги по проблемам генетической регуляции индивидуального развития. В ней он обобщил все экспериментальные данные, полученные в этой области в течение 30-х годов

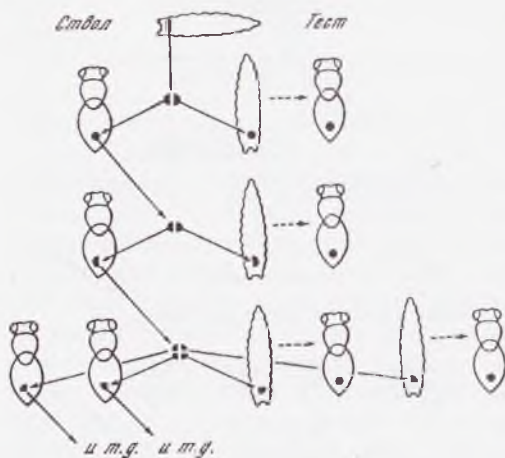
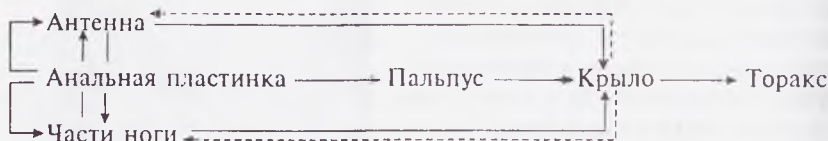


Рис. 8.7. Схема опытов Э. Хадорна по поддержанию состояния детерминации в клетках дрозофилы

ренцировке (например, к развитию специализированных нервных клеток) и 2) ведущую к постоянно воспроизводимому состоянию детерминации клеток, которые однако не дифференцируются (например, камбиальные клетки *Stratum cylindricum* в эпидермисе, эпителий крипт кишки и

т.д.). Хадорн установил, что при длительных трансплантациях детерминированных участков имагинальных дисков дрозофилы они сохраняют состояние детерминации и дифференцируются в одни и те же производные (рис. 8.7). Однако наряду с такой автотипической детерминацией в редких случаях наблюдается аллотипическая, или *трансдетерминация*, когда, например, из антеннальных клеток формируются blastемы конечностей.

Для каждого данного состояния детерминации имеется определенная вероятность, или частота, трансдетерминации в специфическом направлении. Клетки генитальных дисков с одинаковой вероятностью в первую очередь трансдетерминируются в головные или ножные клетки. Вторичная трансдетерминация этого аллотипического состояния ведет к появлению клеток крыла, однако никогда не наблюдается прямого превращения генитальных клеток в крыловые. В целом закономерности трансдетерминации можно выразить следующей схемой:



(сплошные стрелки — более частые события, прерывистые — более редкие)

Трансдетерминации подвергаются только интенсивно пролиферирующие культуры. Чем выше скорость деления клеток, тем чаще трансдетерминация.

КАКОВА ПРИРОДА ТРАНСДЕТЕРМИНАЦИИ?

Разные гипотезы о природе трансдетерминации проверялись экспериментально.

■ Не мигрируют ли трансдетерминированные клетки из организма хозяина? Оказалось, что нет, поскольку в опытах по трансплантации тканей из реципиента с мутацией *ebony* (черный цвет тела) в особи *yellow* (желтый цвет тела) структуры, образованные трансплантатом, всегда были окрашены в черный цвет, независимо от того, трансдетерминированы они или нет.

■ Возможна клеточная гетерогенность трансплантированного имагинального диска, так что в генитальном диске может содержаться несколько клеток, способных формировать ноги, но в обычных условиях их пролиферация подавлена. Для проверки этого предположения было использовано редкое явление соматического кроссинговера, происходящее в отдельных клетках, случайно распределенных в ткани. Имагинальные диски для трансплантации выделяли из личинок, гетерозиготных по *yellow* и *singed* (аномальная форма щетинок). Если соматический кроссинговер, индуцированный рентгеновским облучением, происходит между центромерой и маркерными генами, то образуются две клетки с разным генотипом — двойная гомозигота по маркерным генам и двойная гомозигота по их аллелям дикого типа. Из меченного таким способом клона клеток развиваются и нормальные и трансдетерминированные органы, а значит мало вероятно, что трансдетерминация является следствием селективной пролиферации каких-то клеток, несущих другую программу (рис. 8.8).

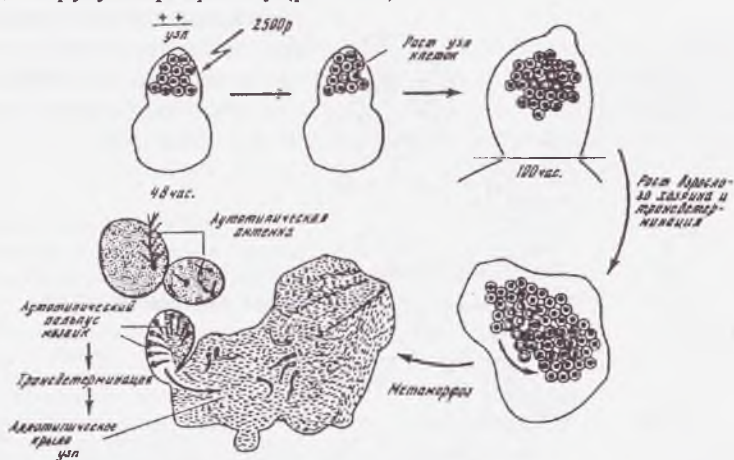


Рис. 8.8. Трансдетерминация в клоне (по: *Nadom, 1967*).

Клетки с черными ядрами принадлежат к генотипу $++/usj$, клетки со светлыми ядрами — гомозиготны по *usj*. Обнаружено трансдетерминированное потомство внутри *usj*. В качестве примера показан дифференцированный тест-имплантат с ауто- и аллотипическими структурами

■ Можно было бы предполагать, что трансдетерминация — следствие соматической мутации, однако частота наблюдаемых трансдетерминаций на несколько порядков выше частоты соматических мутаций (хотя следует учитывать, что в культурах пролиферирующих тканей последняя точно неизвестна).

Следовательно, детерминация обуславливает изменение клеточной наследственности на функциональном уровне.

Предполагается, что клетки, составляющие имагинальный диск, способны сохранять состояние детерминации без изменений в течение сотен генераций. Сходные системы известны и у позвоночных — это уже упомянутые выше камбиальные ткани. Для объяснения феномена трансдетерминации Э.Хадорн допускал наличие в клетках “носителей” детерминации (*C*) и эффикторов детерминации (*E*) — регуляторных белков, способных активировать, подавлять или дерепрессировать гены (рис. 8.9). Имеются также продукты, контролирующие специфичность процесса дифференцировки (*D*). Когда детерминированные клетки делятся, предсуществующие носители детерминации распределяются по дочерним клеткам, в результате чего их концентрация внутри клеток снижается. Состояние детерминации стабильно, если синтезируются ее новые носители в определенном количестве, компенсирующем снижение концентрации. Таким образом, имеется равновесие между степенью “разведения” предсуществующих и скоростью синтеза новых факторов детерминации. Если это равновесие сдвигается в результате, например, интенсификации кле-

точной пролиферации, то измененная концентрация носителей детерминации может так повлиять на эффикторы, что они “выключат” из функции одни гены и включат

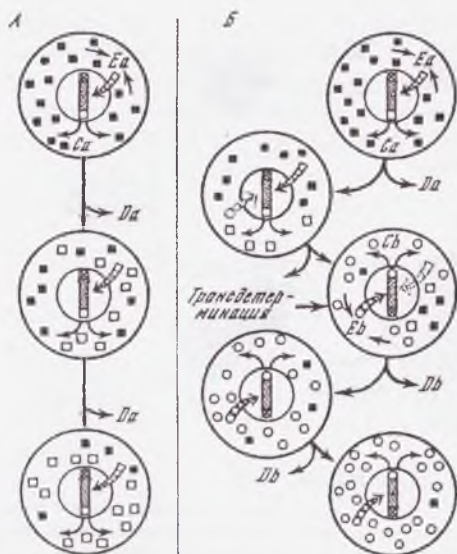


Рис. 8.9. Отношение между скоростью клеточного деления и скоростью синтеза носителей детерминации (по: Hadorn, 1967).

A — неизменная клеточная наследственность. *B* — процесс, ведущий к трансдетерминации. *Ea*, *Eb* — генотропные эффикторы; *Ca*, *Cb* — носители детерминации; *Da*, *Db* — специфическая дифференцировка. Черные квадраты — предсуществующие носители для *A*; светлые квадраты — вновь синтезированные носители для *A*; кружки — носители для трансдетерминированного состояния *B*. Гены внутри ядра активны (светлый квадрат) или репрессированы (крестик)

другие. Синтезируются новые носители детерминации, которые замещают предыдущие. Так, по Э.Хадорну, происходит трансдетерминация.

Встает вопрос, зависят ли этапы детерминации и дифференцировки от событий, совершающихся исключительно внутри клетки, или их нормальное течение требует не только индуцирующего стимула, но и последующих межклеточных взаимодействий. Второе было отчетливо продемонстрировано в сходных экспериментах К. Гробстайна (С. Grobstein) на цыплятах и Г.В. Лопашова — на амфибиях. Как уже отмечалось, Лопашов сращивал 2—10 мелких фрагментов, выделенных из области презумптивной головной мезодермы ранней гастролы. Эксплантаты из одного фрагмента развивались в поперечнополосатые мышцы без хорды или каких-нибудь других тканевых компонентов. Однако при совместном культивировании 2—4 таких фрагментов образуется компактная масса, в которой дифференцируются участки хорды. Комбинация 4—5 таких фрагментов приводит к образованию мышц, хорды и эпидермиса, при культивировании 6—10 фрагментов формируются мозговые структуры.

Г.В. Лопашов предположил, что на стадии ранней гастролы в зоне будущей мезодермы происходит изменение свойств в направлении от краевой зоны к эктодерме. Между эктодермальной и мезодермальной компетенцией этой зоны (т.е. способностью формировать эктодермальные и мезодермальные производные) существуют определенные соотношения, так что увеличение общего количества презумптивных мезодермальных тканей приводит к феномену “нейтрализации”.

У амфибий со стадии ранней нейрулы регуляция момента начала дифференцировки и ее специфичность определяются уже на уровне отдельных клеток, выступающих как самостоятельные единицы, а не внеклеточными факторами. Следовательно, клетки нейрулы уже “программированы” к развитию по определенному пути.

ДЕТЕРМИНАЦИЯ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТКАНЕВЫХ ЗАКЛАДOK

В то же время следует отметить еще один важный феномен, связанный с детерминацией и дифференцировкой в развивающемся зародыше, — это *автономность* (до некоторого момента) созревания отдельных его частей, описанная в предыдущей главе. Как отмечалось, созревание индуктора и реагирующей ткани происходит независимо от окружающих тканей зародыша. В ходе созревания свойства этих тканей изменяются в строго определенном направлении и закономерно.

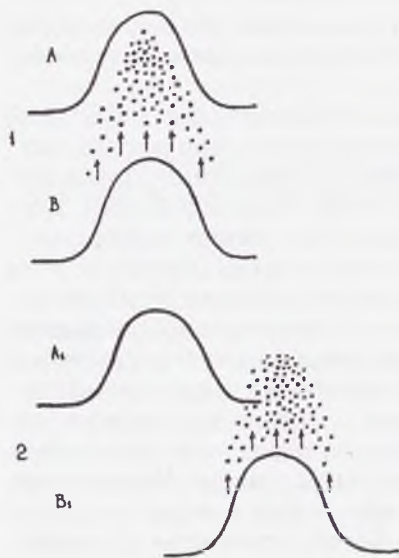


Рис. 8.10. Упрощенная схема взаимодействия индуктора (B) и компетентной (реагирующей) системы (A).

1 — в норме поток индуцирующего агента устремляется на пике созревания индуцирующей ткани в готовую (компетентную) к восприятию индуктора реагирующую систему. 2 — время созревания индуктора и реагирующей системы рассогласовано, и лишь часть индуцирующего агента попадает в готовую к реакции компетентную систему, что приводит к отклонениям в развитии

В связи с этим для успешного осуществления морфогенетических процессов необходимо строгое согласование по времени созревания ткани индуктора и реагирующей (компетентной) системы. Действительно, в силу автономного и независимого друг от друга и от остальных окружающих тканей их созревания морфогенетический эффект может реализоваться в полной мере только в том случае, если пики “готовности” к взаимодействию индуктора и компетентной ткани будут совпадать. Мутации, реализующиеся в той или другой из взаимодействующих систем и сдвигающие время их созревания, будут вызывать различной степени дефекты в развитии зародыша (рис. 8.10; 8.11). В случае полного рассогласования во времени созревания индуктора и компетентной ткани морфогенетический эффект вообще отсутствует.

В 60-е годы XX в. в Новосибирском Институте цитологии и генетики РАН Л.И. Корочкиным и О.И. Богомоловой были поставлены опыты на двух расах аксолотля — черной и белой. Известно, что различия в их окраске определяются одним геном — *d*, модификатором окраски. Животные генотипов *DD* или *Dd* — черные, а генотипа *dd* — белые, с единичными пигментными клетками на спине.

Чтобы животное стало черным, необходима миграция под эпидермис особых клеток — меланобластов, которые вырабатывают пигмент меланин. Эти клетки первоначально располагаются в специальном зачатке — нервном гребне на спинной стороне зародыша. Свое “путешествие” в сторону эпидермиса они начинают тогда, когда оттуда поступит сигнал неизвестной пока природы. Раньше предполагали, что “белый” эпидермис утрачивает способность выработать такой сигнал. Если зародышу белой расы трансплантировать кусочек эпидермиса от зародыша черной расы, то под ним образуется пигментированное пятно (рис. 8.12), поскольку способность к передаче такого сигнала восстанавливается. Но для того

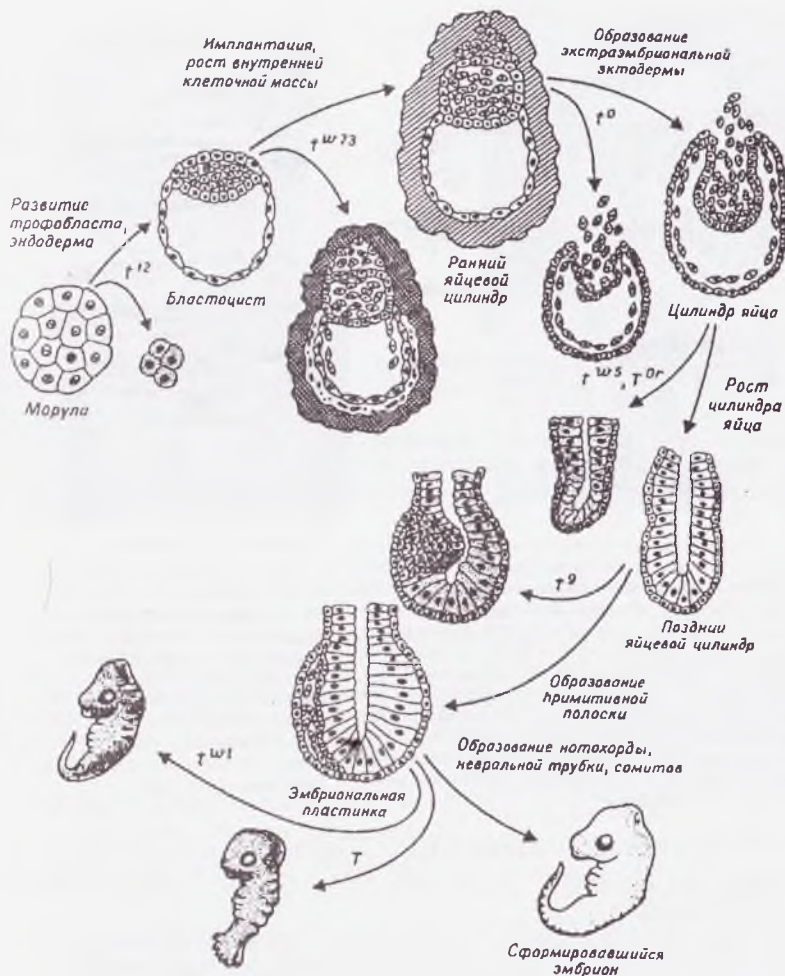


Рис. 8.11. Блокирование развития на разных стадиях эмбриогенеза аллелями локуса T у мыши (по: М.Беннету)

чтобы выдать такой сигнал, эпидермис должен достигнуть определенной степени молекулярного "созревания". Оказалось, что у зародышей белой расы аксолотлей способность к выработке индуцирующего сигнала в действительности не утрачивается, но задерживается созревание эпидермиса и сигнал запаздывает. Поэтому лишь отдельные меланобласты "неохотно" мигрируют и образуют небольшие скопления пигментных клеток на спинной стороне зародыша. Большая часть тела остается неокрашенной. Биохимические исследования эпидермиса подтверждают задержку его созревания у мутантных зародышей. В частности, один из изофер-

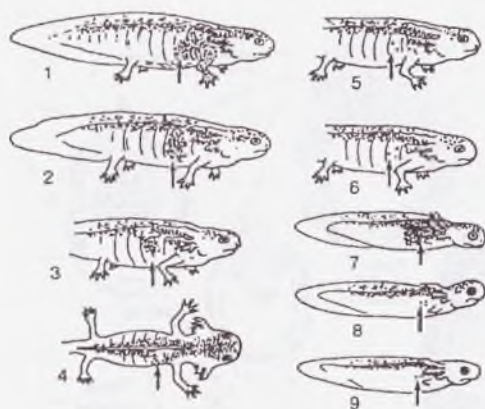


Рис. 8.12. Результаты опытов с трансплантацией эпидермиса от зародышей черных аксолотлей белым (по: Корочкин, Богомолова, 1968).

1, 2 — белые аксолотли в возрасте 4 мес, контрольные пересадки; 3, 4 — тот же донор выдерживали в растворе Гольцфретера, содержащем актиномицин; 5, 6 — донор выдерживали 24 часа в растворе Гольцфретера с актиномицином; 7 — зародыш аксолотля на 39-й стадии развития. Контрольная пересадка; 8, 9 — то же, трансплантат предварительно обработан актиномицинсодержащим раствором в течение 1 часа. Из рисунка следует, что для проявления нормальной индуцирующей способности эпидермиса необходимо активное функционирование ДНК. Блокада транскрипции актиномицином ведет к утрате этой способности, так что в эксперименте получается фенотип «белого» эпидермиса



Рис. 8.13. Опыты с совмещением времени созревания индуктора и компетентной ткани (по: Богомолова, Корочкин, 1970).

А — контрольные зародыши аксолотлей белой линии на стадиях 39—40. На их боковой поверхности отсутствуют пигментные клетки. Б — результаты трансплантации презумптивного эпидермиса от зародышей белой линии на стадиях 34—35 к зародышам той же линии на стадиях развития 25—26. Зародыши зафиксированы на стадиях 40—41. В месте трансплантата развилась пигментация (показано стрелками)

ментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) появляется в эпидермисе белой расы «не во-время» — позже, чем у контрольных, нормальных зародышей.

В эксперименте удалось «совместить» время созревания индуктора (в данном случае эпидермиса) и компетентной ткани — меланобластов нервного гребня — путем трансплантации кусочков эпидермиса от зародышей белой расы и разного возраста зародышам той же расы, но также разного возраста. В ряде опытов был «пойман» возраст трансплантата-индуктора и компетентной ткани, так что созревание каждого из них совмещается и приходится на «высшую точку». В результате при трансплантации эпидермиса белой расы белым же зародышам происходила миграция меланобластов в зону трансплантата и возникало пигментированное пятно, как и в случае трансплантации «черного» эпидермиса» (рис. 8.13).

Следует отметить, что значение временных параметров в генетической регуляции индивидуального развития было подчеркнуто одним из родоначальников фенотипетики Р. Гольдшмидтом и затем развито в России И.И. Шмальгаузенем (рис. 8.14) в стройную



Рис. 8.14. Иван Иванович Шмальгаузен. Крупнейший российский специалист в области сравнительной зоологии и эмбриологии. Академик.

Автор классических исследований целостности организма в индивидуальном и историческом развитии

концепцию корреляционных систем в развитии. Распад, дезинтеграция подобных систем может

сопровождаться своеобразным взрывом формообразовательных процессов и сложной перестройкой многих систем онтогенеза. Типичным случаем такой дезинтеграции корреляционных систем является domestикация животных, изученная сначала И.И.Шмальгаузеном, а затем Д.К.Беляевым (рис.8.15). Мутации, проявляющиеся в процессе domestикации (в своем большинстве накопленные ранее, но не распространившиеся в популяции в силу малой жизнеспособности большинства мутантов в естественной обстановке), в условиях их размножения и развития под охраной человека действуют на уровне корреляционных соотношений. При этом существовавшие корреляции часто теряются, а взамен устанавливаются совершенно новые. Так, развитие хохла и перьев на ногах у кур, а также курдюка у овец обусловлено действительно новыми корреляциями. И.И.Шмальгаузен рассматривает редукцию органов как локализованный распад корреляционных систем, а атавизм — как локальную дезинтеграцию, в основе которой лежат



Рис. 8.15. Дмитрий Константинович Беляев. Выдающийся российский генетик. Академик.

Автор классических экспериментов по изучению роли генорегулируемых корреляционных систем в процессе domestикации. Принимал активное участие в возрождении генетики в нашей стране. Вместе с академиком Н.П.Дубининым организовал Институт цитологии и генетики Сибирского Отделения АН СССР. Под его руководством этот институт стал одним из ведущих генетических учреждений мира

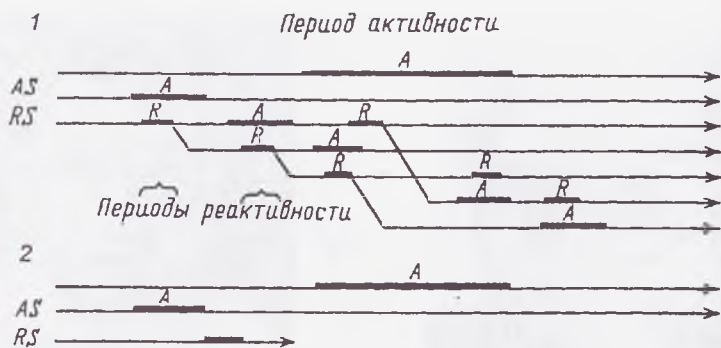


Рис. 8.16. Схема редукции органа при сдвигах (гетерохрониях) в индукционной системе (по: Шмальгаузен, 1938).

1 — нормальное развитие органа у предка: А — активаторы (индукторы); R — реакторы (рецепторы индукторов); AS — активирующая система; RS — реагирующая система. 2 — недоразвитие органа (рудиментация) у потомка вследствие сдвигов (запозданий в развитии реактора) в основной индукционной системе, определяющей детерминацию органа

сдвиги во времени наступления формообразовательных реакций (рис. 8.16).

Очевидно, события такого рода могут иметь существенное эволюционное значение, которое рассмотрено в тринадцатой главе.

Рекомендуемую литературу и вопросы для повторения см. в *Главе девятой*.

ДЕТЕРМИНАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОМ ОСВЕЩЕНИИ

КАК СООТНОСЯТСЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА?

Дифференцировка клетки является реализацией той программы, которая была намечена в ходе детерминации, и ее первая стадия, обозначаемая как *преддифференцировка*, перекрывается с последней, терминальной стадией детерминации (рис. 9.1). В этот период клетка еще сохраняет способность к митотическому делению, специфических синтезов не обнаруживается, но зато активно “строится” неспецифическая система синтеза белков — эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, митохондрии: ведь дифференцирующаяся клетка продуцирует значительные количества специфических веществ, а для этого необходимы соответствующий “механизм” и источники энергии. На следующей фазе, именуемой как *протодифференцировка*, способности клетки к делению ограничиваются, в ней обнаруживаются следовые количества специфического продукта (например, инсулина в клетках островков Лангерганса), т.е. эта фаза знаменует начало специфических синтезов, химически характеризующих принадлежность данной клетки к определенному типу. После этого она вступает в стадию *собственно дифференцировки*, когда полностью утрачивается спо-

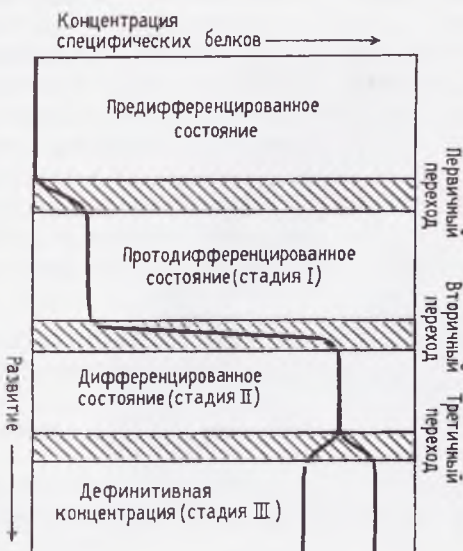


Рис. 9.1. Фазы клеточной дифференцировки

способность к пролиферации и резко возрастает концентрация специфического продукта. “Машина” белкового синтеза начинает работать на полную мощность. Завершается весь процесс *терминальной дифференцировкой*, характеризующейся выходом на пик синтеза специфического продукта и “обретением” всех признаков, свойственных фенотипу данной клетки.

Поскольку дифференцированные клетки утрачивают способность к размножению, в каждой ткани существует так называемый камбиальный резерв, состоящий из клеток, сохранивших способность к делению. Благодаря этому резерву пополняется “фонд” дифференцированных клеток в случае гибели какой-то их части. К данному резерву принадлежат и недавно открытые *стволовые клетки*. Они появляются уже у ранних (стадия бластоцисты) эмбрионов (эмбриональные стволовые клетки — ESC). В этот период ESC тотипотентны, т.е. способны давать любые производные — экто-, энто-, мезодермальные. В тканях взрослого они мультипотентны, т.е. способны давать много разных клеточных типов, но не все (региональные стволовые клетки). Стволовые клетки неожиданно для многих были найдены и в мозге. Там, как и в других тканях, они способны восполнять дефекты, связанные с гибелью нейронов. Стволовые эмбриональные нервные клетки способны дифференцироваться не только в нейральном, но и в других направлениях, спектр которых до конца не выяснен. Их можно выявить на гистологических препаратах с помощью иммуногистохимической реакции на синтезирующийся в них стадиеспецифический белок нестин. В ходе своей дифференцировки они проходят ряд стадий. Первая из них — стадия клетки-прародителя (*progenitor cell*), которая характеризуется синтезом белка виментина и способна развиваться только в нейральном направлении, как в направлении нейробласта, так и в направлении глиобласта. Следующая фаза ограничения перспективных потенций стволовой клетки — клетка-предшественник (*precursor cell*). Она способна дифференцироваться только в одном направлении — либо нейрона (нейробласт, специфически синтезирующий белок бета-тубулин) либо глиальной клетки (глиобласт, специфически синтезирующий кислый глиальный фибриллярный белок — GFAP).

КАК МОЖНО СЛЕДИТЬ ЗА АКТИВНОСТЬЮ ГЕНОВ В ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩЕЙСЯ КЛЕТКЕ?

Что такое изоферменты?

Какие молекулярно-генетические события лежат в основе детерминации и дифференцировки? Если относительно дифференцировки ситуация более или менее ясная, то процесс

детерминации с этом отношении остается по-прежнему в значительной степени таинственным. Связанный с этим круг вопросов удобнее всего рассмотреть на конкретной экспериментальной модели. Очевидно, для исследования сущности детерминации и дифференцировки на молекулярном уровне необходимо иметь: 1) генетически контролируемый продукт; 2) кодирующий его ген; 3) однородную систему клеток, синхронно его синтезирующих, дабы исключить примеси клеток, дифференцирующихся в другом направлении и синтезирующих другие продукты.

Возможность следить за функционированием генов косвенно, по появлению их продуктов, впервые появилась после открытия в 1958 г. К.Маркертом и Н.Меллером изоферментов и доказательства их генетической природы, произведенного Ч.Шоу (рис. 9.2). Маркерт и Меллер сделали свое открытие случайно. Они изучали последовательность появления различных фракций белка в онтогенезе млекопитающих с помощью электрофореза в крахмальном геле и решили идентифицировать различные фракции с теми или иными ферментами, используя новые по тем временам методы гистохимической окраски. Каково же было их удивление, когда они, окрасив одну из электрофореграмм на лактатдегидрогеназу (ЛДГ), обнаружили, что положительную реакцию дает вовсе не одна, а целых пять белковых фракций. Эти фракции и были названы *изоферментами (изоэнзимами, изозимами)*. Первоначально под изоферментами понимали любые множественные фракции одного и того же фермента, выявленные в одном и том же организме. Однако вскоре после этого Ч.Шоу, генетик из Техаса, обнаружил мутанта по ЛДГ и доказал генетический механизм появления пяти фракций этого фермента. Оказалось, что молекула ЛДГ — тетрамер, состоящий из двух типов субъединиц — М и Н. Они кодируются отдельными генами, локализованными в разных хромосомах. М-субъединица преобладает в соматических мышцах (отсюда и название: muscles — мышцы), а Н-субъединица — в сердце (отсюда название: heart — сердце). Эти субъе-



Рис. 9.2. Чарлз Шоу (снимок сделан в Новосибирском академгородке в 1969 г.). Выдающийся американский генетик, один из создателей генетики изоферментов.

Первым доказал генетическую природу формирования изоферментов. Основал специальный журнал "Biochemical Genetics", посвященный этой проблеме

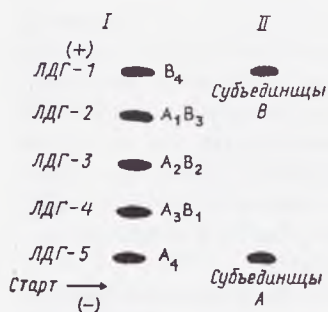
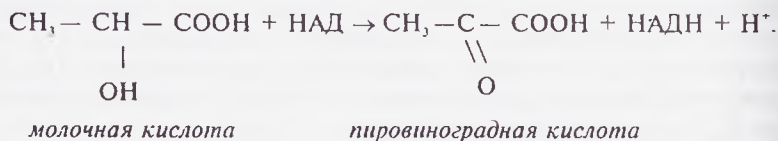


Рис. 9.3. Электрофореграмма, показывающая положение полос с изоферментами лактатдегидрогеназы (по: Маркерт и Урипрунг, 1973).

I — пять изоферментов ЛДГ, разделенных с помощью электрофореза в крахмальном геле. Положение каждой полосы можно установить путем гистохимического окрашивания на ЛДГ или на белки. Самый быстрый изофермент обозначается ЛДГ-1, он состоит из четырех Н-субъединиц (их иногда обозначают В). Самый медленный изофермент ЛДГ-5 состоит из четырех М-субъединиц (их иногда обозначают А). II — если смесь всех пяти изоферментов обработать мочевиной, блокирующей их ассоциацию друг с другом, то выявляются лишь две полосы

диницы могут объединяться в тетрамерную молекулу в любом сочетании, так что в конечном счете может образоваться пять типов сочетаний такого рода: НННН, НННМ, ННММ, НМММ, ММММ (рис.9.3). Поскольку субъединицы ЛДГ несколько отличаются по аминокислотному составу, а, следовательно, и по электрическому заряду, тетрамерные молекулы, различающиеся по составу субъединиц, характеризуются разной электрофоретической подвижностью, что и выражается в появлении пяти изоферментов ЛДГ. Лактатдегидрогеназа является достаточно интересным ферментом, поскольку играет важную роль в гликолизе, катализируя обратимую реакцию:

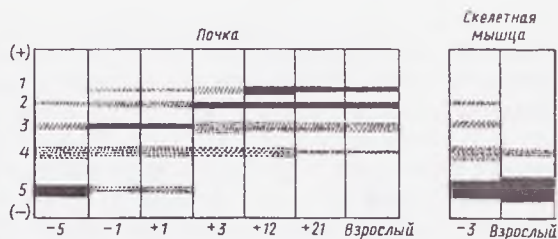


Естественно, изоферменты ЛДГ в первую очередь исследовали на предмет экспрессии в онтогенезе, предполагая, что по распределению активности среди них можно судить об активности соответствующих генов. Как мы увидим, это не совсем так, однако изучение динамики изозимного паттерна ЛДГ в онтогенезе позволило выявить *временную* и *пространственную* специфику этого паттерна. В эмбриональных тканях мышцы преобладает медленный изофермент ЛДГ-5. Физиологически это объясняется, по-видимому, тем, что ЛДГ-5 может интенсивно функционировать в анаэробных условиях, характерных, например, для эмбриональных тканей или скелетных мышц. Ее активность максимальна при тех концентрациях пирувата (субстрата), которые ингибируют ЛДГ-1. Очевидно, преобладание ЛДГ-5 должно обеспечивать быстрое превращение пирувата в лактат и, следовательно, приводить к кислородной задолженности в анаэробных условиях.

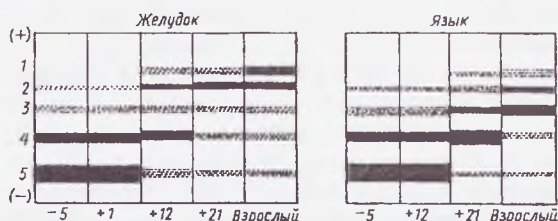
Однако в некоторых скелетных мышцах млекопитающих, например в камбаловидной, выявлено такое же распределение изоферментов ЛДГ, как в сердечной. Этот факт объясняется тем, что

Рис. 9.4. Схема изменения спектра ЛДГ в ходе развития тканей мышцы (по: Markert, 1963).

Заметно, что образцы изменяются несинхронно. Цифры по оси абсцисс — дни до (-) или после (+) рождения



такие мышцы содержат в основном красные волокна, главная физиологическая роль которых заключается в поддержании определенного положения тела и которые вследствие этого способны оставаться в состоянии более или менее длительного сокращения.



По мере клеточной и тканевой дифференцировки наблюдается постоянный сдвиг в сторону ЛДГ-1, затрагивающий разные ткани в разной степени (рис. 9.4). Например, в дифференцирующихся скелетных мышцах и в печени эти изменения незначительны и ЛДГ-5 преобладает и в завершившей специализацию ткани. В сердечной мышце, напротив, отчетливо выявляется переход от спектра с преобладанием ЛДГ-5 к спектру с наивысшей активностью — ЛДГ-1. Это имеет, по-видимому, важное метаболическое значение. Поскольку восстановление пирувата в лактат, катализируемое ЛДГ-1, существенно ингибируется уже небольшими концентрациями пирувата, предполагается, что в ткани, богатой этим изоферментом (например, в сердце), не может происходить быстрого накопления лактата и можно ожидать полного окисления глюкозы через цикл лимонной кислоты.

Естественно, возникают вопросы:

- Связаны ли изменения спектра изоферментов ЛДГ (и активности соответствующих генов) с выходом дифференцирующихся клеток из митотического цикла?
- Различаются ли эти изменения в клетках, происходящих из разных зародышевых листков?
- Отражаются ли на них видовые особенности индивида?

Как оказалось, на все три вопроса можно ответить положительно. В частности, показано, что в период интенсивной клеточной пролиферации активность ЛДГ быстро снижается перед каждым делением клетки. Колебания активности фермента происходят главным образом за счет субъединицы типа М. Добавление фитогемагглютинаина к культуре лимфоцитов и гранулоцитов вы-

зывает через 4 часа пропорциональное увеличение содержания полипептида М. Активность ЛДГ, как и ряда других ферментов (фумараза в КВ-клетках, деоксицитидин монофосфатдезаминаза, тимидилаткиназа в опухолевых HeLa клетках, орнитинтрансаминаза в печеночных клетках, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа в опухоли гепатоме), колеблется в течение клеточного цикла, достигая пика в конце S- или ранней G₂-фазы. Колебания обусловлены сдвигом в соотношении скоростей синтеза и распада субъединиц ЛДГ, так как актиномицин (ингибитор транскрипции) не оказывает влияния на течение процесса. Точно такие же колебания в концентрации субъединиц М наблюдаются в культурах скелетных и сердечных мышц *in vitro*. В таких условиях отмечается постоянное увеличение содержания полипептида М-типа. Сходные закономерности (снижение активности ЛДГ в период пролиферации и затем постепенная перестройка спектра изоферментов) обнаружены В.И.Миташовым и Л.И.Корочкиным при регенерации сетчатки тритона из пигментного эпителия и в условиях целого организма.

Таким образом, выход клеток из митотического цикла и вступление их в фазу дифференцировки сопровождаются определенными изменениями в активности ЛДГ и соотношении составляющих ее субъединиц.

Эти изменения могут дивергентно развиваться в сторону преобладания количества М- или Н-полипептидов в зависимости от особенностей дифференцирующейся ткани. На это развитие могут оказывать влияние особенности зародышевого листка, из которого происходит данная тканевая система. Так, с помощью иммуногистохимических методов показано, что у зародышей крысы материал мезодермы содержит больше субъединиц типа М, чем энто- и эктодерма (рис. 9.5).

Почечные клубочки, как и мезенхима, из которой они формируются, имеют относительно низкую общую активность ЛДГ. В обоих случаях преобладают М-полипептиды. По мере дифференцировки клубочков активность фермента и его медленных фракций возрастает.

В то же время каналцы, возникающие из сегментных ножек мезодермы, характеризуются нарастанием концентрации субъединиц Н, сопровождающим дифференцировку. Можно было предположить, что тут имеет значение обеспеченность развивающихся клеток кислородом. Однако богатые кислородом сосудистые клубочки содержат почти исключительно М-полипептиды подобно относительно бедным кислородом сосочкам.

Таким образом, происхождение данного типа клеток из того или иного зародышевого листка накладывает отпечаток на свойственный им спектр изоферментов ЛДГ.

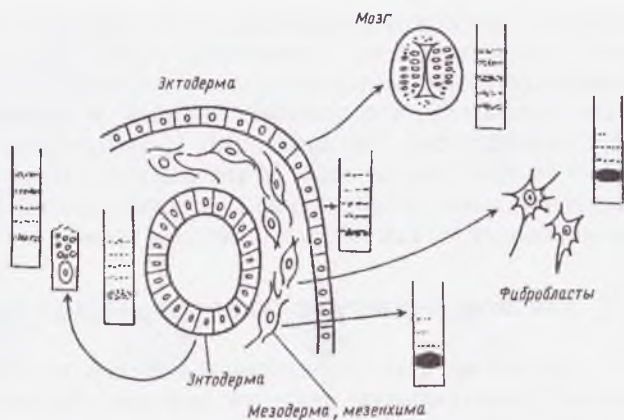


Рис. 9.5. Производные различных зародышевых листков сохраняют свойственные последним особенности спектра ЛДГ

Наконец, *межвидовые различия* в спектре ЛДГ во время онтогенеза были обнаружены при исследовании дифференцировки фракций паренхимных и соединительнотканых клеток печени. Так, у мышей в обеих фракциях на разных этапах развития преобладают ЛДГ-4 и ЛДГ-5, у кроликов — ЛДГ-4, у кошек — ЛДГ-4 и ЛДГ-5 (но с возрастом особенно заметно возрастает содержание ЛДГ-5), у морских свинок — ЛДГ-3.

Установившись в процессе клеточной дифференцировки, спектр ЛДГ сохраняет высокую стабильность. Даже при длительном культивировании клеток *in vitro* (до 180 дней), после первоначальных изменений, по-видимому, не специфичных для разных типов клеток и заключающихся в относительном снижении активности быстрого изофермента, спектр ЛДГ остается постоянным в культурах как анеуплоидных, так и диплоидных клеток.

В то же время следует отметить, что тканевая специфичность спектра ЛДГ (как, впрочем, и других ферментов) детерминируется не только дифференциальной активностью генов, кодирующих полипептиды М и Н, но и генами-модификаторами на уровне посттрансляционных событий. Типичным примером является экспрессия изоферментов ЛДГ в эритроцитах некоторых линий мышей. У большинства мышей в эритроцитах выявляются все 5 изоферментов ЛДГ, однако были обнаружены линии, представители которых характеризовались присутствием в эритроцитах лишь медленного изофермента ЛДГ-5 при нормальном паттерне ЛДГ в других тканях. Был локализован ген, который контролирует это отклонение, он не был сцеплен с генами, кодирующими субъединицы М и Н. Сначала предположили, что это регуляторный ген по типу гена-регулятора Жакоба и Моно (его так и обозначили

Ldr — регулятор лактатдегидрогеназы), и его эффект заключается в блокаде активности гена, кодирующего субъединицу Н, поэтому в эритроцитах формируется только тетрамер М4. Однако впоследствии оказалось, что дело заключается в другом — этот ген кодирует полипептид, связывающий Н-субъединицу и препятствующий ее ассоциации как с М-полипептидом, так и друг с другом. Следовательно, молекулярный фенотип клетки в данном случае формировался на посттрансляционном уровне.

КАК ФУНКЦИОНИРУЮТ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ГЕНЫ?

Одной из демонстративных моделей молекулярной клеточной дифференцировки является половая система самцов дрозофилы. В ней был найден удобный тканеспецифический маркер — изофермент бета-специфической эстеразы (рис. 9.6). При копуляции этот изофермент передается в половые пути самки, где разрушает *цис*-вакценилацетат с образованием феромона, запах которого сигнализирует о том, что данная самка больше не нуждается в услугах противоположного пола. Эта экспериментальная модель была разработана в Институте цитологии и генетики СО АН СССР (г. Новосибирск) Л.И. Корочкиным и сотрудниками (Н.М. Матвеева, Б.А. Кузин, А.А. Аронштам) в конце 60-х годов XX в. на *D. melanogaster* и *D. virilis*. Через 7 лет их данные были полностью подтверждены на *D. melanogaster* в лабораториях Р. Ричмонда (R. Richmond) в США и Дж. Окшотта (J. Oakeshott) в Австралии.

Разные виды дрозофилы отличались региональными особенностями в локализации этого изофермента (рис. 9.7). Как видно на

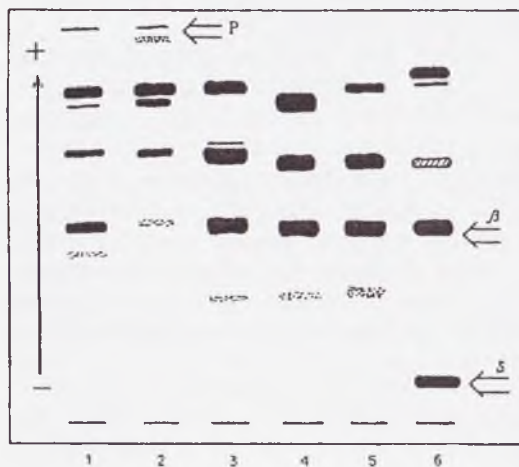


Рис. 9.6. Изоферменты карбоксилэстеразы *Drosophila lacicola* (из группы *virilis*), разделенные с помощью электрофореза в крахмальном геле и окрашенные гистохимически.

1, 2 — куколки; 3–5 — самцы сразу после вылупления; 6 — взрослый самец. Бета-специфические эстеразы показаны стрелкой. P — стадие-специфическая эстераза куколки; β — главная бета-специфическая эстераза, содержащаяся в высокой концентрации в гемолимфе; S — тканеспецифическая эстераза семявыносящих лукович самцов (с препарата Е. В. Поляковой)

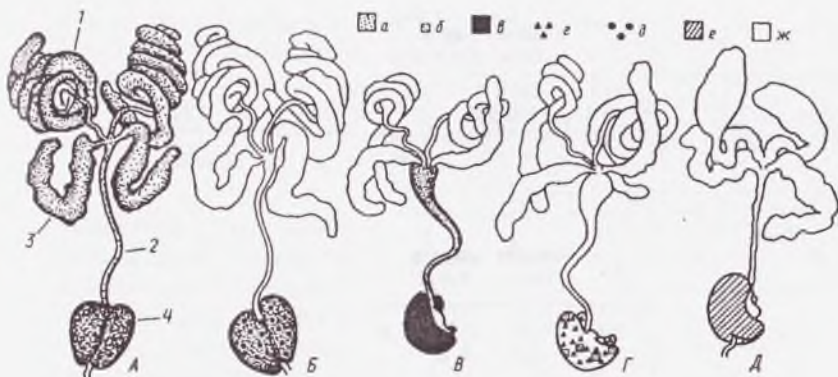


Рис. 9.7. Региональные особенности распределения молекулярных маркеров в репродуктивной системе самцов у разных видов дрозофилы (по: Корочкин, 1996).

А — *Drosophila* группы *hydei* (*D.hydei*, *D.neohydei*, *D.nigrohydei*, *D.eohydei*); Б — *Drosophila* группы *virilis* (12 видов); В — *Drosophila* филалы *melanogaster* (*D.melanogaster*, *D.simulans*, *D.sechellia*, *D.mauritiana*); Г — *Drosophila* филалы *yakuba* (*D.yakuba*, *D.teissieri*, *D.orena*, *D.erecta*); Д — *D.pseudoobscura*; а — тканеспецифическая бета-эстераза; б — следовая активность этой эстеразы; в — белок семявыносящих луковец *D.melanogaster* (PEB_{mc}); г — то же, *D.yakuba* (PEB_{yc}); д — то же, *D.virilis* (PEB_{vc}); е — то же, *D.pseudoobscura* (PEB_{pc}); ж — отсутствие обоих исследованных маркеров; 1 — семенники; 2 — семявыносящий проток; 3 — параногии; 4 — семявыносящие луковцы

рисунок, у самцов *D. virilis* он экспрессируется в семявыносящей луковце (аналог предстательной железы млекопитающих и человека), у *Drosophila* группы *melanogaster* — в семявыносящем протоке, у *Drosophila* группы *yakuba* либо вообще не экспрессируется в половой системе самцов, либо, возможно, проявляет следовую активность в семявыносящих луковцах. Наконец, у *Drosophila* группы *hydei* обнаружена любопытная ситуация: ген, кодирующий данный изофермент, трансформируется из тканеспецифического в типичный ген *house-keeping*, продукт которого выявляется не только на всем протяжении полового тракта, но и в других органах как самцов, так и самок, а также на личиночной стадии развития. Тканеспецифический эстеразный ген был выделен, клонирован и секвенирован у *D.virilis* (*estS*) и *D.melanogaster* (*est6*). Степень гомологии между этими двумя генами оказалась высокой: около 60%. Их молекулярная организация идентична (рис. 9.8): два экзона и между ними небольшой интрон. В обоих случаях тканеспецифический ген сцеплен с другим эстеразным геном сходной организации, но не обладающим тканеспецифической экспрессией. У других видов обнаружено по 3-4 таких сцепленных гена (рис. 9.9). Иными словами, гены, кодирующие бета-специфические эстеразы образуют кластер (рис. 9.10).

Особенно подробно были исследованы изменения экспрессии гена *estS* у *D.virilis*.

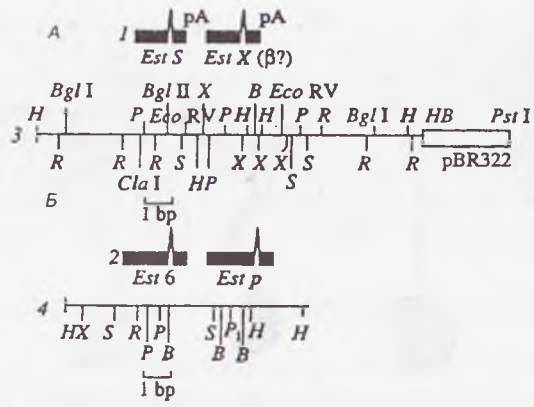


Рис. 9.8. Транскрипционная (1, 2) и рестриктивная (3, 4) карты.

А — *est-S D. virilis* (по: Корочкин, Епиколопова и др.) Б — *est-6 D. melanogaster* (по: Oakeshott et al).
 Фрагмент ДНК, содержащий гены, кодирующие тканеспецифическую эстеразу семявыносящих путей, сцепленную со второй бета-эстеразой. В обоих случаях гены организованы в кластер и построены идентично — из двух экзонов и одного интрона

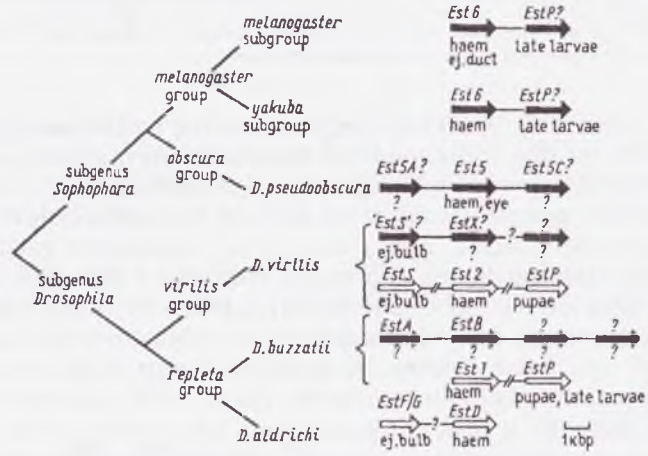


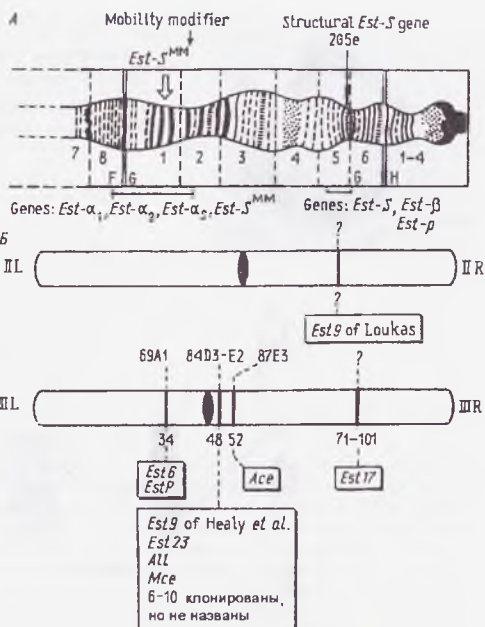
Рис. 9.9. Организация бета-эстеразных генов у разных видов дрозофилы (по: Oakeshott et al.).

Видно сходство с предыдущей схемой и эволюционный консерватизм этой организации. Обращает на себя внимание кластерная организация эстеразных генов. Количество генов, входящих в кластер, может варьировать

Этот ген имеет два промотора — проксимальный P_1 и дистальный P_2 , разделенные короткой последовательностью ДНК. Его продукт появляется в семявыносящих луковицах примерно на 3-й день после вылета мухи. Тканевая специфичность экспрессии генов *estS* и *est6* осуществляется на транскрипционном уровне, ибо эти гены транскрибируются только в тех органах, где обнаруживается их продукт (рис. 9.11).

Рис. 9.10. Бета-специфические эстеразные гены тесно сцеплены и формируют кластер.

А — *Drosophila virilis* (по: Корочкин, 1900). Б — *Drosophila melanogaster* (по: Oackeshott et al.)



Оказалось, что между детерминацией клеток генитальных имагинальных дисков к синтезу фермента и началом самого синтеза проходит довольно значительный промежуток времени. Как же было найдено время детерминации клеток к тканеспецифическому синтезу фермента? Для этого использовали сочетание экспериментально-эмбриологического метода и методов молекулярной биологии.

Схематически это представлено на рис. 9.12. Как видно на рисунке, были изолированы генитальные имагинальные диски из личинок-самцов разного возраста. Затем перед окукливанием их трансплантировали в другие личинки. Известно, что у таких личинок (или предкуколок) сдвигается гормональный баланс в сторону преобладания гормона линьки экдисона. Под его влиянием приостанавливается процесс детерминации и начинается процесс дифференцировки. Иными словами, в дифференцированное состояние реализуется все то, что было predetermined детерминацией к моменту экспериментального вмешательства. Таким образом, трансплантат дифференцируется в теле реципиента по-разному в зависимости от того, из личинки какого возраста он был выделен. Реципиент же развивается в куколку, затем из этой куколки вылетает муха, и можно проанализировать те структуры, которые возникают из трансплантата, а заодно и проверить молекулярную характеристику этих структур. Оказалось, что если генитальные имагинальные диски изолировать для трансплантации до 11 часов после второй линьки, в дифференцированном трансплантате не удастся определить изофермент EST S. Если же возраст донора превышает 11 часов после второй линьки, то ген *estS* экспрессируется в трансплантате, в области будущих семявыносящих луковок. Следовательно, момент детерминации клеток презумптивных семявыносящих луковок к синтезу EST S лежит в

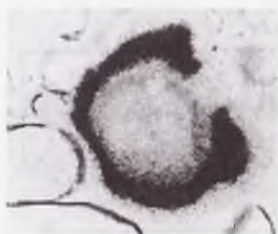


Рис. 9.11 Гибридизация 32 P-меченного ДНК-фрагмента, содержащего ген *EstS* с мРНК на гистологическом срезе взрослой *D. virilis*. Видны интенсивно меченые семявыносящие луковички (по: Корочкин, 1996)

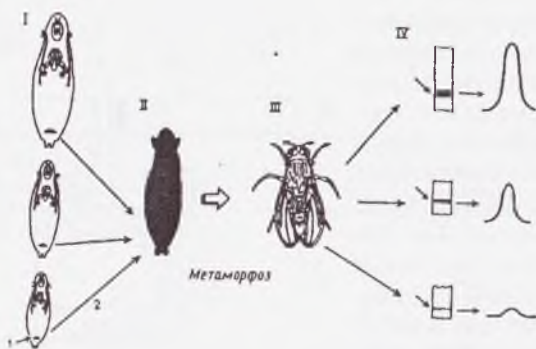


Рис. 9.12. Схема, демонстрирующая метод определения времени детерминации клеток будущей семявыносящей луковички к синтезу тканеспецифической эстеразы (по: Корочкин, Кузин, Аронштам, 1980).

I — личинки разного возраста; II — куколка или личинка перед окукливанием; III — взрослая муха; IV — электрофоретический анализ гениталиев самца и денситограммы изофермента S-эстеразы (оптическая плотность соответствующих полос на электрофореграмме). 1 — генитальный имагинальный диск личинки; 2 — генитальные имагинальные диски личинок дрозофилы разного возраста трансплантируются в куколки или в личинки перед окукливанием (одинаково у будущих самцов или самок). В силу специфики гормонального баланса в теле куколки (преобладание экдиозона) процессы детерминации в трансплантате прекращаются и его клетки переходят в режим дифференцировки, в ходе которой реализуются лишь те структуры, готовность к образованию которых была достигнута перед трансплантацией диска. После того как куколка пройдет метаморфоз и вылетит имаго, в последней трансплантат дифференцируется. Его извлекают и проводят электрофоретическое разделение белков с последующей окраской на эстеразу. Естественно, что тканеспецифический изофермент S-эстераза обнаружится лишь в том трансплантате, в котором на стадии личиночного развития прошла фаза детерминации готовности синтезировать этот фермент. Началом детерминации следует считать момент, когда соответствующий трансплантат даст хотя бы следы эстеразной активности (IV — нижний образец)

промежутке между 11 и 12 часами после второй линьки. Точно такие же результаты были получены и при исследовании детерминации клеток генитальных имагинальных дисков *Drosophila melanogaster* к синтезу изофермента EST 6, синтезируемого преимущественно в семявыносящих луковичках.

Сопровождается ли эта детерминация активацией данного гена? И здесь у *D. virilis* был обнаружен довольно интересный феномен. В момент детерминации начинался синтез специфической матричной РНК с дистального промотора. Однако эта мРНК не “чита-

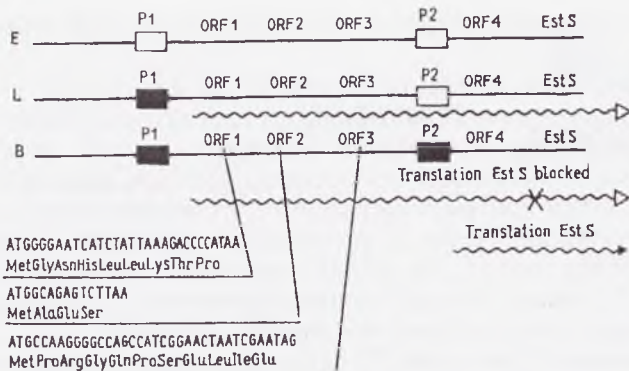


Рис. 9.13. Схема молекулярно-генетического контроля экспрессии гена *estS* (по: Сергеев, Ениколопов, Кузин, Корочкин, 1990).

Е — эмбрион (нет транскрипции, нет экспрессии); L — генитальные имагинальные диски личинок самцов (есть транскрипция с промотора P1, нет экспрессии, транскрипт фрагмента ДНК между первым и вторым промоторами, содержащий три открытых рамки считывания — ORF1, ORF2, ORF3 — блокирует трансляцию). В — дифференцированные семявыносящие луковички самцов (инициируется транскрипция с промотора P2, соответствующий транскрипт транслируется) — есть экспрессия гена. Таким образом, фрагмент ДНК между первым и вторым промоторами, содержащий три открытых рамки считывания, обуславливает блокаду транслируемости эстеразной ДНК. Удаление этого фрагмента ведет к трансляции этой мРНК. В то же время обращает на себя внимание, что первая активация транскрипции (с промотора P1) совпадает по времени с моментом детерминации клеток имагинальных генитальных дисков к синтезу эстеразы.

лась”, трансляция была заблокирована последовательностью нуклеотидов между двумя промоторами (рис. 9.13). Если ее вырезать, то в системе *in vivo* с промотора P1 будет транскрибироваться транслируемая мРНК.

КАК ГЕННЫЕ АНСАМБЛИ (“СЕТИ”) РЕГУЛИРУЮТ ЭКСПРЕССИЮ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ГЕНОВ?

Точно так же и в ходе индивидуального развития, когда клетки семявыносящих луковиц дифференцируются после вылета мухи, начинается транскрипция мРНК с промотора P1, и в клетках появляется тканеспецифическая эстераза (генные ансамбли, или “сети”). Особенности ее экспрессии регулируются целой системой транс-действующих генов. Эта система функционирует как у *D. virilis*, так и у *D. melanogaster*. В первом случае она изучена лучше, поэтому их рассмотрением мы здесь и ограничимся. Отселектированные линии этого вида различаются по следующим признакам:

- уровень активности фермента;
- время регистрации появления фермента в семявыносящих луковицах;

- соотношение свободной и мембраносвязанной фракций фермента.

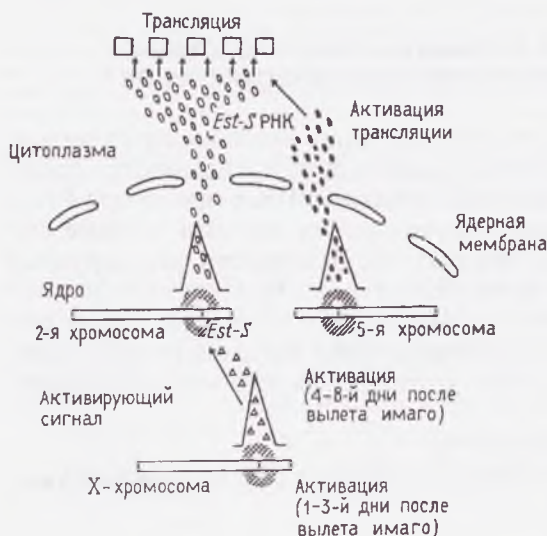
Посредством сочетания генетических и молекулярных методов были выявлены гены, контролирующие эти различия:

- **Ген-регулятор активности** фермента — $estS^{RA}$, локализован в проксимальной части X-хромосомы. Этот ген, возможно, активирует ген $estS$ и контролирует уровень транскрипционной активности структурного гена, а, следовательно, и количество молекул мРНК. В тех линиях, где транскрипционная активность выше, образуется больше молекул тканеспецифической эстеразы и соответственно выше уровень активности фермента.

- **“Временной” ген** — $estS^{RT}$, от его активности зависит время начала трансляции. Предполагается, что этот ген, локализованный в 5-й хромосоме (у *D. virilis* их шесть!), в зоне, кодирующей одну из транспортных РНК, отвечает за доставку в район трансляции одной из аминокислот, которой особенно богат белок EST S.

- **“Архитектурный” ген** — $estS^{RM}$, локализован в 4-й хромосоме, от него зависит степень связанности изофермента EST S с мембранами. У некоторых видов *D. virilis* практически вся популяция молекул фермента связана с мембранами (например, собственно *D. virilis*), и для ее выделения приходится проводить экстракцию белков с детергентами, особенно часто с тритоном X-100), у других (например, *D. montana* или *D. novamexicana*) большая часть молекул фермента находится в свободном, не связанном с мембранами, состоянии (рис. 9.14).

Такого рода генетический ансамбль, управляющий особенностями проявления специфического молекулярного признака, известен не только у дрозофилы, но и у млекопитающих. Так, американские биологи К.Пейген и Р.Гэншоу описали систему *цис-* и *транс-*действующих генов, от которых зависит экспрессия гена бета-глюкуронидазы в проксимальных канальцах поч-



вестен не только у дрозофилы, но и у млекопитающих. Так, американские биологи К.Пейген и Р.Гэншоу описали систему *цис-* и *транс-*действующих генов, от которых зависит экспрессия гена бета-глюкуронидазы в проксимальных канальцах поч-

Рис. 9.14. Общая схема генетической регуляции экспрессии S-эстеразы в семявыносящих луковицах *Drosophila* группы *virilis* (по: Корочкин, 1996)

Рис. 9.15. Регуляция синтеза бета-глюкокоронидазы в почках млекопитающих (по: Paigen, Ganschow, 1900).

1 — структурный ген (*Gus*); 2 — ген-регулятор активности (*Gur*); 3 — ген-регулятор времени синтеза фермента, "временной" ген (*Gut*); 4 — андростерон; 5 — рецептор для андростерона; 6 — ген *Tft*, кодирующий этот рецептор; 7 — ген *Eg*, кодирующий белок эгозин, способствующий транспорту фермента по системе клеточных каналов; 8 — белок эгозин (показан кружочками); 9 — процессинг-гены, способствующие созреванию белка, его распределению в клетке ("архитектурные" гены); 10 — ген *bg*, способствующий секреции белка



ки мышцы. Они описали следующие гены, входящие в состав этой системы (рис. 9.15):

■ **Структурный ген (*Gus*)** — кодоминантный ген, локализован на конце 5-й хромосомы, определяет структуру и каталитические свойства фермента. Из почек мыши была выделена поли(А)-содержащая РНК, в том числе и транскрипт гена *Gus*.

Она была протранслирована в тест-системе ооцитов амфибий. Оказалось, что если в ооцит инъектировать 60 пикограмм (пг) поли(А)-содержащей РНК, то в нем за один день синтезируется примерно 25 пг бета-глюкокоронидазы.

■ **Регуляторный ген (*Gur*)** — сцеплен со структурным геном, определяет скорость синтеза фермента в ответ на физиологические воздействия гормонов. От этого гена зависит также уровень активности фермента, разный у разных линий. Было определено, что различия в активности связаны с уровнем транскрипционной активности гена *Gus* и (как следствие этого) с различным количеством молекул бета-глюкокоронидазы, синтезированной матричной РНК.

■ **Временной ген (*Gut*)** — также сцеплен со структурным геном, определяет временную программу экспрессии структурного гена в процессе роста и развития организма.

■ **Гены процессинга *Eg*** — детерминируют функции метаболического аппарата, ответственного за посттрансляционные изменения фермента (структурные модификации, связывание с мембранами, деградация фермента и т.д.). Выявлен белковый фактор эгозин, кодируемый структурным геном, локализованным в 8-й хромосоме. Этот фактор необходим для посадки фермента на мембраны эндоплазматического ретикула и лизосомы.

■ *Ген bg (X-хромосома)* — отвечает за синтез белкового рецептора, воспринимающего гормональные сигналы, которые влияют на активность структурного гена.

■ *Ген Tfm* — локализован в 13-й хромосоме, влияет на секрецию фермента через проксимальные каналцы.

Как уже отмечалось, регуляторные гены *Gur* и *Gut* тесно сцеплены со структурным геном, действуют, очевидно, в *цис*-положении и контролируют количество специфических матриц, синтезируемых структурным геном.

КАК ОРГАНИЗОВАНА РЕГУЛЯТОРНАЯ ОБЛАСТЬ, КОНТРОЛИРУЮЩАЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ?

Встает вопрос о том, что же все-таки является ведущим в тканевой специфике экспрессии генов — прилежащие к структурному гену регуляторные последовательности (промоторы, энхансеры и др.) или генотипическая среда, в которой этот ген вынужден функционировать? Для ответа на этот вопрос были получены трансгенные *D.melanogaster*, в геном которых был инсертирован ген *estS D.virilis* с прилежащими регуляторными последовательностями. С помощью иммуноблот-анализа (анализ белков электрофореграммы с помощью специфических антисывороток) было выяснено, что ген *estS* экспрессируется только в семьявыносящих луковицах реципиента, т.е. как и у донора (рис.

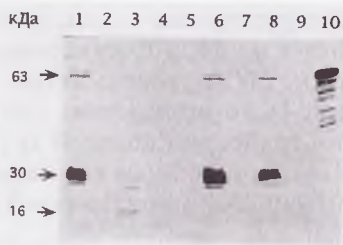


Рис. 9.16. Иммунохимический анализ полипептидных продуктов, изолированных из различных органов трансгенных *D.melanogaster* (по: Корочкин и др., 1997).

Результаты иммуноблотанализа со специфической антисывороткой против эстеразы *S D.virilis*. Предварительно проводился электрофорез образцов в полиакриламидном геле, затем белки с электрофореграммы "переносились" на нитроцеллюлозу и последняя обрабатывалась иммунохимическим методом с использованием специфической антисыворотки. Образованный с антисывороткой комплекс специфически окрашивался. Колонки 1—9 соответствуют трансформированным *D.melanogaster*. Колонка 10 — семьявыносящая луковица *D.virilis*. Сверху: старт с нанесенными образцами. Стрелками показаны молекулярные массы белковых продуктов в соответствующем пункте электрофоретической колонки. Различия в подвижности эстеразы *S* в образцах *D.virilis* и трансгенных *D.melanogaster* связаны с тем, что в семьявыносящих луковицах *D.virilis* этот изофермент гликозилирован и связан с белками, что резко снижает его электрофоретическую подвижность.

1 — гениталии 4-дневного самца; 2 — 4-дневный самец без гениталий; 3 — гениталии самки (слабая окраска в области эстеразы связана с тем, что образец был взят после копуляции, так что изофермент эстеразы был "передан" вместе с эякулятом от самца к самке); 4 — гениталии виргинной самки, не видно даже следов окраски; 5 — самка без гениталий; 6 и 8 — гениталии взрослых самцов разного возраста; 7 и 9 — взрослые самцы без гениталий

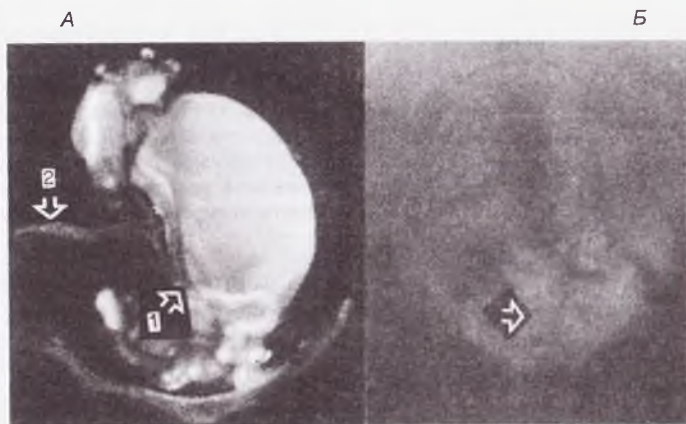


Рис. 9.17. Гибридизация *in situ* меченной люминесцентным красителем ДНК *estS D.virilis* с тотальными препаратами гениталий самцов *D.melanogaster* (по: Корочкин, 1997).

А — трансгенная муха; Б — контрольная муха. 1 — семявыносящая луковичка; 2 — семявыносящий проток. Положительная реакция наблюдается только в семявыносящей луковичке трансгенных мух

9.16). При этом специфичность экспрессии чужеродного гена реализуется на транскрипционном уровне, как и в норме, он транскрибируется только в семявыносящих луковичках (рис. 9.17). Следовательно, тканеспецифичность экспрессии гена *estS* определяется смежными регуляторными последовательностями. В дальнейшем эта регуляторная последовательность длиной около 0,6 кб была “подразделена” на 5 зон, каждая из которых ответственна за экспрессию гена в том или ином органе мухи, так что тканевая специфичность экспрессии репортерного гена (например, *lacZ*) у трансгенных мух будет зависеть от того, с какой частью регуляторной области он соединен (рис. 9.18; 9.19). Но если все 5 регуляторных зон присутствуют во всех органах развивающегося животного, почему ген *estS* экспрессируется только в семявыносящих луковичках?

Для исследования этой проблемы в лаборатории Л.И.Корочкина были получены трансгенные дрозофилы, содержащие ре-

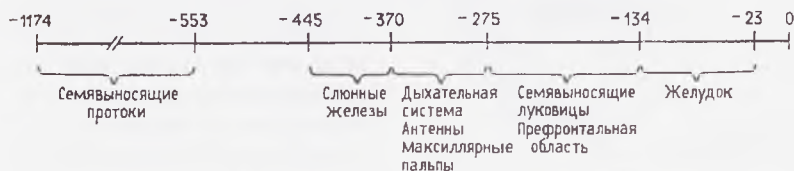


Рис. 9.18. Регуляторная зона гена *estS D.melanogaster*.

Показано расстояние от старта транскрипции в нуклеотидных парах. Отмечены энхансеры, ответственные за экспрессию эстеразы в тех или иных органах мухи (по: Oackeshott et al.)

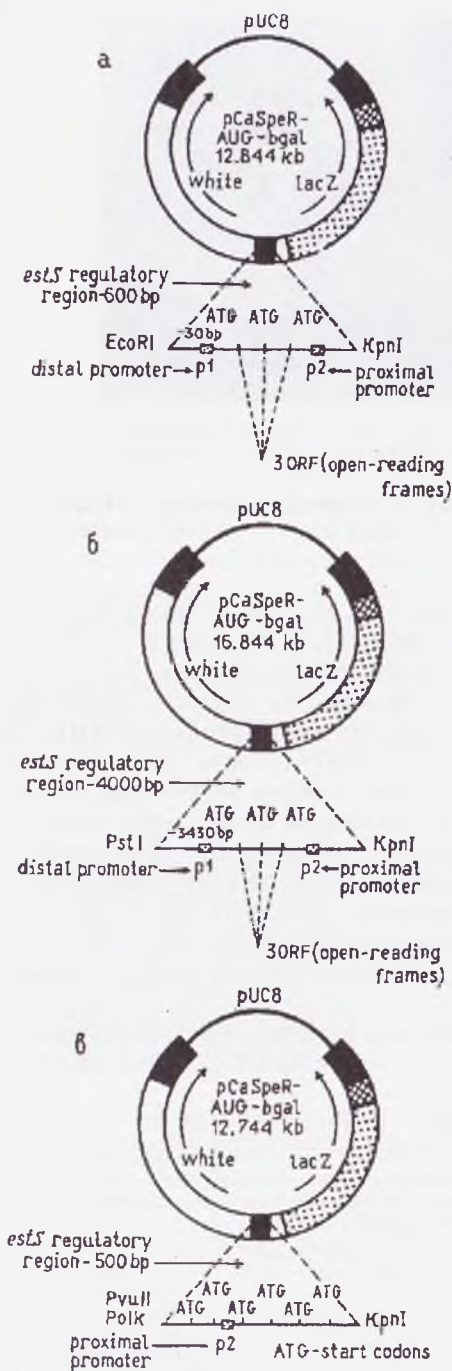


Рис. 9.19. Конструкции плазмиды CaSpeR, включающие ген *lacZ* и фрагменты регуляторной зоны гена *estS* *D. virilis*, которые были использованы в экспериментах Л.И. Корочкина и сотрудниками с целью изучения механизмов регуляции тканеспецифичности экспрессии эстеразного гена

портерный ген с регуляторной зоной гена *estS* разной протяженности, в том числе и достаточно большой (до 4 кб). В качестве репортерного гена использован ген бактериальной галактозидазы (*lacZ*), продукт которого легко обнаружить с помощью гистохимической реакции с так называемым X-gal-реактивом. На рис. 9.19. представлены конструкции, которые были введены в геном *D. melanogaster*. Оказалось, что прилежащая к структурному гену последовательность длиной до 1000 нуклеотидных пар обуславливает экспрессию репортерного гена во многих органах мухи, что и неудивительно, поскольку она содержит все соответствующие 5 зон, о которых говорилось выше. Присутствие дистально расположенной ДНК блокирует экспрессию гена *estS* во всех органах, кроме семявыносящих лукович. Таким образом, как и в случае раннего развития, в процессе химического созревания клеток задействованы две регуляторные системы — активизирующая и тормозящая, взаимодействие которых и детерминирует специфичность экспрессии того или иного гена (рис. 9.20).

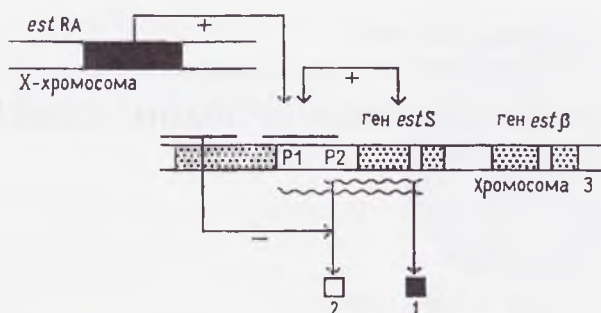


Рис. 9.20. Схема активирующих и тормозящих путей в регуляции тканеспецифической экспрессии гена *estS* в семявыносящей луковиче *D. virilis*

Рекомендуемая литература

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Д. и др. Молекулярная биология: В 3 т. М.: Мир, 1994—1996.
2. Гилберт С. Биология развития: В 3 т. М.: Мир, 1993—1995.
3. Корочкин Л.И. Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1997.
4. Корочкин Л.И. Регуляция действия генов в развитии//Молекулярная биология. 1981. Т.15. С. 965—988.
5. Нейфах А.А., Тимофеева М.Я. Проблемы регуляции в молекулярной биологии развития. М.: Наука, 1978.
6. Development. Frontiers in biology // Science. 1994. V. 266. P. 513—700.

Вопросы для повторения

1. Какие стадии клеточной дифференцировки принято различать?
2. Что такое изоферменты?
3. Как функционируют тканеспецифические гены?
4. Как генные ансамбли регулируют экспрессию тканеспецифических генов?
5. Как организована регуляторная область, контролирующая тканеспецифичность экспрессии генов?
6. Что такое детерминация и трансдетерминация?
7. Каковы молекулярно-генетические основы детерминации?

ГЕНЕТИЧЕСКИ ПРОГРАММИРОВАННАЯ СМЕРТЬ КЛЕТОК (АПОПТОЗ)

ЧТО ТАКОЕ АПОПТОЗ?

В ходе индивидуального развития особенно в период эмбриогенеза, метаморфоза, при обновлении клеточного состава различных тканей, при функционировании иммунной системы обычным и жизненно необходимым является элиминация ненужных клеток, и этот процесс осуществляется с помощью *апоптоза*. Этому явлению с течением времени отводится все больше места в молекулярной генетике развития.

Апоптоз — генетически запрограммированное “самоубийство” клеток. Термин происходит от греческого слова, описывающего растения при листопаде. Благодаря апоптозу осуществляются:

- формообразовательные процессы;
- точная регуляция количества клеток в том или ином клеточном ансамбле;
- удаление лишних или потенциально опасных клеток, подобных некоторым типам лимфоцитов;
- удаление опухолевых клеток;
- удаление клеток инфицированных вирусом.

В ЧЕМ ЗАКЛЮЧАЮТСЯ ОТЛИЧИЯ АПОПТОЗА ОТ ОБЫЧНОЙ НЕКРОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК?

Апоптоз следует отличать от обычной некротической гибели клеток. Последняя, как правило, вызывается острым повреждением клетки, которое характеризуется быстрым ее набуханием и лизисом. В противоположность этому апоптозу свойственна специфическая феноменология:

- Конденсация клеточного ядра и деградация ядерной ДНК посредством эндонуклеолитического дробления хромосомной ДНК, распадающейся сначала на большие фрагменты (50—300 кб), а затем на очень мелкие фрагменты (рис.10.1).
- Гибель клеток в случае апоптоза — “самоубийство”, ибо в клетках “срабатывает” внутренняя программа их гибели, включаю-

Рис. 10.1. Изменения структуры клетки при апоптозе (по: Lewis, 1998).

А — нормальная клетка; *Б* — клетка, измененная при апоптозе. Обращают на себя внимание конденсированные фрагменты ядерного хроматина

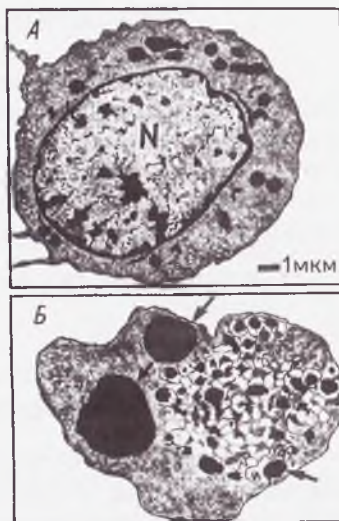
шая активацию эндогенных протеаз. В связи с этим апоптоз часто называют программированной клеточной смертью (PCD).

Апоптоз регулируется межклеточными отношениями, в результате чего организм может элиминировать нежелательные клетки.

■ Апоптоз характеризуется утратой митохондриальной функции, что позволяет предположить их важную роль в регуляции этого процесса. Плазматическая мембрана при апоптозе остается целой.

■ Описаны гены, контролирующие апоптоз. Так, раннее изучение апоптоза показало, что лекарства, которые блокируют синтез белка, предотвращают апоптоз и, следовательно, запрограммированная форма гибели клеток требует синтеза специфических белков (особенно характерным является синтез аннексина) и соответственно зависит от кодирующих их генов. Однако иногда эти вещества могут индуцировать апоптоз, что свидетельствует о постоянном присутствии молекул-эффекторов апоптоза в клетках млекопитающих. Например, высокие концентрации ингибитора протеинкиназы стауроспорина индуцируют PCD во многих типах клеток, в культуре тканей, включая олигодендроциты и их предшественники, клеточные линии фибробластов человека, эпителиальные клетки хрусталика и хондроциты. Во всех этих случаях ингибиторы синтеза РНК или белков не блокируют апоптоз. Более того, клетки, у которых ядра удалены с помощью цитохалазина или центрифугирования, все еще погибают с характерными признаками PCD.

■ В связи с данными подобного рода принято считать, что все белки, требуемые для осуществления апоптоза, конститутивно экспрессируются в клетках млекопитающих. Потребность в синтезе РНК и белка для индукции запрограммированной клеточной гибели может отражать потребность в синтезе молекул, активирующих уже существующий механизм PCD, а не в синтезе компонентов, осуществляющих эту гибель.



ФАЗЫ АПОПТОЗА. ГЕНЫ, ЕГО КОНТРОЛИРУЮЩИЕ

Апоптоз — явление универсальное, свойственное самым различным видам животных. В 80-е годы XX в. было показано, что у круглого червя *Caenorhabditis elegans* из составляющих его 1090 клеток в ходе эмбрионального развития погибает посредством апоптоза 131. У *C.elegans* программированную гибель клеток принято подразделять на 4 стадии (рис. 10.2):

- 1) решение что данная клетка погибнет или выберет другую судьбу;
- 2) гибель клетки;
- 3) поглощение (engulfment) гибнущей клетки фагоцитом;
- 4) деградация поглощенного тела.

Благодаря удобству *C.elegans*, именно у него удалось впервые выделить мутации, которые влияли на PCD. Оказалось, что гены *ced-3* и *ced-4* и являются генами смерти. Ген *ced-9* — анти-апоптотный ген, активность которого предохраняет клетки от апоптоза. В случае дефекта в CED9-белке, обладающем протеазной активностью, выживают все 131 клетка, которые в противном случае были бы обречены на гибель посредством апоптоза.

У млекопитающих был обнаружен ген *bcl-2*, идентичный онкогену, защищающий иммунные клетки, а также нервные клетки от апоптоза. Оба гена были секвенированы, и было найдено, что

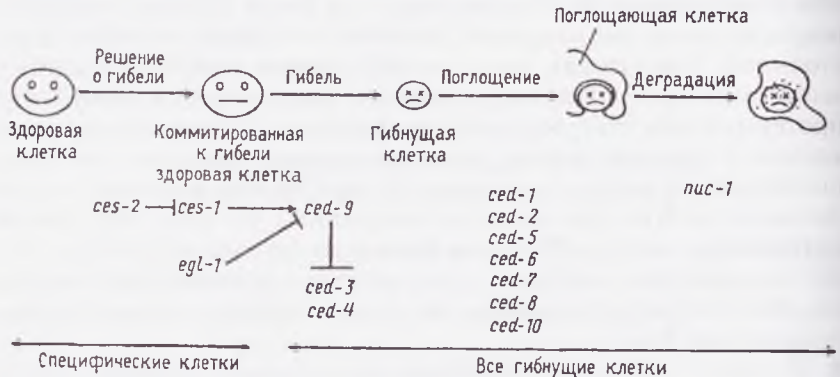


Рис. 10.2. Генетический путь программированной клеточной гибели у *Caenorhabditis elegans* (по: Steller, 1995).

Было выделено 14 генов, которые на различных стадиях оказывают влияние на этот процесс. Мутации, которые влияют на решение погибнуть, действуют только в малом количестве клеток. В противоположность этому гены, вовлеченные в реализацию всех последовательных стадий клеточной гибели, являются общими для всех соматических клеток этого организма. Активность генов *ced-3* и *ced-4* стимулируют гибель клеток, в то время как активность гена *ced-9* предотвращает это событие, "спасает" клетку от гибели. Установлены эпистатические отношения между этими генами. Символы: → — позитивная регуляция, ⊥ — негативная регуляция

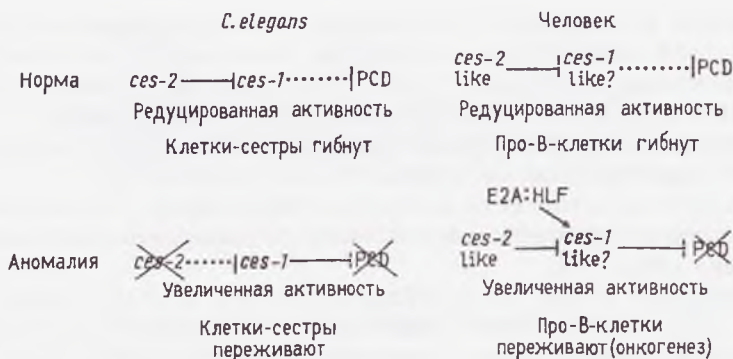


Рис. 10.3. Модель роли в клеточной гибели белков CES-2 и онкопротеина E2A:HLF (по: *Metzenstern, 1996*).

В нормальных сестринских клетках NSM *C. elegans* или в человеческих про-В-клетках активность гена *ces-2* или человеческого его гомолога репрессирует (линия с вертикальной полоской) активность генов, предотвращающих клеточную гибель — *ces-1* у *C. elegans* или подобный ген у человека. Эта репрессия предотвращает торможение программированной клеточной гибели (прерывистая линия), и клетки погибают.

При аномалии в мутантах с утратой функции *ces-2* редукция соответствующей активности ведет к увеличению активности *ces-1* (жирный шрифт), в результате чего блокируется клеточная гибель. В про-В-клетках человека E2A:HLF слившийся белок активирует (стрелка) активность *ces-1*-подобного гена, что ведет к блокаде программированной клеточной гибели и способствует онкогенезу

ген *ced-9* на 23% идентичен гену *bcl-2*, обладающему сходной функцией. При этом ген *bcl-2* может функционально замещать ген *ced-9* у *C. elegans* и спасать мутантов от гибели.

При проведении скрининга мутантов *C. elegans*, которые изменяли паттерн экспрессии нейротрансмиттера серотонина, обнаружен ген *ces-2*. Имеются генетические свидетельства в пользу того, что этот ген действует как репрессор другого гена — *ces-1*, и таким способом ингибирует активность генов, детерминирующих гибель серотонинсодержащих нервных клеток (рис.10.3). У животных с мутациями, прерывающими функцию гена *ces-1*, те серотонинсодержащие клетки, которые были преддетерминированы к гибели, не претерпевают апоптоз.

Мутации с утратой функции гена *ces-2* вызывают появление в глотке развивающегося червя двух дополнительных серотонинсодержащих нейронов. Эти две клетки обозначают как NSM-нейроны. В процессе нормального развития они претерпевают апоптоз и погибают, а у *ces-2*-мутантных животных выживают. Ген *ces-2* уникален в том смысле, что его инактивация действует на выживание только двух клеток. Этот ген — член субсемейства генов, которое кодирует транскрипционные факторы с лейциновым zipperом (застежкой). Другой транскрипционный фактор из этого субсемейства — так называемый фактор печеночной лейкемии (HLF) был открыт в связи с тем, что был локализован на стороне хро-

мосомной транслокации, которая является характерным признаком острой лейкоцитарной лейкемии. Химерные белки E2A-HLF, возникающие в результате этой транслокации, предотвращают гибель клеток в ответ на апоптозный стимул. Таким образом, эти химерные белки увеличивают количество развивающихся лимфоцитов, предотвращая их гибель.

В конечном итоге есть основания предполагать, что *генетическая программа апоптоза консервативна и универсальна от червя до человека* (рис.10.3).

Благодаря этому были найдены многочисленные гомологичные гены, так или иначе связанные с реализацией внутренней программы гибели клеток — апоптоза. Поиск гомологов генов *ced-3* и *ced-4* осуществлялся путем скринирования генных банков сходных последовательностей. Таким путем был обнаружен новый ген, кодирующий белок ICE (interleukin-1beta-converting enzyme). Это протеаза, которая активирует интерлейкин-1бета, важный медиатор воспаления. Ген, кодирующий ICE, вполне может быть отнесен к генам самоубийства человеческих клеток. При сравнении белков ICE и CED-3 найдено, что 28% их аминокислотных последовательностей идентичны, включая активные сайты, ответственные за протеазную активность белка ICE. Участие ICE в клеточной самодеструкции было убедительно показано в экспериментах с переносом гена *ice* в культуру крысиных клеток. При этом оказалось, что продукция этого белка убивает клетки.

АПОПТОЗ И НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Добавление к культуре нервной ткани фактора роста нервов (NGF) способствует переживанию клеток в культуре. Если NGF удалить, нервные клетки гибнут. Микроинъекции в культивируемые нейроны вектора, содержащего *crmA* ДНК под контролем промотора бета-актина цыпленка, обеспечивают переживание до 90% инъецированных нейронов в отсутствие NGF.

В ходе нормального развития нервной системы позвоночных около 50% и более нервных клеток могут погибнуть после того, как будут установлены синаптические связи с клетками-мишенями. Массивная гибель клеток отражает отсутствие адекватного количества специфических нейротрофических факторов, которые продуцируются клетками-мишенями и требуются для переживания нейронов. В опытах на развивающихся NGF-зависимых симпатических и чувствительных нейронах, около половины которых гибнут в ходе онтогенеза, были получены дополнительные данные о роли нейроростового фактора в регуляции апоптоза. Если перинатальных животных обработать экзогенным NGF, то нормальная гибель клеток будет в значительной степени предотвра-

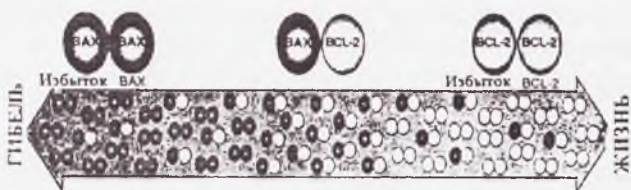


Рис. 10.4. От соотношения двух белков BCL-2 и BAX зависит жизнь или смерть клетки (цит. по: *Science*, 1994. V.263. P. 754)

шена, в то время как если их обработать антителами к NGF, почти все эти нейроны погибают.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕНОВ АПОПТОЗА

Ген *ced-9* необходим для переживания клеток только тогда, когда гены самоубийства *ced-3* и *ced-4* функционируют. Следовательно, ген *ced-9* препятствует активности генов *ced-3* и *ced-4*. Сходные взаимоотношения отмечены и между геном *bcl-2* и ICE в клетках млекопитающих. Если уровень активности *bcl-2* высок, то условий, в которых активируется ICE, не существует. Однако присутствия белка BCL-2 вовсе недостаточно, чтобы защитить клетки от гибели. Оказалось что BCL-2 взаимодействует с белком BAX. Этот продукт связывается с белком BCL-2 и как бы помогает ему защитить клетки от гибели. Если белок BCL-2 присутствует в клетке с избытком, он связывает весь BAX, и оставшиеся молекулы BCL-2 соединяются друг с другом. В этих условиях клетка выживает.

С другой стороны, если в клетке преобладает белок BAX, он связывает весь BCL-2 и за счет своей избыточности формирует также соединение BAX-BAX. В этих условиях клетка погибает (рис.10.4). Это значит, что во время индивидуального развития отношение BCL-2/BAX должно падать ко времени, когда соответствующие клетки надлежит удалить с помощью апоптоза. Например, уровень содержания BCL-2 высок в незрелых Т-лимфоцитах, но падает точно к тому моменту развития, когда поступает сигнал убить клетки.

Однако названные два гена — не единственные контролеры клеточной гибели. У “нокаутированных” мышей с отсутствием гена *bcl-2* наблюдалась избыточная гибель клеток в некоторых тканях, включая развивающиеся почки и тимус, где дифференцируются Т-лимфоциты. Однако другие ткани, в том числе нервная, развивались нормально. Это означает, что существуют и другие подобные *bcl-2*-гены, способные защитить клетки некоторых тканей от запрограммированной гибели. Один такой ген был обнаружен и

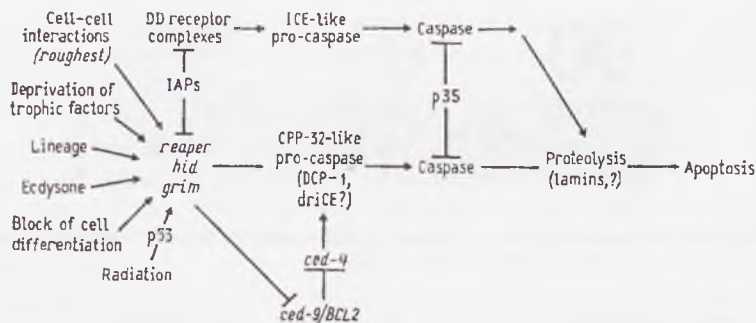


Рис. 10.5. Каспазо-каскадная модель индукции апоптоза у дрозофилы (по: *Steller, 1995; Hay et al., 1995*).

Ген дрозофилы *reaper* служит универсальным активатором апоптоза в ответ на различные индуцирующие гибель сигналы. Делеции, включающие этот ген, подавляют гибель клеток в ответ на эти сигналы. Ген *reaper* функционирует как регулятор и не является частью основного эффекторного механизма запрограммированной гибели клеток. ← — индукторы, ⊣ — ингибиторы. Каспаза — фермент с протеолитической активностью

назван *bcl-x*. Он кодирует два белка: большой длины, который защищает культивируемые лимфоциты от гибели, и короткий, который способствует их гибели. Предполагается что обе формы BCL-X-белка могут образовывать конкурирующие пары наподобие BCL-2 и BAX.

Обнаружены также другие гены и белки, участвующие в контроле апоптоза. В частности, белок p35 из бакуловируса оказывает защитное действие против программы смерти. У дрозофилы был изолирован ген *reaper* (*rpr*), который активирует апоптоз, вызванный внешними и внутренними стимулами. У эмбрионов дрозофилы *reaper* мРНК специфически локализуется в клетках, которые обречены на гибель. Начало экспрессии гена *rpr* предшествует на 1—2 часа первым морфологическим признакам апоптоза. Он кодирует небольшой полипептид из 65 аминокислот, который не имеет существенного сходства с другими известными белками. Нет информации и о его биологических функциях (рис. 10.5). Известно однако, что этот ген быстро индуцируется под влиянием X-лучей и что многие сигнальные пути апоптоза конвергируют на ген *reaper*. По-видимому, ген *reaper* является универсальным активатором апоптоза у дрозофилы и кодирует регуляторную молекулу, запускающую апоптозный цикл.

ДРУГИЕ ФАКТОРЫ, ДЕЙСТВУЮЩИЕ НА АПОПТОЗ. АПОПТОЗ И БОЛЕЗНИ

Наконец, в регуляции апоптоза участвуют также высокореактивные свободные радикалы. Кроме того известно, что BCL-2 может блокировать их формирование или эффект.

Поскольку в многоклеточных организмах гомеостаз поддерживается благодаря балансу между клеточной пролиферацией и гибелью, апоптоз играет существенную роль в патогенезе и лечении различных болезней.

Клеточная пролиферация есть процесс, регулируемый с высокой степенью точности многими факторами. Например, факторы роста и протоонкогены являются позитивными регуляторами клеточного цикла. Гены-супрессоры опухолей действует в противоположном направлении. Известны и многочисленные другие ингибиторы и индукторы апоптоза, что позволило построить гипотетическую модель регуляции генетически программированной смерти клеток. В основе этой модели лежат те схемы, которые приведены на рис. 10.1—10.5. К ним добавляется множество различных факторов, так или иначе модифицирующих эффект основных компонентов апоптозной реакции. Показано, что неспособность клеток к апоптозу может быть одним из факторов, обуславливающих патогенез различных заболеваний человека, включая рак, аутоиммунные заболевания и вирусные инфекции. Между тем многие заболевания, характеризующиеся утратой клеток (нейродегенеративные болезни, синдром иммунодефицита, остеопороз) могут быть вызваны ненормально ускоренной физиологической гибелью клеток.

Специфическая терапия, направленная на усиление или, напротив, на снижение чувствительности индивидуальных типов клеток к индукции апоптоза, является основой лечения целого ряда болезней. Ген *bcl-2* активен в большинстве человеческих фолликулярных лимфом, так что вначале он даже рассматривался как онкоген, но было найдено, что он мало способен или вообще не способен благоприятствовать клеточной пролиферации. Гиперэкспрессия гена *bcl-2* специфически предотвращает клетки от инициированного различными стимуляторами апоптоза.

Введение генов, которые ингибируют *bcl-2*, индуцирует апоптоз различных опухолевых клеток. Возможно, многие опухоли непрерывно используют *BCL-2* или продукты родственных генов для подавления клеточной гибели. В соответствии с этой гипотезой экспрессия гена *bcl-2* была признана показателем плохого прогноза в развитии рака предстательной железы, рака кишечника и нейробластомы. В разных линиях опухолевых клеток гиперэкспрессия *bcl-2* или родственного гена *bcl-x* предотвращает гибель клеток при воздействии химиотерапевтических агентов, таких как арабинозид, метатрексат, винкристин и цисплатин (рис. 10.6).

Многие хемотерапевтические агенты вызывают повреждение ДНК. Гибель клеток в ответ на эти повреждения в большинстве случаев является результатом апоптоза. Оказалось также, что для



Рис. 10.6. Гипотетическая модель регуляции гибели клеток в результате апоптоза (по: Thompson, 1995).

Основная масса гибнущих клеток удаляется посредством фагоцитоза

начальных этапов апоптоза требуется продукт гена *p53*. Клеточная гибель в ответ на повреждение ДНК может быть также предотвращена в результате высокой скорости амплификации некоторых генов в *p53*-дефицитных клетках.

Клетки, не подвергшиеся апоптозу после повреждений ДНК, могут быть более склонными к большому накоплению генетических изменений по сравнению с нормальными клетками. Имеются данные, которые подтверждают, что торможение апоптоза более важно в развитии малигнизации, чем предполагали раньше. Одно из объяснений онкогенной трансформации клеток заключается в допущении дисрегуляции генов, которые контролируют клеточное деление, таких как гены, кодирующие циклины и циклинзависимые киназы. В норме клетки “способны” регистрировать такой дисбаланс и отвечать на него апоптозом. Апоптоз, следовательно, может являться механизмом защиты организма от клеток, претерпевших генетические изменения, которые предрасполагают их к пролиферации. Например, в отсутствие других трансформирующих событий дисрегуляция *тус*-онкогена ведет к индукции апоптоза в фибробластах, культивируемых на обедненной среде. Однако одновременная гиперэкспрессия гена *bcl-2* предотвращает апоптоз.

Еще два заболевания ассоциируются с генетически программированной гибелью клеток — инфаркт миокарда и систолический удар. Эти болезни возникают как результат острого нарушения кровоснабжения (ишемия). В обоих случаях клетки внутри центрального поля ишемии быстро погибают вследствие некроза. Однако снаружи ишемического очага клетки гибнут в течение более продолжительного периода времени и обнаруживают морфологические изменения, свойственные апоптозу.

Ишемия как нейронов, так и кардиомиоцитов в культуре тканей также индуцирует апоптоз. Агенты, известные как ингибиторы апоптоза, ограничивают размеры инфаркта.

Эволюция РСД, по всей вероятности, сходна с эволюцией генетического разнообразия вообще, когда складываются молекулярно-генетические механизмы, обеспечивающие необходимый баланс пролиферации и самодеструкции клеток, который создает для организма максимальные условия развития и адаптации.

📖 Рекомендуемая литература

1. *Корочкин Л.И.* Введение в генетику развития. М.: Наука, 1999.
2. *Steller H.* Apoptosis//Science. 1995. V. 267. P. 1443—1449.

? Вопросы для повторения

1. Что такое апоптоз?
2. В чем отличие апоптоза от обычной некротической гибели клеток?
3. Какие фазы проходит апоптоз?
4. Какие гены контролируют апоптоз?
5. Какова роль нейротрофических факторов в апоптозе?
6. Как взаимодействуют гены апоптоза?
7. Какова роль апоптоза в развитии различных заболеваний?

ТКАНЕВЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

КЛЕТочНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ ГЕТЕРОГЕННЫ

Каждая клеточная популяция неоднородна уже в силу того, что входящие в нее элементы находятся в различном функциональном состоянии, различных фазах клеточного цикла, различных стадиях дифференцировки или дегенерации и т.д. Существенное значение для развития имеют те виды гетерогенности в клеточных популяциях, которые обусловлены генетическими факторами. К таковым относятся соматический кроссинговер, соматические мутации, эффект положения, дифференциальная активность генов (аллельных или не-аллельных) и т.д. Их действие ведет к возникновению мозаичной конструкции той или иной закладки из клеток, хотя и близких в морфологическом и функциональном отношении, но тем не менее не идентичных в смысле функциональной организации их генома.

Различные случаи мозаицизма можно подразделить на две большие группы:

- *структурно-генетический мозаицизм*, когда вариабельность проявления гена в данной ткани определяется структурными изменениями в геноме;
- *функционально-генетический мозаицизм*, обусловленный дифференциальной инактивацией гомологичных локусов (а также не-аллельных генов).

ЧТО ТАКОЕ СТРУКТУРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОЗАИЦИЗМ?

Сюда относится *химеризм*, обусловленный у млекопитающих участием полярного тельца в формировании эмбриона или слиянием двух разных зигот. В первом случае мозаики могут быть типа $1n/2n$, $2n/2n$, $2n/3n$ в зависимости от условий оплодотворения. Диплоидно-триплоидные мозаики найдены у человека, кошки и др. У пчелы известны мозаики, возникающие в результате особенностей слияния пронуклеусов. Предполагается два варианта их происхождения: 1) деление материнского ядра перед оплодотворением и слияние ядра спермия с одним из ядер; 2) проникновение в яйцо двух спермиев, ядро одного из них сливается с мате-

Рис. 11.1. Формирование мозаицизма у мух.

А — получение мозаичных мух посредством оплодотворения гамет, несущих нестабильную кольцевую X-хромосому. Если эта хромосома утрачивается в одной из двух клеток, образующихся в результате митотического деления, тело мухи будет состоять из "самцовой" части (XO-клетки) и "самочной" части (XX-клетки). В самцовой части будут экспрессироваться все мутации, содержащиеся в X-хромосоме. Б — эффект ориентации митотического веретена на формирование мозаицизма у мух



ринским, а второй реплицируется без слияния и участвует в дальнейшем развитии. У дрозофилы и шелкопряда обнаружены редкие случаи двойного оплодотворения. Наконец, у *D. melanogaster* (как и ряда других насекомых) давно известен **гинандроморфизм**, обусловленный элиминацией нестабильной кольцевой X_R -хромосомы в первом митозе дробления развивающегося яйца линии с $X_N X_R$.

Дж.Хотта и С.Бензер

использовали это обстоятельство для составления карты морфогенетических зачатков в бластодерме дрозофилы. Известно, что нестабильная кольцевая X-хромосома элиминируется при первом делении дробления. В результате формируются два клона клеток — с одной X-хромосомой ($X_N O$) и с двумя ($X_N X_R$). В частях эмбриона $X_N X_R$, где кольцевая хромосома несет нормальные аллели мутантных генов, локализованных в нормальной X-хромосоме (X_N), рецессивные мутации не проявляются, тогда как в мозаичных частях $X_N O$ они проявляются (Бензер использовал гены, контролирующие окраску глаз, кутикулы, форму щетинок и некоторые особенности поведения). Распределение нормальных и мутантных полей у взрослой мухи может быть различным и зависит от распределения соответствующих клеток в формирующейся бластодерме. Это распределение детерминируется на самых ранних стадиях развития (рис. 11.1). У дрозофилы первые девять делений ядра происходят в синцитиеподобных образованиях без формирования

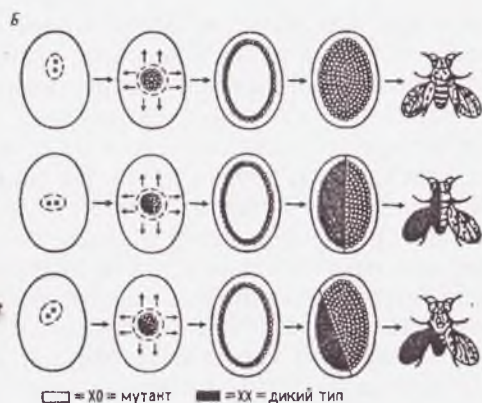




Рис. 11.2. А.Стертевант. Выдающийся американский генетик, сотрудник Т.Моргана. Один из создателей современной генетики

Детально разрабатывал генетику дрозофилы. Открыл новый, генетический принцип составления морфогенетических карт у этого объекта

клеточных мембран. Затем ядра мигрируют к поверхности яйца, где претерпевают еще три деления, возникают клеточные мембраны, формируется бластодерма. Как отмечалось, после первого деления развивается два клон клеток — $X_N X_R$ и $X_N 0$, каждый из которых в идеальных условиях должен занимать примерно половину бластодермы. Од-

нако при наличии случайного перемешивания ядер, имеющего место во время первых делений, границы между нормальными и мутантными зонами могут варьировать.

Вероятность перемешивания ядер в участках бластодермы, соответствующих закладкам разных органов, тем меньше, чем больше они удалены друг от друга. На основании частоты отклонений распределения мутантных пятен от идеального случая Бензер составил примерную карту расположения соответствующих закладок друг относительно друга на поверхности яйца. Этот метод был разработан выдающимся американским генетиком А.Стертевантом (рис. 11.2). В 1929 г. он предложил использовать для составления мозаичной карты бластодермы тот же принцип, что и для картирования генов на хромосоме путем определения частоты рекомбинации, которая является функцией расстояния между ними. Стертевант изучил около 400 мозаиков, но не обработал полученные данные. Через 40 лет по ним была составлена карта распределения различных зачатков в бластодерме — клеточной массе, которая дает начало зародышу мухи (рис. 11.3). С.Бензер изучил еще 700 мозаичных особей и определил в условных единицах расстояние между различными зачатками на карте бластодермы. Он ввел единицу этого расстояния, которую назвал в память Стертеванта “стертом” (*один стерт* — это расстояние, эквивалентное возможности, что в 1% случаев среди всех изученных мозаичных мух две структуры будут иметь различный генотип).

Вот пример расчета расстояния между двумя внешними маркерами по этому принципу — кутикулой ноги и антеннами. Из 100 изученных мозаиков у 25 генотип кутикулы ноги и антенн был разным: у 12 был нормальный генотип кутикулы ноги и мутантный — генотип антенн, у 13, наоборот, был мутантный генотип ноги и нормальный генотип антенн, т.е. процентное содержание

мух, у которых эти две структуры имели разный генотип, составило 25%. Это означает, что расстояние зачатковой ноги от зачатковых антенн составляет 25 стертов.

Зная расстояние третьего внешнего маркера от ноги и антенн, можно найти его местоположение на карте с помощью простого геометрического построения. Для него возможны два местоположения, выбор между которыми требует картирования по отношению к добавочному маркеру. При использовании данной системы в решении той или иной проблемы вводят с помощью кроссинговера рецессивный ген, ответственный, например, за какой-либо поведенческий признак, в обычную (некольтцевую) X-хромосому, маркированную другими рецессивными генами, которые детерминируют белую окраску глаз, желтую окраску тела или появление раздвоенных щетинок и т.д. В XX-частях тела взрослой мухи эти рецессивные гены не проявляются, поскольку доминируют их нормальные аллели второй X-хромосомы, но в X0 частях тела эти мутантные гены проявятся, так как будут находиться в гемизиготе. Следовательно, при рассмотрении такой мухи можно заметить мутантные участки тела и среди полученных гинандроморфов отобрать тех, которые нужны для дальнейших исследований. Более того, можно, как отмечалось, конструировать двухмерные карты участков бластодермы, дающие начало различным частям тела. Карты позволяют связывать отклонения от нормального поведения с различными анатомическими структурами.

Примером построения такой карты служит локализация места действия сцепленного с полом гена дрозофилы *hyperkinetic* (Hk). Гомозиготные по данному гену самки, а также гомозиготные самцы беспорядочно подергивают лапками под влиянием эфирного наркоза. Всего было получено 600 мозаичных мух, у которых "мужские" участки поверхности тела отличались от участков с женским генотипом по цвету тела, глаз и форме щетинок. На этих животных действовали эфиром и изучали аномальные движения конечностей. Оказалось, беспорядочное подергивание каждой лапки осуществляется независимо от других лапок, причем наблюдается соответствие между движением той или иной лапки и генотипом ее кутикулы (покрова насекомых).

Обнаружены три отдельных очага, т.е. те структуры, которые, будучи затронутыми действием мутантного гена, вызывают у мухи аномальное поведение. Каждый такой очаг соответствует одной ножке на той или иной стороне тела мухи. Все очаги расположены в той области бластодермы, из которой формируется вентральная (брюшная) нервная цепочка. Получены электрофизиологические данные о ненормальности функционирования торакального (грудного) ганглия у мутантов *Hk*. Действие этого гена осуществляется автономно, так что правая и левая стороны каждого торакального

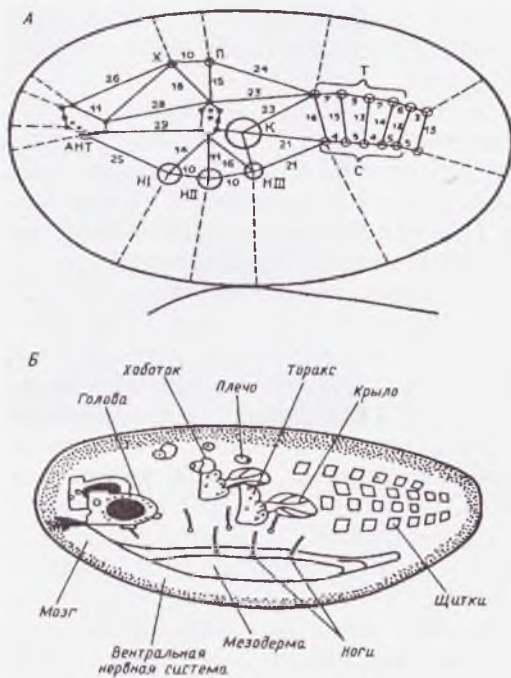


Рис. 11.3. Карта зачатков бластодермы *D. melanogaster* (по: Hotta, Benzer, 1973).

А — показано расположение клеток, которые затем разовьются в органы взрослого насекомого. Расстояния выражены в основных единицах стерх (от фамилии Стертевант) — процентах мозиков, захватывающих соответствующие структуры. Пунктир — расстояние до ближайшей средней линии. Карта показана как бы изнутри бластодермы. Сокращения: АНТ — антенны; Х — хоботок; НІ, НІІ, НІІІ — первая, вторая и третья ноги; К — крыло; П — плечо; Н — нотум; Т — тергиты; С — стерниты, или брюшные щитки. Б — та же карта, изображенная в более "реалистической" манере (по: Инге-Вечтамов, 1989)

ганглия функционируют независимо друг от друга и активность отдельных мотонейронов в про-, мезо- и метоторакальных отделах торакального ганглия автономна. Можно, следовательно, определить

местоположение различных частей зачатка торакального ганглия на карте бластодермы.

Таким образом, использованный метод в какой-то степени сходен с классическим методом составления генетических карт на основе подсчета частот рекомбинации. Разница заключается в том, что морфогенетические карты имеют два измерения. Работы Бензера с сотрудниками — яркий пример успешного использования генетических методов для решения экспериментально-эмбриологических проблем.

ЧТО ТАКОЕ СОМАТИЧЕСКИЙ МОЗАИЦИЗМ?

Наряду с мозаицизмом, сопровождающим гинандроморфизм, достаточно часто встречается мозаицизм, обусловленный *соматическими мутациями*. В соматических клетках возникают те же виды мутаций, что и в герминативных, никакой специфики они в этом отношении не представляют. Порядок величин, характеризующих темп мутационного процесса в соматических клетках *in vitro*, а в половых *in vivo*, сходен. В результате деления мутировавшей клетки может сформироваться клон клеток, несущих соответствующий признак. Они могут так или иначе изменить ход морфогенеза. Чем раньше в развитии произойдет соматичес-

Рис. 11.4. Схема раннего возникновения соматического мозаицизма у мыши (по: Stern, 1968).

Вверху — мышь, гомозиготная по не-агути (a/a), мозаичная вследствие наличия агути-подобного пятна (A^L/a). Яичник также мозаичен, как показано пунктирной линией в верхней части задней конечности. Внизу — оплодотворенное яйцо и две эмбриональные стадии в разрезе. Предполагается, что мутация $a \rightarrow A^L$ происходит в одном ядре бластомеры (середина) и что потомство этой клетки включается в зародышевый путь (справа).



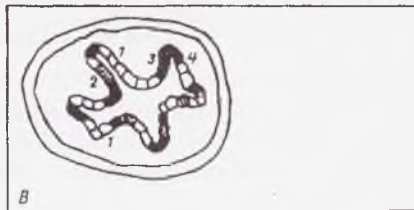
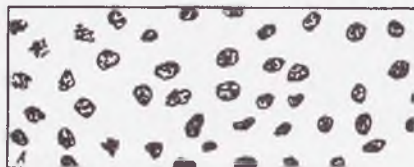
кая мутация, тем большее выражение найдет она в фенотипе. В результате последний, как правило, приобретает черты мозаичности.

Хорошо изученным примером такой мутации является мозаицизм у самки мыши, гомозиготной по рецессивному гену окраски не-агути — a/a . У мозаика на теле наблюдается пятно агути, что свидетельствует о соматической мутации $a \rightarrow A^L$ (рис. 11.4). Потомство мутировавшей клетки входит в волосяные фолликулы определенной области тела и обуславливает окраску агути. Интересно, что соматические мутации, имеющие место в период раннего эмбриогенеза, могут затронуть клетки, которые дают начало и герминативным, и соматическим тканям.

Отчетливый мозаицизм в распределении клеток с различиями в наборе половых хромосом обнаружен в тканях плодов человека (рис. 11.5). Возникновение мозаичного кариотипа вследствие особенностей поведения так называемых добавочных хромосом (вариации их количества) описано у серебристо-черных

Рис. 11.5. Распределение клеток с половым хроматином в мозаичных (XY/XXY) эмбрионах человека (по: Stern, 1968).

А — участок эпителия амниона: в левой половине — ядра с половым хроматином, в правой — без полового хроматина. Б — поперечный срез пищевода. В — схема распределения клеток с половым хроматином в эпителиальном слое пищевода: 1 — 0-9%; 2 — 10-19%; 3 — 20-29%; 4 — > 30%



лисиц. При этом все ткани одного животного имеют сходный характер распределения хромосомных чисел. Если животные имеют мозаичный кариотип, то характер вариаций в числе добавочных хромосом одинаков в разных тканях. При стабильном кариотипе все ткани характеризуются одним и тем же числом хромосом.

ЧТО ТАКОЕ СОМАТИЧЕСКИЙ КРОССИНГОВЕР?

Следующее событие, ведущее к мозаицизму, — *соматический кроссинговер*. Впервые он был продемонстрирован у дрозофилы. В случае соматического кроссинговера самки, гетерозиготные по рецессивным генам *yellow* (y — желтый цвет) и *singed* (sn — изогнутые щетинки) — ysn/y^+sn^+ , имеют на черном теле с нормальными щетинками пятна желтого цвета с изогнутыми щетинками.

Соматический кроссинговер описан также у мыши. Его обнаружили у гетерозигот $W^v/+$, среди которых были мозаики с полями, окрашенными как $+/+$, и частью гонад W^v/W^v . Очевидно, в данном случае соматический кроссинговер произошел достаточно рано в эмбриогенезе, затронув клетки, дающие начало не только соматическим, но и герминативным тканям.

Известны случаи, когда соматический кроссинговер происходит в клетках, дающих начало герминативным тканям. В качестве маркерных были использованы гены из группы сцепления *Caracul* (Ca , вибриссы, искривленные и волоски волнистые) и *belted* (bt , белое брюхо), расстояние между которыми 12 единиц рекомбинации. В потомстве от скрещиваний

$$\frac{Ca+}{+bt} \times \frac{+bt}{+bt}$$

обнаружено два самца, которые при скрещивании ведут себя как

гомозиготы Ca/Ca , причем один из них — как $\frac{Ca+}{Ca\ bt}$. Это можно

объяснить, предположив следующий порядок расположения генов в хромосоме:

$$\frac{Ca + \text{центромера}}{+bt \text{ центромера}}$$

Тогда соматический кроссинговер между Ca и bt дает начало клеткам:

$$\frac{Ca + \text{центромера}}{Ca\ bt \text{ центромера}} \quad \text{и} \quad \frac{+bt \text{ центромера}}{++ \text{ центромера}}$$

Соматический кроссинговер между *bt* и центромерой дает в результате:

$$\frac{Ca + \text{центромера}}{Ca + \text{центромера}} \text{ и } \frac{+bt - \text{центромера}}{+bt - \text{центромера}}$$

ЧТО ТАКОЕ ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ МОЗАИЧНОГО ТИПА?

Промежуточное положение между двумя видами мозаицизма занимает *эффект положения мозаичного типа*. Такое название получил феномен подавления действия гена, вызванный хромосомной перестройкой в *цис*-положении к аллелю соответствующего гена. Подавление это имеет место, когда ген переносится близко к гетерохроматиновому участку. Пример такого эффекта обнаружен у дрозофилы с транслокацией сегмента *X*-хромосомы с нормальным аллелем локуса *white* (*w* — белые глаза) на четвертую хромосому (обозначим такой генотип как $R(w^+)$). У мух $R(w^+)/w$ или $R(w^+)/R(w^+)$ глаза мозаичны: одни клетки дикого типа, другие — белые. Этот эффект не наблюдается у мух $R(w^+)/(w^+)$ и $R(w)/(w^+)$. Таким образом, мозаичный эффект наблюдается в случае, когда перестройка гетерозиготна по мутантному аллелю (*w*) или гомозиготна по этой перестройке.

Изменения в родительской соматической клетке, вызванные эффектом положения, наследуются в ряду клеточных поколений, что ведет к образованию участка фенотипически мутантной ткани. Предполагается, что инактивация генов при эффекте положения мозаичного типа осуществляется на уровне хромосом и связана с запаздыванием репликации в близких к хроматину участках.

Мозаицизм в случае эффекта положения не обусловлен соматической мутацией, поскольку:

- известен антагонистический эффект *Y*-хромосомы на выражение мозаичности у дрозофилы;
- при низкой температуре количество белых клеток в мозаичном глазу значительно увеличивается; температурочувствителен период окукливания, когда откладывается пигмент, а не первый личиночный период, когда детерминируются пигментные потенции закладки глаза;
- у особей, обнаруживающих эффект положения мозаичного типа, не выявляются соответствующие мутации в зародышевых клетках;
- при биохимическом анализе мозаичных глаз определены избыточные количества веществ метаболического пути птерицинов, которые играют важную роль в образовании пигментов глаз у особей дикого типа; у мутантных мух таких явлений не наблюдается.

Эффект положения мозаичного типа сопровождается задержкой репликации и снижением уровня транскрипции.

ЧТО ТАКОЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОЗАИЦИЗМ?

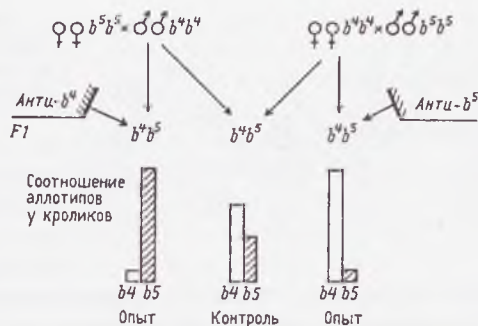
Наиболее известный случай такого мозаицизма проистекает из гетерогенности клеточных популяций, связанной с феноменом лайонизации, инактивации одной из двух X-хромосом у самок. Наряду с цитологическими и генетическими данными получены биохимические свидетельства такой инактивации и продемонстрирована ее роль в формировании молекулярного фенотипа тканей. Так, Р.Дэвидсон (R.Davidson) выращивал клоны из отдельных фибробластов, гетерозиготных (АВ) по изоферментам глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Гл-6-ФДГ), ген которой локализован в X-хромосоме. В более чем 50 исследованных клонах обнаружилась только одна полоса (А или В), в противоположность АВ-фенотипу смешанных культур. С помощью биохимических и гистохимических методов у гетерозигот по Гл-6-ФДГ-недостаточности были выделены две популяции эритроцитов — с высокой и низкой (близкой к нулю) активностью фермента.

Известны также случаи мозаицизма в проявлении патологических признаков, сцепленных с полом у человека. В частности, у гетерозигот по эктодермальной дисплазии (болезнь кожи) имеются пятна нормальной и патологически измененной кожи, гетерозиготы по альбинизму имеют пятнистое глазное дно. Подобные явления отмечены и при ряде других заболеваний, например при цветовой слепоте, сцепленной с полом гипохромной анемии (нарушении клеток эритроидного ряда), гемофилии (несвертываемости крови). В случае мышечной дистрофии типа Дюшена обнаружено, что у гетерозигот по этому дефекту псевдодистрофические измененные мышечные волокна чередуются с нормальными.

При культивировании лимфоцитов от пациентов, несущих в X-хромосоме ген агаммаглобулинемии, выявлено, что лимфоциты мужчин неспособны дифференцироваться в продуцирующие антитела плазматические клетки. Синтез гамма-глобулинов отсутствовал. При культивировании лимфоцитов женщин, гетерозиготных по данному признаку, выявлялось две популяции клеток: дифференцирующиеся в плазматические клетки и синтезирующие гамма-глобулины и неспособные к такой дифференцировке и синтезу.

Примером мозаичного проявления в гетерозиготе признаков, контролируемых аутосомами, служит феномен аллельного исключения. Как уже отмечалось, вследствие существования этого феномена лимфоидная ткань животных, гетерозиготных по тому или

Рис. 11.6 Схема опытов Дрея по супрессии аллотипов легких цепей иммуноглобулинов у b^4b^5 -гетерозиготных кроликов (по: Баранов, Кочочкин, 1973)



иному локусу иммуноглобулинов (ИГ), представлена двумя, вероятно, конкурентно развивающимися популяциями клеток. Вполне допустимо, что эти популяции подвергаются селективному воздействию со стороны некоторых факторов, результатом чего могут быть изменения в пропорциях клеток с разными аллотипами. Подобным образом естественнее всего объяснить наличие варьирующих количественных соотношений сывороточных ИГ разной аллотипической принадлежности у гетерозигот.

Экспериментально установленным фактором селективного воздействия на лимфоидную ткань является способность антител, специфических к аллотипам, подавлять синтез соответствующих ИГ. Супрессия аллотипов была вызвана у кроликов путем воздействия на них в фетальный и неонатальный периоды жизни антителами к аллотипу, наследуемому от отца (отцовскому аллотипу). Суть этих опытов по экспериментальному изменению количественного выражения аллотипов легких цепей ИГ состоит в следующем. В результате реципрокного скрещивания гомозиготных b^4b^4 - и b^5b^5 - кроликов получили F_1 -гетерозиготное потомство b^4b^5 (рис. 11.6). Еще до скрещивания крольчих иммунизировали ИГ с отцовским аллотипом, т.е. матерей генотипа b^4b^4 иммунизировали b^5 , а матерей b^5b^5 — b^4 . Поскольку плацентарный барьер проницаем для гаммаглобулинов, синтезируемые в организме матери антитела воздействовали на плод, вызывая у него сохраняющуюся на протяжении постнатальной жизни супрессию отцовского аллотипа. Общая концентрация гамма-G-глобулинов не претерпела при этом существенных изменений, так как компенсаторно усиливался синтез материнского аллотипа.

Для объяснения механизма супрессии можно предложить две гипотезы (рис. 11.7). Согласно первой, фиксация антител на поверхности уже компетентных к синтезу соответствующего аллотипа иммуноцитов обуславливает цитотоксический эффект и гибель клеток. В результате преимущество в конкурентном развитии приобретает клон клеток с альтернативным аллотипом (рис. 11.7, А). Реально допустить, что инактивация лимфоидных клеток антителами происходит по аналогии с механизмом становления иммунологической толерантности.



Рис. 11.7. Две гипотезы (А и Б) о механизме супрессивного действия антиаллотипических антител (по: Баранов, Корочкин, 1973)

Вторая гипотеза предполагает, что все иммуноциты до момента специфической антигенной стимуляции находятся в покоящемся состоянии, но

потенциально способны продуцировать оба аллотипа. Антитела, блокируя на клеточной поверхности один из двух аллотипических рецепторов, коммитируют иммуноциты к синтезу альтернативного аллотипа (рис. 11.7, Б). В соответствии с этой гипотезой, допускающей влияние антиаллотипических антител на ход дифференцировки иммуноцитов, клетки не гибнут и не происходит их замещения.

Таким образом, для осуществления супрессивного действия антител, по-видимому, как минимум необходимо: 1) существование клонирования клеток в соответствии с дифференциальной активностью их аллельных или не-аллельных генов и 2) присутствие на поверхности клеток антигенных детерминант белков — рецепторов антител.

Следовательно, гетерогенность клеточных популяций есть та основа, на которой становится возможным проявление дифференциальной активности генов на тканевом уровне.

При использовании биохимического маркера различия между клеточным и тканевым уровнями дифференцировки могут быть проиллюстрированы следующей схемой (рис. 11.8). Пусть имеется два электрофоретических варианта какого-нибудь белка: A_1 — быстрый и A_2 — медленный, — контролируемые парой аллельных генов. В таком случае биохимическим признакам обычно свойствен-

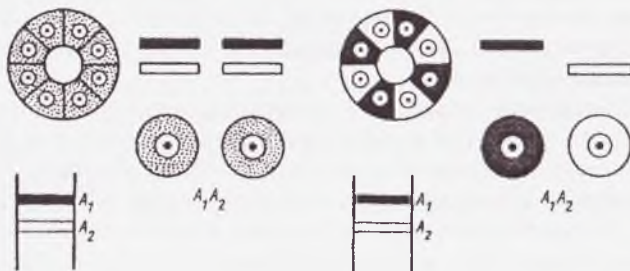


Рис. 11.8. Схема клеточного (слева) и тканевого (справа) уровня выражения биохимических признаков (по: Корочкин, 1977). Объяснение в тексте

но кодоминантное выражение в фенотипе соответствующего органа или ткани гетерозиготных особей, что может объясняться простым фактом способности каждой клетки к синтезу обоих вариантов. Это — *клеточный уровень*. Однако допустима и вторая возможность: существуют клетки, способные синтезировать только белок A_1 , и клетки способные синтезировать только белок A_2 . В результате их пролиферации формируются соответствующие клеточные клоны, так что на уровне данного органа или ткани проявление признака является также кодоминантным. Это — *тканевый уровень*. Однако в каждой отдельной клетке один из признаков доминирует (доминирование на клеточном уровне, кодоминирование — на тканевом).

Следовательно, наличие сложных межклеточных взаимоотношений, конкуренции между клеточными клонами, избирательной пролиферации одних групп клеток и гибели других позволяют предположить, что в некоторых случаях тканевый уровень может служить базой для доминантного или рецессивного проявления того или иного гена. Ген ведет себя как доминантный, когда группы и клоны клеток, содержащие в активном функциональном состоянии один из гомологичных локусов (A) и в заторможенном — другой (a), имеют определенное селективное преимущество и в связи с этим преобладают в данной клеточной популяции. Соответственно клетки с активным a -локусом и инактивированным A -локусом плохо пролиферируют и (или) вытесняются из популяции, в результате чего ген a проявляется в фенотипе как рецессивный.

ЧТО ТАКОЕ ХИМЕРНЫЕ (АЛЛОФЕННЫЕ) МЫШИ?

Своеобразная методика для изучения взаимоотношений генетически различных клеточных популяции в развитии была предложена польским эмбриологом А.Тарковским, английским генетиком Э.Мак-Ларен и американским генетиком Б.Минц. Суть метода заключается в искусственном комбинировании blastomerov от зародышей с разными генотипами. Таким способом получают генетических мозаиков, у которых можно анализировать особенности распределения мозаичных пятен и строить схему поведения различных клеточных клонов, которые формируют данную ткань или орган в онтогенезе (рис. 11.9). Поскольку в ходе развития химерных эмбрионов происходит перемешивание клеточного материала, вероятность попадания клеток обоих генотипов в ту или иную закладку зависит от того, какое количество клеток является родоначальником данной закладки. Естественно, если это одна клетка, то мозаиков по данному признаку вообще не будет зарегистрировано, если две — то половина может обнаружить

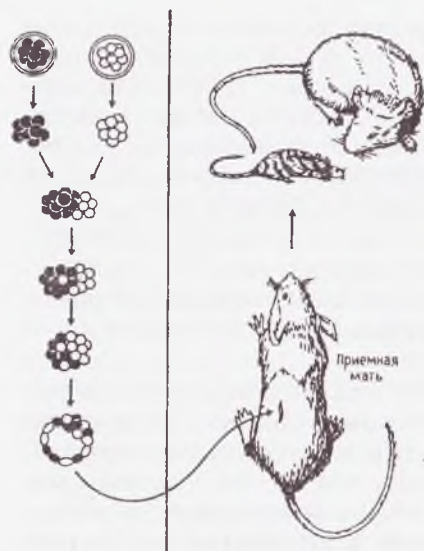


Рис. 11.9. Схема получения аллофенных мышей с полосатой окраской (по: Мак-Ларен, 1973)

признаки мозаичности и т. д. Таким образом, если, например, у $1/16$ химерных животных исследуемая закладка не будет проявлять мозаицизм по маркерному признаку, то можно заключить, что данная закладка развивается из 5 клеток-предшественниц, которые представлены клетками обоих генотипов в разной пропорции у разных особей. Это следует из того, что $1/16$ — вероятность случайного сочетания 5 клеток одного происхождения из

одной закладки органа ($1/16 = 2 \times 1/2^3$). При этом допускается, что: клетки-предшественницы пролиферируют с одинаковой скоростью и клеточная селекция отсутствует.

Многочисленные исследования такого рода позволили составить представление о количестве клеток и соответствующих клонов, дающих начало тому или иному органу. Так, система пигментных клеток мыши развивается из 34 генетически детерминированных примордиальных меланобластов нервного гребня, волосяные фолликулы состоят из 150—200 клонов, берущих начало из сомитов, фоторецепторные клетки сетчатки формируются в обоих глазах из 20 клонов, репродуктивные клетки — из 2—9. Многие другие ткани, исследованные у химерных мышей, возникают из определенного количества клонов, по крайней мере превышающего два, — клетки печени, почек, мозга, эритроцитов, гамма-глобулин-продуцирующих клеток и т.д. Отдельный сомит не является клоном, но возникает по крайней мере из двух клеток-инициаторов. Каждый миотом, дающий начало индивидуальной мышце глаза, также не является клоном, а формируется из 2—5 клеток-предшественниц. Проксимальные каналы почек происходят из 4—5 клеток.

Типичным примером подобных экспериментов является определение количества клеток-инициаторов в сетчатке посредством анализа химерных мышей, полученных слиянием бластомеров зародышей животных с нормальным зрением (+/+) и животных с дегенерацией сетчатки (*rd/rd*), у которых зрительные клетки дифференцируются в эмбриогенезе и дегенерируют в постнатальном периоде. Локализация полей регенерации у химер была использо-

Рис. 11.10. Клональная природа фоторецепторного слоя сетчатки мыши (по: Mintz, 1971).

Рисунок сделан на основе двумерной реконструкции серийных гистологических срезов сетчатки аллофенных (химерных) мышей с примерно равным количеством нормальных (+/+) и rd/rd (дегенерация сетчатки) клеток. В ходе развития клетки rd/rd гибнут, в результате чего формируются "нулевые" поля (показаны черным), на чем основывается клональное картирование. Из полученных результатов следует, что сетчатка развивается из 10 клеток-инициаторов, которые, радиально пролиферируя, формируют соответствующие поля



вана для клонального картирования. Результаты исследования свидетельствуют о том, что сетчатка каждого глаза возникает из 10 иницирующих клоны клеток (рис. 11.10).

В действительности, однако, морфогенез у химерных мышей протекает сложнее и сопровождается многообразными перемещениями клеточных масс, а также конкуренцией клеточных клонов, а в ряде случаев тканеспецифической селективной пролиферацией некоторых из них. Например, у аллофенных мышей СЗН ↔ AKR клетки типа СЗН преобладают в печени, обуславливая развитие там СЗН-гепатом, в то время как высоколейкемичные клетки AKR образуют клетки крови, в результате чего животные заболевают типичной AKR-лейкемией. Клеточная селекция была показана при исследовании развития волос у химерных мышей +/+ ↔ Gs/Gs (greasy-сцепленная с полом полудоминантная мутация, влияющая на морфологию и окраску волосков). Обнаруженное при этом сходство фенотипа волоса аллофенных мышей Gs ↔ + и обычных гетерозигот Gs/+ свидетельствует в пользу активности в клетках лишь одной X-хромосомы.

ЧТО ТАКОЕ КЛЕТОЧНЫЕ АНСАМБЛИ?

Своеобразные особенности реализации дифференциальной активности генов на тканевом уровне можно отметить при формировании в онтогенезе клеточных ансамблей. В этом случае для специфического развития данной клетки существенна активность не только ее собственных генов, но и генов соседних клеток. Особенно отчетливо это проявляется в ходе дифференцировки клеточных систем в иммунокомпетентной и нервной ткани.

Действительно, синтез антител осуществляется плазматическими клетками в тесном взаимодействии с другими клетками, в каждой из которых должна дифференциально функционировать специфическая, но необходимая для обеспечения этого синтеза система генов (рис. 11.11). Клетка соединительной ткани, макрофаг, опознает антиген и выделяет специальный стимулятор Т-лимфоцитов (лимфоцитов, созревших в тимусе) — интерлейкин-1. В



Рис. 11.11. Генетический контроль биосинтеза антител (по: Фримель, Брок, 1986).

Ag — антиген; В — В-лимфоцит; ФРСВ — фактор репликации и созревания В-клеток; Ig — иммунный ответ; Мφ — макрофаг; T_h — Т-хелпер; T_{инд} — Т-хелпер-индуктор; Ил-1 — интерлейкин 1; Ил-2 — интерлейкин 2

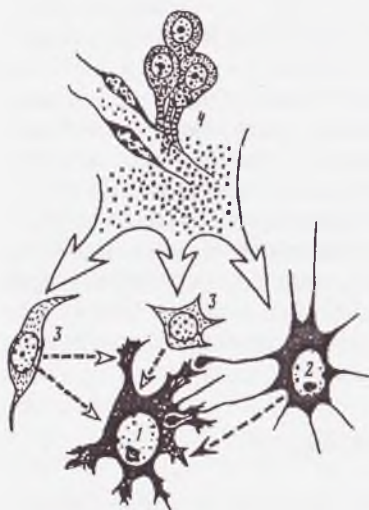


Рис. 11.12. Иерархия генетических систем, контролирующих процессы нейрогенеза (по: Корочкин, 1989).

1 — генетические системы, действующие внутри самого дифференцирующегося в определенном направлении нейрона. 2, 3 — генетические системы, действующие внутри других нейронов и обнаруживающие свое влияние на его дифференцировку через влияние этих тканей и образуемых в них продуктов (включая нейроростовые факторы). 4 — генетические системы, действующие в эндокринных и нейроэндокринных органах и осуществляющие свое воздействие на дифференцировку нейронов на организменном уровне через влияние различных гормонов и других веществ, проявляющих свою активность на уровне целого организма

последних начинают функционировать гены иммунного ответа (IR-гены). Они выделяют интерлейкин-2, активирующий второй Т-лимфоцит — Т-лимфоцит-хелпер (помощник). В Т-хелпере активируются гены, ответственные за синтез фактора репликации и созревания В-лимфоцитов, “производимых” в лимфатических узлах. В них включаются гены, ответственные за синтез иммуноглобулинов, и они дифференцируются в плазматические клетки, “производители” антител.

Не менее увлекательная картина сопровождает дифференцировку нервных клеток. Для приобретения той или иной нервной клеткой ее специфических особенностей необходима активность не только ее собственных генов, но и генов смежных нейронов (а также и “удаленных” нервных клеток, отростки которых ее достигают), поскольку как морфология, так порой и химизм данной клетки зависят от синаптических контактов с соседними нейронами. Существенную роль в развитии нейрона играют и примыка-

ющие к нему глиальные клетки (следовательно, и дифференциально активные в них гены), которые играют в нервной системе трофическую и дренажную роль. Наконец, на дифференцировку нейронов влияют и генетические системы, действующие в эндокринных и нейроэндокринных органах (а это уже, можно сказать, — организменный уровень регуляции!), которые осуществляют свое влияние с помощью гормонов и других веществ, проявляющих свою активность на уровне целого организма (рис. 11.12).

В целом, гетерогенность клеточных популяций, формирующих тот или иной орган или ткань, по особенностям дифференциального выражения генов (обычно не-аллельных, но иногда и аллельных), как в различных типах клеток, так и в клетках одного типа, складывается, по-видимому, довольно рано в эмбриогенезе. Последующие формообразовательные события протекают на основе сложных взаимоотношений соответствующих клеточных систем.

Таким образом, на дифференцировке соответствующих клеток сказывается функциональное состояние не только их собственного генома, но и генома окружающих клеточных и тканевых агрегатов, влияющих на характер дифференцировки, их рост и пролиферацию.

Рекомендуемая литература

1. *Вахтин Ю.Б.* Генетическая теория клеточных популяций. Л.: Наука, 1980.
2. *Галактионов В.Г.* Иммунология. М.: Изд-во МГУ, 1998.
3. *Гилберт С.* Биология развития: В 3 т. М.: Мир, 1993—1995.
4. *Корочкин Л.И.* Взаимодействие генов в развитии. М.: Наука, 1977.
5. *Корочкин Л.И., Михайлов А.Т.* Введение в нейрогенетику. М.: Наука, 2000.
6. *Мак-Ларен Э.* Химеры млекопитающих. М.: Мир, 1979.
7. *Фримель Х., Брок Ст.* Основы иммунологии. М.: Мир, 1986.

Вопросы для повторения

1. Что такое структурно-генетический мозаицизм?
2. Что такое соматический мозаицизм?
3. Что такое соматический кроссингвер?
4. Что такое эффект положения мозаичного типа?
5. Что такое функционально-генетический мозаицизм?
6. Что такое аллофенные животные?
7. Что такое клеточные ансамбли?
8. Что такое тканевой уровень регуляции экспрессии генов?

ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПОЛА И ЕЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

ЧТО ТАКОЕ ПОЛОВЫЕ ХРОМОСОМЫ?

Генетическая детерминация пола была показана еще на заре развития генетики, когда открытие различий в хромосомных наборах самцов (XU) и самок (XX) позволило сформулировать простое решение проблемы определения пола. Как оказалось, все зрелые яйца самок обладают одной X -хромосомой (вместе с набором аутосом), а спермии самцов бывают двух родов: один — с X -хромосомой, другой — с Y -хромосомой. Оплодотворение яйца X -спермием приводит к образованию зиготы XX , которая развивается в самку, а оплодотворение яйца Y -спермием порождает зиготу XU , из которой развивается самец (рис. 12.1).

Выделяют несколько типов определения пола в зависимости от числа и состава половых хромосом. Например, у самца могут быть X - и Y -хромосомы, а у самки — только XX . К такому типу относятся млекопитающие, человек, дрозофила, водяной клоп *Ligaeus*, по имени которого назван данный тип определения пола. Другой тип, названный по имени другого водяного клопа, *Protenor*, встречается у некоторых бабочек и червей и связан с наличием у самцов XU -хромосом, а у самок — двух X -хромосом.

Еще один тип хромосомного определения пола найден у птиц, некоторых бабочек, земноводных и цветковых растений. У них гетерогаметным (т.е. с разными половыми хромосомами) полом является женский. Самки имеют набор половых хромосом ZW или ZO , а самцы — ZZ .

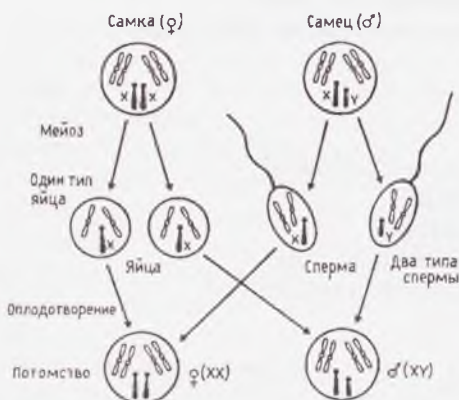


Рис. 12.1. Детерминация пола половыми хромосомами

БАЛАНСОВАЯ ТЕОРИЯ К.БРИДЖЕСА

Предлагались различные теории определения пола, из которых наиболее популярной была балансовая теория, основанная на открытии американского генетика К.Бриджеса, который нашел в 1921 г. несколько самок дрозофил, имевших триплоидный набор хромосом: $3X + 3A$ (три набора X -хромосом и три набора аутосом). В результате скрещивания этих самок с нормальными самцами ($XY + 2A$) в потомстве среди нормальных самок и самцов попадались особи с промежуточным, необычным проявлением половых признаков. Все потомство распалось на 8 классов в зависимости от состояния половых хромосом и аутосом.

- 1) $3X : 3A$ — триплоидная самка.
- 2) $2X : 2A$ — диплоидная самка.
- 3) $(2X + Y) : 2A$ — самка.

В этих трех случаях отношение числа X -хромосом к числу аутосом составляет единицу. Наличие мужской Y -хромосомы не влияет на нормальное развитие самки.

- 4) Особи, имеющие хромосомную конституцию $XY : 2A$ (т.е. отношение числа X -хромосом к числу аутосом составляет 0,5) были нормальными самцами.
- 5 и 6) Особенно интересными оказались особи $2X : 3A$ и $(2X + Y) : 3A$, у которых отношение числа X -хромосом к числу аутосом варьировало между 0,5 и 1. Они имели смешанное проявление мужских и женских половых признаков и были интерсексами, у которых полностью отсутствовали секторы тела, детерминированные по полу, либо до определенного момента развития формировались органы, присущие одному полу, а затем они заменялись органами другого пола.
- 7, 8) Наконец, если число наборов аутосом увеличивалось до трех при наличии одной X -хромосомы ($X : 3A$), развивался сверхсамец — организм с гипертрофированными признаками самца, однако стерильный. Напротив, увеличение числа X -хромосом при диплоидном наборе аутосом ($3X : 2A$) ведет к формированию сверхсамки с ненормально развитыми яичниками и другими нарушениями признаков пола.

К.Бриджес пришел к выводу, что не присутствие двух X -хромосом определяет женский пол, и не наличие X -хромосомы определяет мужской пол. Решающим для определения пола является, по его мнению, баланс между числом половых хромосом и набором аутосом.

РОЛЬ Y -ХРОМОСОМЫ В ДЕТЕРМИНАЦИИ ПОЛА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Однако во многих случаях, в частности у млекопитающих и человека, балансовая теория определения пола не под-

тверждается и работает другой механизм, в котором ключевую роль играет *Y*-хромосома. При отсутствии *Y*-хромосомы формируется особь женского пола при любом числе *X*-хромосом. При наличии трех или даже четырех *X*-хромосом, но в присутствии *Y*-хромосомы формируется мужской организм.

Эта хромосома характеризуется целым рядом специфических черт, отличающих ее от других хромосом набора:

- обедненность генами;
- обогащенность повторяющимися блоками нуклеотидов и, в частности, многократно тандемно повторяющимися (сателлитная ДНК); присутствие значительных гетерохроматиновых районов;
- наличие области гомологии с *X*-хромосомой — псевдоаутосомной области (PAR).

Y-хромосома, как правило, не велика: 2—3% гаплоидного генома. Тем не менее, кодирующей способности ее ДНК у человека, например, достаточно по крайней мере для нескольких тысяч генов. Однако в действительности у человека в *Y*-хромосоме выявлено всего около 40 обогащенных GC-парами так называемых CpG-островков, фланкирующих обычно большинство генов. Реальный список связанных с этой хромосомой генетических функций вдвое меньше. Ее фенотипическое влияние ограничено у мышей весом семенников, уровнем тестостерона, серологического H-Y-антигена, чувствительностью органов к андрогенам и сексуальным поведением. Обращает на себя внимание и тот факт, что большая часть генов этой хромосомы имеет *X*-хромосомные аналоги. Это касается и генов, непосредственно вовлекаемых в определение пола — *ZFX/ZFY*, *SOX3/SRY*, *UBE1/UBE1Y*, *SMCX/SMCY*.

Велика в *Y*-хромосоме доля разнообразных повторов, включая многократные. При этом большинство хромосомных последовательностей гомологичны ДНК *X*-хромосомы или аутосом, и лишь часть из них уникальна. Нередко встречается количественное преобладание в этой хромосоме некоторых семейств повторов. Наличие таких относительно специфичных для *Y*-хромосомы блоков нуклеотидов рассматривают иногда как специфический инструмент, обеспечивающий ее конденсацию в клеточном цикле или даже играющий важную роль в определении пола.

Таким образом, *Y*-хромосома является единственной хромосомой в геноме млекопитающих, которая не работает непосредственно на реализацию фенотипа. Ее генетическая значимость связана с преемственностью между поколениями, в частности с контролем гаметогенеза, а также первичной детерминации пола.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛА

Молекулярно-генетические аспекты определения пола были исследованы лишь недавно, главным образом у дрозофилы, *Caenorhabditis elegans* и у млекопитающих.

Детерминация пола у дрозофилы включает три компонента:

- 1) систему “проверки” отношения $X:A$ в самом раннем эмбриогенезе;
- 2) систему конвертирования этого отношения в сигнал развития;
- 3) систему ответа развивающегося организма на этот сигнал формированием мужских или женских структур.

Система “проверки” $X:A$ -отношения включает взаимодействие между материнскими белками, накопленными в цитоплазме яйца, и белками, синтезированными эмбрионом и кодируемыми несколькими X -сцепленными генами. Последних в два раза больше у XX -эмбрионов, чем у XU -эмбрионов. И таким образом осуществляется как бы “подсчет” присутствующих в геноме X -хромосом. Поэтому гены, которые кодируют эти белки, принято обозначать как *нумераторы*. Другие гены, которые локализованы в аутосомах, кодируют белки-антагонисты продуктов нумераторных элементов и их называют *деноминаторами*. Очевидно, что при увеличении дозы деноминаторных элементов воспринимаемая ими доза нумераторных элементов как бы снижается (рис. 12.2).

После того, как отношение $X:A$ оценено, соответствующая оценка конвертируется в молекулярный сигнал, который у XX -эмбрионов активирует ген *Sxl* — главный регу-

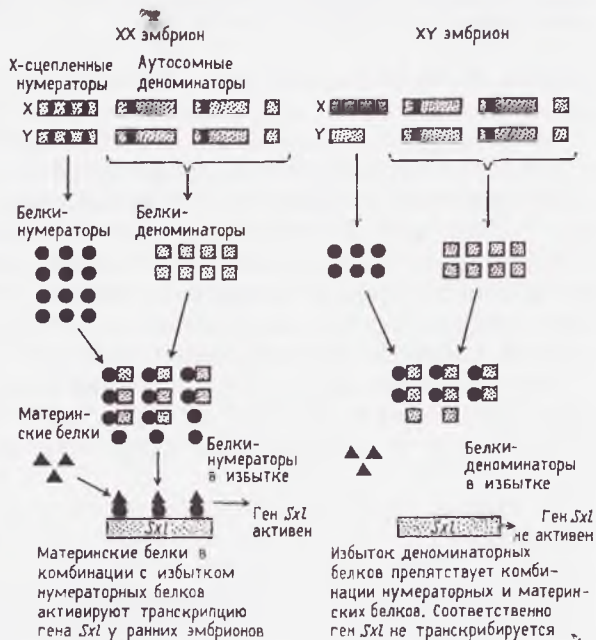


Рис. 12.2. Роль отношения $X:A$ как нумератора и деноминатора у дрозофилы (по: Snustad, 1996).

Роль этого отношения определяется взаимодействием белковых продуктов сцепленных с полом генов

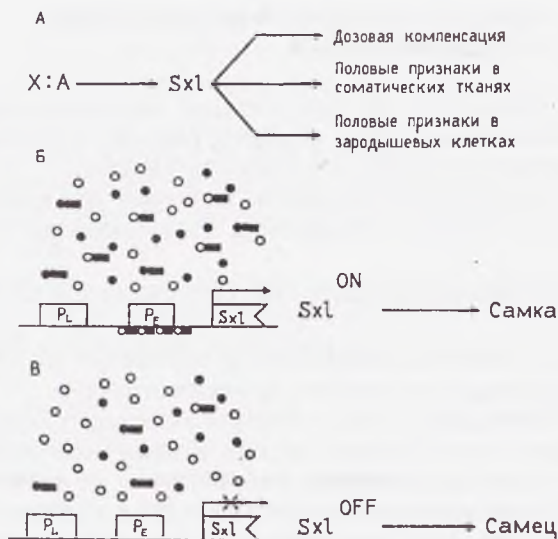


Рис. 12.3. Механизм действия гена *Sxl* (по: *Belote, 1992*).

А — роль гена *Sxl* в регуляции различных процессов. Б, В — модель механизма включения гена *Sxl* у разных полов. У самок (Б) и самцов (В), белки, кодируемые генами из X-хромосомы (прямоугольники) формируют активные комплексы с белками, кодируемыми генами, расположенными в аутосомах (кружки). Самки имеют в два раза больше комплексных молекул, чем самцы. Наличие большого количества этих комплексных молекул позволяет им связываться с P_E -промоторным элементом гена *Sxl* и активировать транскрипцию (стрелка вправо — Sxl^{ON}). У самцов число молекул комплекса невелико и неспособно активировать P_E -промотор. Ген *Sxl* не включается (Sxl^{OFF}), что и приводит в конечном счете к развитию половых признаков самца

лятор пути детерминации пола. Далее начинает функционировать целый каскад генов, вовлеченных в процесс формирования пола.

У дрозофилы открыты многочисленные гены, влияющие на этот процесс. В частности исследованы эффекты генов *Sxl* (*Sex lethal*), *da* (*daughterless*), *sis* (*sisterless*), *tra* (*transformer*), *dsx* (*double sex*). Ген *Sxl*, “улавливая” соотношение числа X-хромосом и аутосом на ранней стадии эмбрионального развития, контролирует три различных направления дифференцировки: формирование половых признаков в соматических клетках, в клетках зародышевого пути, а также контроль дозовой компенсации (рис.12.3).

На начальных этапах формирования пола у эмбрионов дрозофилы действуют гены *sis-a* и *sis-b*, расположенные в X-хромосоме, и ген *da*, расположенный в аутосоме, а также ген *runt* и др. (табл. 12.1).

Белковые продукты этих генов образуют комплексную молекулу белка. Продукт гена *da* поступает в яйцеклетку из организма матери, его количество всегда соответствует двум дозам, так как он считается с генов, локализованных в двух материнских аутосомах. Количество продуктов, считанных с генов *sis-a* и *sis-b*, зави-

Таблица 12.1

Принципиальная схема определения пола у некоторых представителей животного мира (по А.Ф.Смирнову)

	Организм				
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Alligator mississippiensis</i>	Млекопитающие
Контролирующий сигнал ↓	Транскрипция НО-гена	Соотношение аутосом	X-хромосом	внешняя температура	Y-хромосома
Ключевой ген ↓	MAT (α/a)	her (+/-)	Slx (+/-)	TDF	TDF-SRY
Гены, контролирующие гонадогенез (полопределяющие) ↓		<i>xoll, sdcl, sdc2, her1, tra2, tra3, fem1, fem2, fem3, tra1</i>	<i>sis-a, sis-b, da, liz, fl(2)d, Sx2, tra, tra2, dsx, ix</i>	эффекторные молекулы, гормоны	гормоны
Гены, контролирующие половую дифференцировку	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание. Знаки плюс и тире означают альтернативу включения или выключения соответствующего гена.

сит от того, сколько X-хромосом у особи — две или одна. Следовательно, у самцов комплекс белков *sis/da* имеет отношение составляющих его компонентов 1:2 и 1:1 у самок. Эти белковые продукты поступают на регуляторную зону ключевого гена *Sxl*, определяющего пол. Она содержит два участка, которые стимулируют транскрипцию ДНК с данного гена, — ранний и поздний промоторы (см. рис. 12.3).

В случае, если комплексный белок *sis/da* содержит две дозы *sis*, он активирует начало транскрипции с раннего промотора (PE на рисунке). Это происходит в самый ранний период эмбриогенеза, на стадии бластодермы. Затем транскрипция может начаться и с позднего промотора, как у особей *XX/AA*, так и *X/AA*. Но результаты включения транскрипции с каждого из этих промоторов будут разными.

Ген *Sxl* содержит 8 экзонов — участков, кодирующих аминокислотные последовательности (рис.12.4, 1—8), разделенных некодирующими интронами. У самцов ($X:A=0,5$) при активации позднего промотора (P_2) считывается третий экзон (см. рис. 12.3), в котором расположен кодон UGA, после чего трансляция останавливается, и белок получается укороченным. В отсутствие нормального функционально активного белка, кодируемого геном *Sxl*, ген *tra*, расположенный далее в данном каскаде, также функционирует неправильно, давая укороченную нефункциональную молекулу белка (трансляцию блокирует кодон AUG во втором экзо-

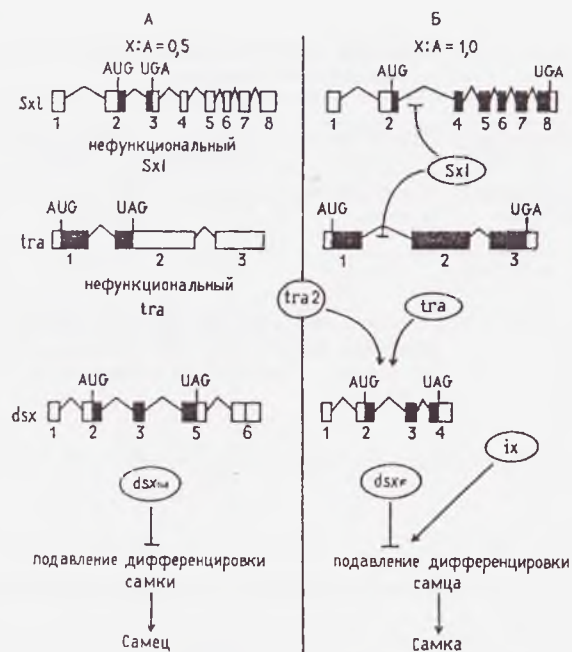


Рис. 12.4. Каскад генных взаимодействий, приводящих к формированию соматических половых признаков самца (А) и самки (Б) (по: *Belote, 1992*)

В каскад вовлечены гены *Sxl*, *tra*, *tra2*, *ix*, *dsx*. Прямоугольники с цифрами обозначают кодирующие части генов — экзоны. Зачервленные части экзонов представляют собой участки, кодирующие аминокислоты. Зигзагами показаны интроны

не). Хотя белок другого гена, *tra2* (рис. 12.4; 12.5), присутствует у обоих полов, он не способен функционировать в отсутствие нормального продукта гена *tra*. Более того, в отсутствие нормальных продуктов генов *tra* и *tra2* формируется особый самцовый белок *dsx M*, считанный с определенного набора экзонов (рис. 12.5). Такой белок репрессирует развитие признаков женского пола. В результате нарушений действия каскада этих генов развитие направляется в сторону формирования признаков самца.

У самок ($X:A=1,0$) транскрипт гена *Sxl* не содержит экзона номер 3 со стоп-кодоном, в результате чего формируется полноценный белок *Sxl*, взаимодействующий с геном *tra*, который, взаимодействуя в свою очередь с белком гена *tra2*, регулирует образование специфической для самок РНК *dsx F* (рис. 12.5). Наличие специфического для самок продукта *dsx F* способствует вовлечению в данный каскад генов *ix* и *her*. Белки этих генов инактивируют многие локусы, активность которых могла бы привести к формированию самцов, так что в конечном итоге формируется самка.

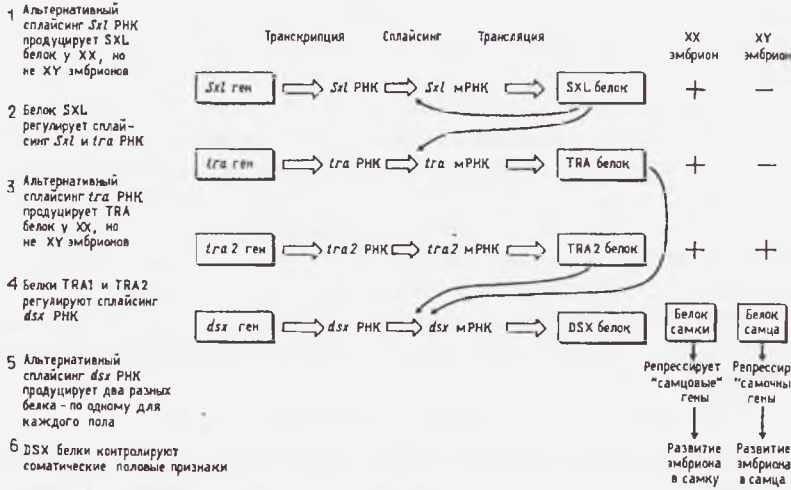


Рис. 12.5. Регуляция детерминации пола у дрозофилы геном *Sex-lethal (Sxl)* (по: *Snusted, 1996*).

Этот ген регулирует экспрессию гена *transformer (tra)*, который в свою очередь регулирует экспрессию гена *doublesex (dsx)*. Ген *transformer-2 (tra-2)* также участвует в регуляции экспрессии гена *dsx*.

Таким образом, у дрозофилы важную роль в детерминации пола играет альтернативный сплайсинг.

Действительно, SXL-белок в период активации соответствующего гена функционирует как регулятор сплайсинга. Его мишенями являются транскрипты, синтезированные тем же самым геном и активируемые в более поздний период развития. Изначальный SXL-белок контролирует сплайсинг этой вторичной РНК у самок, так что она продуцирует функционально активный белок, в то время как транскрипт самца синтезирует неактивный белок.

Альтернативный сплайсинг продолжается и в ходе дальнейшей реализации программы дифференцировки пола: активированный SXL-белок действует также на мРНК, синтезированную геном *tra*, который контролирует образование другого регулятора сплайсинга, специфичного для самки. Его мишень — “конечный” ген *dsx*, функция которого также регулируется на уровне альтернативного сплайсинга.

Несмотря на многочисленные различия в процессе молекулярно-генетической детерминации пола между *Drosophila* и *Caenorhabditis elegans*, эти два вида имеют и нечто общее — природу первичного сигнала, который детерминирует развитие эмбриона в самца или самку.

В то время как у млекопитающих таким детерминирующим фактором является присутствие или отсутствие самцовой Y-хро-

мосомы, у *C.elegans*, как и у *Drosophila*, определяющим является отношение X-хромосом к набору неполовых хромосом (аутосом).

Как уже отмечалось, у самок отношение X:A составляет 1,0 (когда имеется две X-хромосомы и по две копии каждой аутосомы), в то время как у самцов с одной X-хромосомой оно равно 0,5. При этом у дрозофилы геном, который осуществляет "подсчет" отношения X:A, является ген *Sxl*, у *C.elegans* его функции выполняет ген *xol-1* (рис. 12.6). Не ясно, однако, как этот "подсчет" осуществляется у *C.elegans*. Во всяком случае, данные о генах-регуляторах и деноминаторах у этого объекта отсутствуют.

На основании анализа фенотипа комбинированных двойных мутантов установлена иерархия эпистаза для детерминирующих пол генов:

tra-1» *fem-1, fem-2, fem-3*» *tra-2 her-1*.

Например, двойные мутанты *tra-1, her-1* развиваются как самцы независимо от того, есть ли это XX- или XY-особи. Поэтому маскулинизированные *tra-1*-особи эпистатичны по отношению к феминизированным *her-1*-мутантам.

Используя эти эпистатические взаимоотношения и дополнительную информацию о том, как функционируют все эти гены, можно уточнить их место в системе регуляции половых признаков. У дрозофилы ген *Sxl* является истинно полоспецифическим. Его можно удалить у самцов, и они не пострадают. В противоположность этому гену, ген *xol-1* у *C.elegans* имеет ключевое значение в маскулинизации, хотя значение это невелико у самок. Кроме того, у *C.elegans* альтернативный сплайсинг не играет существенной роли в регуляции определения пола. Вместо этого белки, кодируемые генами червя, представляют собой систему передачи пол-детерминирующих сигналов между двумя или более взаимодействующими клетками (рис. 12.6). Главное отличие от дрозофилы заключается в том, что специфические изменения активности генных комплексов происходят не в большинстве соматических клеток, а внутри индивидуальных клеток.

У *C.elegans* детерминация пола начинается с экспрессии гена *xol-1* в ответ на самцовое отношение X:A, равное 0,5 (рис. 12.6). Высокая активность этого гена ведет к снижению активности нескольких других генов, названных *sdc-1, -2, -3*.

Белковые продукты этих генов редуцируют экспрессию гена *her-1*, следующего гена в этом каскаде. Торможение активности гена *sdc* у самцов вызывает увеличение продукции секреторируемого HER-1, который, следовательно, передает сигналы между клетками.

Следующий ген — *tra-2* (неродственный гену *tra-2* дрозофилы), кодирует мембраносвязанный рецепторный белок. Следовательно, у *C.elegans* в ходе процесса детерминации пола по край-

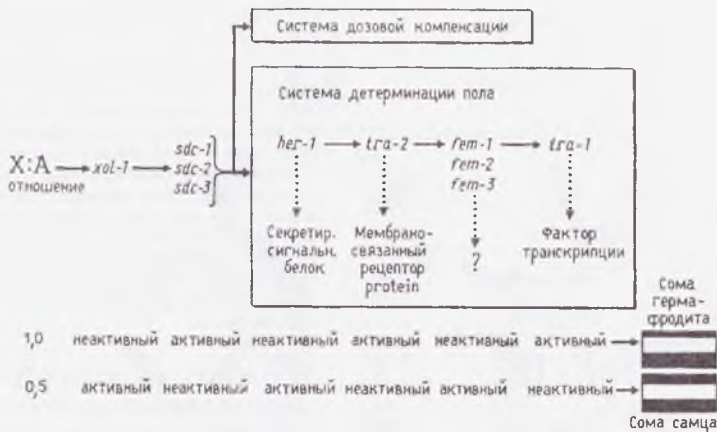


Рис. 12.6. Схема генетической регуляции пола у *Caenorhabditis elegans*

ней мере два различных типа клеток взаимодействуют друг с другом — продуцирующие сигнальный белок HER-1 и синтезирующие рецепторный белок TRA-2. Белок HER-1 — тормозящий сигнал, который редуцирует активность TRA-2, что ведет к увеличению активности следующих в каскаде генов — *fem-1*, *-2*, *-3*. И, наконец. FEM-белок “предписывает” ядру производить меньше белкового продукта, кодируемого последним в каскаде геном *tra-1*. Этот ген кодирует транскрипционный фактор, который “разрешает” развитие самки. Редукция его активности маскулинизирует эмбрион. У эмбрионов, развивающихся по самцовому пути, она низка.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА ПОЛА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

У млекопитающих молекулярно-генетические основы детерминации пола имеют свои особенности, и существует два соответствующих правила в этом процессе. Первое было сформулировано в 60-е годы XX в. А.Жостом. Оно гласит: специализация развивающихся гонад в тестис или яичник определяет последующую половую дифференцировку эмбриона (рис. 12.7). Оно было обосновано экспериментами по удалению зачатка будущих гонад (гонадный валик) у ранних эмбрионов кроликов. Удаление этих валиков до формирования гонады приводило к развитию эмбрионов как самок. Отсюда можно было предположить, что гонады самцов — семенники — секретируют эффектор (тестостерон), ответственный за маскулинизацию плодов. На основе этих опытов было также предсказано наличие второго эффектора — антимюл-

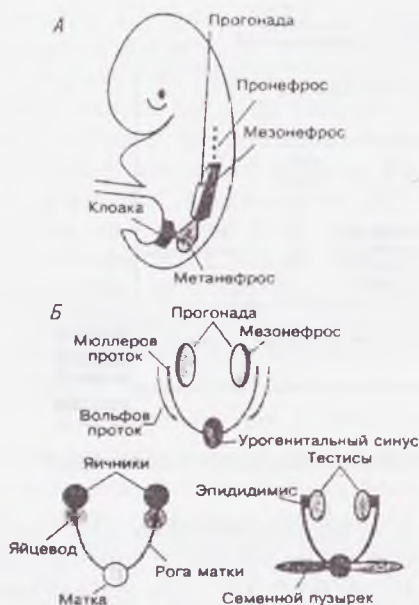


Рис. 12.7. Развитие гонад у млекопитающих (по: А.Ф. Смирнову).

А — плод с недифференцированной прогонадой. Б — схема мочеполовой системы у такого плода, самца и самки. Гонадный бугорок развивается вместе с мезонефросом (почка). Прогонада морфологически неразличима у XX и XY эмбрионов. Первые половые различия между развивающимися гонадами наблюдаются у человека через 6 недель после зачатия, у мышей на 12,5 день. Мюллеров проток прогонады является предшественником матки, яйцеводов, верхней части влагалища, Вольфов проток — эпидидимиса, семявыносящих протоков, семенных пузырьков

леровского гормона (MIS), непосредственно контролирующего такие анатомические преобразования.

Второе правило определения пола у млекопитающих гласит: Y-хромосома несет генетическую информацию, требуемую для детерминации пола у самцов. Комбинацию этих двух

правил часто называют принципом Жоста: хромосомное определение пола, связанное с присутствием или отсутствием Y-хромосомы, детерминирует дифференциацию эмбриональной гонады, которая в свою очередь контролирует фенотипический пол организма. Подобный механизм определения пола называют генетическим (GSD) и противопоставляют таковому, основанному на контролирующей роли факторов внешней среды (ESD) или на соотношении половых хромосом и аутосом.

У млекопитающих эмбриональная закладка гонад является бисексуальной. В них одновременно присутствуют мюллеровы и вольфовы протоки — зачатки половых путей самцов и самок.

Первичная детерминация пола у самцов начинается с появления в таких прогонадах специализированных клеток Сертоли, в которых синтезируется предсказанный Жостом фактор MIS, ответственный за прямое или опосредованное ингибирование развития мюллерова протока — зачатка будущих фаллопиевых труб и матки.

Этот белок называют антимюллеровским гормоном (AMH). Он синтезируется в процессе развития после того, как начался синтез SRY-белка и, следовательно, соответствующий ген может служить мишенью для непрямого регулирования со стороны SRY-белка. Показано существование транскрипционного фактора, который может быть промежуточным регулятором гена *AMH*. Известен так-

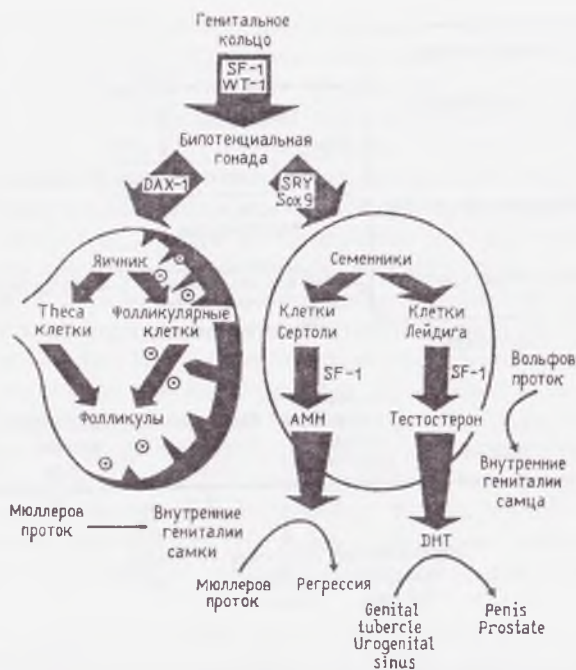


Рис. 12.8. Диаграмма, демонстрирующая возможные функции генов, участвующих в детерминации пола у млекопитающих: *SRY*, *Sox9*, *AMH*, *WT1*, *SF1*, *DAX-1*

же белок, названный стероидогенным фактором-1 (SF-1), который является глобальным регулятором генов для всех ферментов, связанных с синтезом стероидов. Оказалось, что регуляторная последовательность генов *AMH* содержит сайт связывания с SF-1, и этот сайт необходим для активации гена (рис. 12.8; 12.9).

Таким образом, три гена, кодирующих белки *SRY*-1, *SF*-1 и *AMH*, могут в результате их последовательного действия играть ключевую роль в детерминации пола у млекопитающих.

РОЛЬ ГЕНА *SRY* В РЕГУЛЯЦИИ ПОЛА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Для нормального функционирования клеток Сертоли необходим XY-кариотип. Именно в этих клетках Y-хромосома, с которой сцеплен гипотетический тестисопределяющий фактор (testis determining factor — TDF), деконденсирована и транскрипционно активна (рис. 12.9).

Этот фактор позднее был идентифицирован как ген и получил название *Sry* (sex determining region of Y gene). Он кодирует белок,

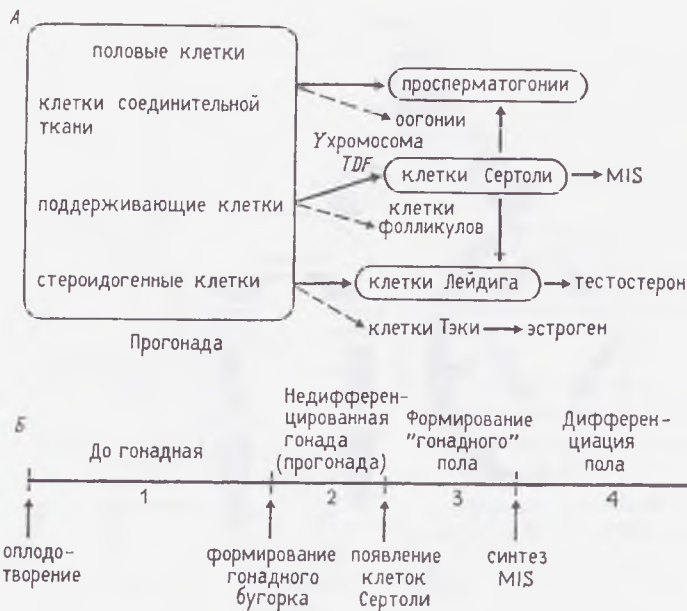


Рис. 12.9. Схема определения пола у млекопитающих (по: А.Ф.Смирнову).

А — определение тестисов из четырех клеточных типов прогонады. Пунктирные стрелки обозначают пути в направлении развития яичников. Б — временная диаграмма последовательных стадий определения пола. 1 — догонадная: отсутствие у эмбриона половых органов; 2 — прогонадная: появление гонадного валика и бисексуальной прогонады; 3 — формирование гонадного пола (первичное определение пола): синтез TDF, появление клеток Сертоли, окружающих половые клетки (семявыносящие канальцы); 4 — дифференциация пола: синтез MIS клетками Сертоли, появление клеток Лейдига, продуцирующих андрогены, маскулинизация внешних гениталиев

образующий “цинковые пальцы” и обладающий ДНК-связывающей активностью, а потому рассматриваемый как фактор регуляции транскрипции. Ген *Sry* расположен в детерминирующей пол области Y-хромосомы и содержит консервативный домен (HMG-бокс), который кодирует белок размером 79 аминокислотных остатков. Его активность была обнаружена накануне периода дифференцировки прогонады в семенник, от 10 до 12,5-го дня эмбрионального развития у мыши.

Точковые мутации или делеции в HMG-боксе этого гена могут приводить к инверсии пола. Перенос фрагмента ДНК размером 14 кб, содержащего этот ген с фланкирующими участками, в оплодотворенную яйцеклетку гомогаметной мыши с помощью микроинъекции приводит к появлению “самца” с XX-кариотипом. У последнего, однако, наблюдается дефектный сперматогенез.

Белок, кодируемый HMG-боксом гена *Sry*, специфически связывается с ДНК, что ведет к изгибанию ее молекулы. Такая де-

формация структуры ДНК, индуцируемая SRY-белком или родственными ему молекулами (известно более 100 белков с HMG-доменом), может механически передаваться на расстояние и играть важную роль в регуляции транскрипции, репликации, рекомбинации. Имеется экспериментальный материал, свидетельствующий в пользу опосредованного положительного контроля активности гена *mis* белковым продуктом SRY и отрицательного контроля этим же продуктом гена ароматазы, контролирующего превращение мужских стероидных половых гормонов в женские. На наличие такой специфической активности гена *Sry* указывает и внутриядерная локализация антител к его продукту.

Ген *Sry* — один из членов большого семейства генов (более 20 членов), получившего название *Sox*. Для этого семейства характерна тканеспецифическая экспрессия в раннем эмбриогенезе. Гены *Sox-1*, *Sox-2* и X-хромосомный *Sox-3* активны в развивающейся нервной системе. *Sox-4* функционирует как активатор транскрипции в Т-лимфоцитах а *Sox-5* проявляет специфическую активность во время сперматогенеза. Недавно изолирован человеческий гомолог гена *Sox-9* мышцы, требующийся для нормального развития скелета.

Однако процесс детерминации пола, как и другие морфогенетические события, контролируются генетически на многих уровнях. Показано, в частности, существование генов, модифицирующих эффект гена *Sry*. Замечены, в частности, различия в росте гонад самцов и самок: первые растут быстрее и этот более быстрый рост контролируется геном *Gdy* (growth and development), который расположен в *Sxr*-участке Y-хромосомы мышей.

Недавно был изолирован ген *Dax-1*. Мутации этого гена вызывают X-сцепленную адреналовую гипоплазию, при которой нарушается развитие надпочечников. Он картирован в малой области X-хромосомы, которая найдена дуплицированной у XY-самки. Предполагается, что эта область несет ген, необходимый для развития яичников, и его двойная доза может феминизировать развивающиеся гонады самца.

Он кодирует рецепторный комплекс на поверхности клетки, способный распознавать гормоны, к которым сильно чувствителен, а потому в увеличенной дозе может преодолеть сигнал SRY и сдвинуть развитие гонад в сторону яичника. Этот ген рассматривается как реликт более примитивной X-хромосомной системы детерминации пола. Кодируемый им рецептор родственен стероидогенному фактору SF-1, экспрессия которого обнаружена в недифференцированной прогонаде мышей. Мутации по гену *SF-1* могут приводить к отсутствию гонад у обоих полов. Предполагается и его участие в контроле активности гена антимюллеровского гормона *MIS* в клетках Сертоли.

Таблица 12.2

Гены, предположительно участвующие в детерминации пола у млекопитающих, помимо *SRY* и *ZFY*

Генетический фактор	Участие в контроле детерминации пола
1) <i>Gpy</i> 2) <i>WT1</i>	контролирует скорость роста эмбрионов и прогонад влияет на развитие прогонады примерно на 9-й день эмбрионального развития, связан с наследственными заболеваниями — опухоль Вильямса, синдром Дэнис—Драма
3) <i>Sox9</i>	содержит HMG-боксы, ответствен за CD-синдром и аутосомальную инверсию пола; экспрессируется до 13-го дня эмбрионального развития; возможный модификатор влияния <i>SRY</i> на <i>MIS</i> -ген
4) <i>Z</i>	отрицательный регулятор развития тестисов; в норме активен у самок, у самцов заблокирован работой <i>SRY</i> , существует мутация <i>Z'</i> , не чувствительная к эффекту воздействия <i>TDF-SRY</i>
5) <i>DAX1 (DSS)</i>	локализован в районе <i>Xp21</i> : в двойной дозе способен преодолевать эффект <i>SRY</i> и сдвигать развитие гонады в направлении яичника; кодирует ядерный рецептор; ответствен за дозозависимую реверсию пола
6) <i>Tda</i> ^{1b}	предположительно связан с хромосомами 2 и 4 мыши; приводит к появлению овотестисов у В6Y ^{DOM} -гибридов
7) <i>Tas</i>	аутосомная мутация на 17-й хромосоме мышей, приводящая к появлению XY-самок
8) <i>MIS</i>	ген антимюллеровского гормона, секретируется клетками Сертоли в ответ на активность <i>SRY</i> ; ингибирует развитие мюллерова протока; локализован на 19-й хромосоме человека p13.2—p13.3
9) <i>Tfm (hAR)</i>	ген рецептора андрогенов; у человека локализован на X-хромосоме (<i>Xp11—12</i>); вызывает тестикулярную феминизацию
10) Гены сперматогенеза и спермиогенеза	известен ряд факторов — <i>Shy</i> , <i>SMSY</i> , <i>UBE1Y</i> , <i>TSPY</i> , <i>YRRM</i> , проявляющих такую активность
11) <i>SFI</i>	ген рецептора стероидных гидролаз; у человека предположительно локализован в участке <i>9q33</i> ; необходим для развития недифференцированной прогонады и регуляции активности <i>MIS</i> -гена в клетке Сертоли
12) <i>Od</i>	гипотетический X-хромосомный или аутосомный ген, ответственный за дифференциацию прогонады в яичник и отрицательно регулируемый геном <i>SRY</i>

В X-хромосоме клонирован и локализован также ген, кодирующий рецептор андрогенов человека и ответственный за тестикулярную феминизацию (мутация *Tfm*), известную для ряда объектов.

Следовательно, наряду с TDF-SRY-системой в регуляции формирования семенников из потенциально бисексуальных прогонад у млекопитающих участвуют и другие гены. Для появления клеток Сертоли, семявыносящих канальцев, клеток Лейдига и др. требуется взаимодействие целого ряда аутосомных и сцепленных с X-хромосомой факторов, представление о котором дает табл. 12.2).

Итак, процесс молекулярно-генетической детерминации пола также осуществляется на многих уровнях, и в него вовлечено большое количество взаимодействующих генов.

КАК ГЕНЕТИКИ ПОМОГАЮТ “УПРАВЛЯТЬ” ПОЛОМ У ЖИВОТНЫХ?

Издавна биологи интересовались возможностью управления полом у животных, в особенности у насекомых. Значительных успехов в этом направлении добились российские генетики. В.А.Струнникову (рис.12.10) удалось разработать метод получения у тутового шелкопряда особей одного мужского пола в неограниченном количестве. Для этого была выведена линия, сбалансированная по двум Z -летаям с помощью транслокации фрагмента Z -хромосомы на W -хромосому. В итоге хромосомных перестроек шелкопряд этой линии превратился в новую форму — полусамца-полусамку, в кариотипе которой, с одной стороны, имеется свойственный самкам набор хромосом ZW , а с другой, — присутствуют два парных участка Z -хромосом, как у обычных самцов. Особи с таким генотипом функционировали как самки. Летали, возникшие в левом конце Z -хромосомы, стали прикрываться у самок соответствующими нормальными аллелями пересаженого участка Z -хромосомы. Самки в этом случае выживают и передают летали своим сыновьям. Последовательное скрещивание самок транслокантной линии с самцом, гетерозиготным по другой летали, позволило вывести новую, сбалансированную по двум летаям линию. При размножении в себе она во всех последующих поколениях имеет жизнеспособных самок, в то время как половина самцов, получивших обе одинаковых летали, погибает. Оставшиеся самцы всегда несут по одной неаллельной летали в каждой из двух Z -хромосом, и поэтому их потомство, полученное от скрещивания с самками любой другой породы без перестроек половых хромосом, состоит из одних самцов.

Это достижение позволило реализовать предложение другого российского генетика А.С.Серебровского (рис.12.11), разработавшего в свое время генетический метод борьбы с вредными насекомыми. Суть его заключается в выпуске в природу специально выведенных линий вредных насекомых с различными генетическими нарушениями. Выпущенные насекомые при скрещивании с особями природной популяции не дадут потомства, и это приведет к снижению численности вредных насекомых.

Выведенные В.А.Струнниковым породы позволили найти способ получать полную гибель яиц женского пола подряд в двух поколениях. Следовательно, оказалось возможным выпускать в природу одних самцов, не применяя при этом технически сложное разделение насекомых по полу, а гибель особей женского пола в F_2 , т.е. в потомстве выпущенных в природу самцов, использовать непосредственно для подавления размножения природной популяции вредных насекомых. Автор решил поставленную задачу по-



Рис. 12.10. Владимир Александрович Струнников. Выдающийся российский генетик. Академик. Лауреат Государственной премии.

Решил проблему управления полом у насекомых с помощью генетических методов. Используя собственные разработанные генетические методы, отсеклтировал породы шелкопряда, характеризующиеся высокой продуктивностью



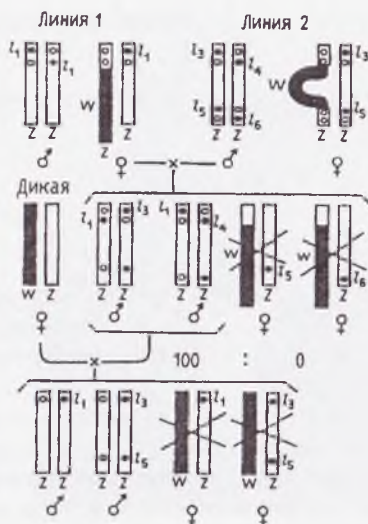
Рис. 12.11. Александр Сергеевич Се-ребровский. Выдающийся российский генетик.

Занимался проблемой генетической регуляции пола. Сформулировал вместе с Н.П.Дубининым концепцию о тонком строении гена и его дробности, в последующем оправдав-шуюся

средством выведения двух линий животных, сбалансированных по нескольким рецессивным *Z*-летаям (рис.12.12). Линия 1 была сбалансирована по двум не-аллельным друг другу летаям 11 и 12, локализованным в левом конце *Z*-хромосомы. Сбалансирование по летаям выполняется опробованным способом при помощи транслокации левого конца *Z*-хромосомы с нормальными аллелями на левый конец *W*-хромосомы. Линия 1 нормально размножается в себе, давая в потомстве самцов и самок. Линия 2 выводится из самок линии 1 с имеющейся транслокацией левого конца *Z*-хромосомы на *W*-хромосому. Затем на *W*-хромосому необходимо транслоцировать еще один фрагмент *Z*-хромосомы, но теперь уже ее правого конца. Под прикрытием транслокации левого конца *Z*-хромосомы балансируются, как и в случае линии 1, две не-аллельные летали 13 и 14, локализованные в левом конце *Z*-хромосомы. Эти летали не аллельны летаям линии 1, но они расположены близко к их локусам. Под прикрытием транслокации правого конца *Z*-хромосомы на *W*-хромосому балансируются две не-аллельные друг другу летали 15 и 16, локализованные в правом конце *Z*-хромосомы. Линия 2 размножается нормально, давая соотношение полов 4♂ : 1♀.

Рис. 12.12. Выведение двух линий чешуекрылых, сбалансированных в общей сложности по 6 неаллельным Z-летаям (по: Струнников, 1978).

Локусы леталей обозначены темными кружками и соответствующими символами, а локусы их нормальных аллелей — только светлыми кружками



Благодаря исследованиям российского генетика выведение таких двух линий у различных видов чешуекрылых, вредителей сельскохозяйственных культур, не представляется трудной задачей. Более того, за рубежом (в частности, в Чехии и Японии) данный метод успешно используется для борьбы с плодовой мушкой и другими вредными насекомыми.

Рекомендуемая литература

1. Астауров Б.Л. Цитогенетика развития тутового шелкопряда и ее экспериментальный контроль. М.: Наука, 1968.
2. Мясоедов С.В. Явление размножения и пола в органическом мире. Томск: Сибирская Мысль, 1935.
3. Струнников В.А. Перспективы использования сбалансированных сцепленных с полом леталей для борьбы с вредными насекомыми//Генетика.1978. Т.14. С. 2002—2011.
4. Snusted H., Simmons M., Jenkins J. Principles of genetics. N.Y.: Wiley, 1997.

? Вопросы для повторения

1. Что такое половые хромосомы?
2. В чем суть балансовой теории Бриджеса?
3. Какова роль Y-хромосомы в детерминации пола млекопитающих?
4. Каковы молекулярно-генетические механизмы определения пола?
5. В чем особенности молекулярно-генетических событий при определении пола у млекопитающих?
6. Какова роль гена *Sry* в детерминации пола млекопитающих?
7. Как генетики помогают “управлять” полом?

ГЕНЫ, ОНТОГЕНЕЗ И ЭВОЛЮЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ

В ЧЕМ ЕДИНСТВО ИНДИВИДУАЛЬНОГО И ИСТОРИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ? ГЕНЕТИКА И БИОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЗАКОН

О единстве индивидуального и исторического развития заговорили сразу после создания эволюционного учения. Это и понятно, поскольку эволюционные преобразования не могли начинаться иначе, как через изменения программы индивидуального развития.

Первоначально это единство выражали в так называемом *био-генетическом законе*. Основываясь на работах О.Меккеля и Ч.Дарвина, немецкий биолог Фр.Мюллер еще в 1864 г. высказал идею о тесной связи предков с эмбриональным развитием потомков. Эта идея была преобразована в биогенетический закон известным дарвинистом Э.Геккелем (рис. 13.1). В 1866 г. он сформулировал этот закон следующим образом: “Онтогенез является коротким и быстрым повторением филогенеза, повторением, обусловленным физиологическими функциями наследственности (воспроизведения) и приспособленности (питания)”.

Следует сказать, что наиболее выдающиеся эмбриологи того времени критически восприняли идеи Мюллера—Геккеля. Свое негативное отношение выразили А.Келликер, В.Гис, К.Бэр, О.Гертвиг, А.Седжвик. Последний заметил, в частности, что глоточные дуги и щели эмбриона млекопитающих гомологичны жаберным дугам и щелям рыб, однако нет свидетельств в пользу того, что они выполняли в прошлом жаберную функцию. Без



Рис. 13.1. Эрнст Геккель. Один из активнейших и ортодоксальных пропагандистов дарвинизма. Автор биогенетического закона

Рис. 13.2. Карл Максимович Бэр. Великий российский ученый. Создатель современной эмбриологии



таких свидетельств нельзя утверждать, что жаберные щели и дуги доказывают происхождение млекопитающих от рыбообразных предков. Новое в онтогенезе возникает не за счет прибавления новых стадий к онтогенезу предков, как думал Геккель, но главным образом за счет такого изменения хода эмбриональных стадий, которое преобразует процесс онтогенеза в целом.

Н.Клайнберг (Kleinenberg, 1886) высказал мысль, что такие, казалось бы, лишённые функции эмбриональные структуры, как хорда или трубчатая закладка сердца

у позвоночных, считавшиеся простыми примерами рекапитуляции, возможно, имеют жизненно важное значение для развития зародыша, принимая участие в формировании более поздних структур. С.Уитман (С. Whitman), один из основателей американской эмбриологии, пророчески писал в 1895 г., что наши глаза похожи на глаза наших предков не вследствие генеалогических связей, а в связи с тем, что развитие молекулярной основы зачатков этих глаз происходило в сходных условиях.

Наконец, давно известно такое явление, как *преадаптация*. К.Бэр (рис. 13.2) писал, что если бы биогенетический закон был правилен, то в развитии некоторых животных не наблюдалось бы в проходящем состоянии образований, которые остаются навсегда лишь у вышестоящих форм: у всех млекопитающих в первое время развития челюсти так же коротки, как у человека, мозг птиц в течение первой трети эмбриогенеза гораздо более близок к мозгу млекопитающих, чем во взрослом состоянии. А российский палеонтолог А.П.Павлов еще в 1901 г. показал, что молодые особи некоторых аммонитов обладают признаками, которые исчезают в зрелом возрасте, но впоследствии снова обнаруживаются у более высокостоящих в системе форм, у видов, появляющихся в более новых отложениях. Следовательно, предковые, как говорят, анцестральные формы, в молодом состоянии как бы предвещают то, что со временем будет свойственно взрослым особям стоящих выше в эволюционном отношении форм.

В 20—30-е годы XX в. критика биогенетического закона была продолжена учеником А.Седжвика В.Гарстангом, утверждавшим, что онтогенез не повторяет филогенез, а творит его. В его поддер-



Рис. 13.3. Александр Николаевич Северцов. Крупный эволюционист. Классик отечественной биологии.

Внес важные дополнения в классическую дарвиновскую схему эволюционного процесса. Пытался внести ясность во взаимоотношения онто- и филогенеза

жжу высказались Л.Берталанфи, Т.Морган и др. Морган, в частности, отметил, что в ходе эволюции сами эмбриональные стадии могут изменяться и терять сходство с соответствующими эмбриональными стадиями более ранних форм, а потому, если теория рекапитуляции является “законом”, то он имеет так много исключений, что становится бесполезным и часто ошибочным.

Понимая всю серьезность такого рода возражений и стремясь тем не менее “спасти” биогенетический закон, выдающийся российский биолог А.Н.Северцов (рис.13.3) выдвинул *теорию филэмбриогенеза*, под которым он понимал эмбриональные изменения, связанные с филогенетическим развитием взрослого организма. Он выделил три типа филэмбриогенеза:

- *анаболия* — надставка конечной стадии (например, развитие челюстей у саргана);
- *девиация* — изменение пути развития (развитие чешуи у акулорыб и рептилий);
- *архаллксис* — изменение первичных зачатков (рис. 13.4).

Однако работы А.Н.Северцова и его последователей, внесших выдающийся вклад в развитие эволюционных взглядов (А.В.Се-

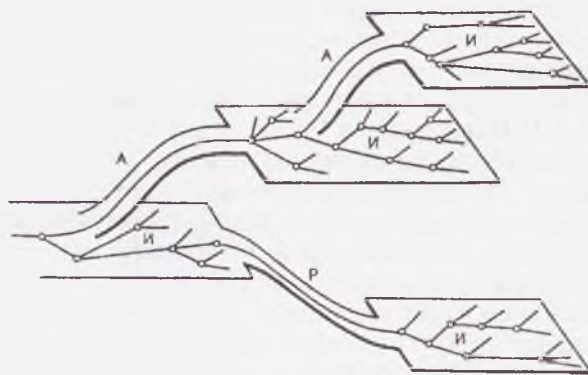


Рис. 13.4. Схема эволюционного процесса (по: А.Н.Северцову).

А — анаболия, И — девиация, Р — регрессивные изменения

верцов мл., А.В.Яблоков, Э.В.Воробьева, Л.П.Татаринов и др.), не положили конец критике представлений Геккеля—Мюллера. Негативное отношение к ним продемонстрировали палеонтолог Ш.Депере, зоолог А.А.Любищев, эмбриологи Д.Дьюор и С.Г.Крыжановский, физиолог И.А.Аршавский и др.

Д.Дьюор, например, заметил, что пищеварительный канал эмбриона некоторое время замкнут в себе и отделен от рта и анального отверстия, а это не может представлять какую-то предковую стадию: разве можно представить такую фазу эволюции, когда примитивный пищеварительный канал имеет смысл в качестве слепой трубки? Закладка однопалой конечности лошади с самого начального момента обнаруживает четкую специфичность: утрата латеральных пальцев в ходе эволюции не рекапитулирует в онтогенезе. Утраченные в эволюции пальцы редуцированы в самой ранней эмбриональной закладке, что противоречит биогенетическому закону.

Сходные противоречия обнаруживаются и в ходе сравнительно-эмбриологических исследований. Как уже отмечалось, становление плана строения тела различных организмов в онтогенезе обусловлено изменениями паттерна экспрессии генов сегментации и гомеозисных генов. Стадия, на которой эмбрионы одного филума обнаруживают наивысший уровень морфологического сходства друг с другом, обозначается как *филотипическая* стадия. Стадия, на которой устанавливаются различия в плане строения тела у животных разных филумов, связанные с функционированием гомеозисных генов, — обозначается как *зоотипическая* стадия. Например, хордовые проходят стадию развития, на которой они имеют сходное устройство нервной трубки, нотохорды и сомитов. Эта стадия является той филотипической точкой, на которой устанавливается региональная идентичность паттерна экспрессии гомеозисных генов. При этом, несмотря на консерватизм филотипической и зоотипической стадий, специалисты по генетике развития определяют, что начальные стадии эмбриогенеза внутри каждого филума характеризуются значительным разнообразием. Например, в то время как эмбрионы человека, цыпленка и рыбки *Zebrafish* (полосатая данио) выглядят сходно на филотипической стадии, их более ранние стадии развития морфологически совершенно *различны*, что находится в противоречии с биогенетическим законом.

Спрашивается, отражают ли эти морфологические и морфогенетические различия какую-либо соответствующую этим различиям молекулярно-генетическую специфичность? Имеющийся фактический материал позволяет предположить, что молекулярно-генетическая “машина” является во всех случаях сходной, а морфологические различия обусловлены сдвигами во *временной*

последовательности одних и тех же молекулярных событий. Именно разнообразие временного развертывания сходных молекулярно-генетических процессов детерминирует различия в морфогенезе разных таксонов.

Эти особенности можно проследить на примере эволюции насекомых. Например, у дрозофилы “полноценный” паттерн сегментов тела устанавливается уже к концу стадии бластодермы. Эмбрионов таких насекомых (мухи, пчелы) называют “зародышами с длинной закладкой” (long-germ).

У таких животных, как кузнечик, синцитий и клеточная бластодерма формируются, как и у дрозофилы, но только малая фракция бластодермы, обозначенная как зародышевая закладка (germ anlage), вносит вклад в развитие эмбриона. Остальная бластодерма дает начало экстраэмбриональным мембранам. Эксперименты показали, что план строения животного в этом случае не представлен полностью в зародышевой закладке. Из нее возникает только головная область зародыша, все более задние части эмбриона генерируются из зоны роста, которая продуцирует соответствующий материал путем пролиферации клеток, последующей за процессом гастрюляции. Такие эмбрионы называют “зародышами с короткой закладкой” (short-germ). Есть эмбрионы с промежуточным типом развития, когда, например, голова и грудь развиваются из зародышевой закладки, а брюшная область генерируется позднее. Все явления такого рода нелегко согласовать с биогенетическим законом, а потому скептическое отношение к нему является преобладающим.

Собственно, в настоящее время этот закон всерьез принимается лишь в отечественной литературе, в западных источниках по эмбриологии и генетике развития он обычно вообще не упоминается или отрицается. Яркий тому пример — книга Р.Рэффа и Т.Кауфмана “Эмбрионы, гены, эволюция” (М.: Мир, 1986). Вот что пишут авторы по этому поводу: “В конечном счете роковые слабости биогенетического закона заключались в его зависимости от ламарковской теории наследственности и в его неременном условии, что новая эволюционная ступень может быть достигнута только как добавление к взрослой стадии непосредственного предка. Вторичное открытие и развитие менделевской генетики на рубеже двух столетий покажет, что в сущности биогенетический закон — это всего лишь иллюзия” (с.30). И еще: “Последний удар биогенетическому закону был нанесен тогда, когда стало ясно, что морфология и морфологические адаптации имеют важное значение не только для взрослого организма, но и для всех стадий его онтогенеза. Если морфология развивающегося организма имеет такое же важное, а может быть, и еще более важное значение, чем его морфология во взрослом состоянии, то это трудно согла-

совать с геккелевской моделью эволюции. В совокупности менделевская генетика, обособленность клеток зародышевой линии и важность морфологических признаков на всем протяжении развития положили конец теории рекапитуляции..." (с. 31).

Тем не менее у нас нет оснований сомневаться в том, что индивидуальное и историческое развитие организмов тесно друг с другом связаны и, следовательно, несмотря ни на что, составляют некое *единство*. В чем же это единство заключается? На мой взгляд, при его оценке следует исходить из того обстоятельства, что как индивидуальное, так и эволюционное развитие основываются на одном и том же материале, а именно ДНК, и потому им должны быть присущи *общие закономерности*.

Едва ли реально представлять развертывание заключенной в ДНК наследственной информации принципиально разным способом в случае онто- и филогенеза, однако в настоящее время общепринято допущение этих различий. Действительно, предполагают, что филогенез реализуется на основе нецелесообразных, ненаправленных процессов и на постепенном накоплении в популяции случайных, т.е. ненаправленных мелких мутационных изменений. Тем не менее исходя из единства индивидуального и исторического развития, а также из единства принципа, лежащего в основе того и другого, гораздо разумнее и логичнее распространить экспериментально выявленные и доказанные особенности индивидуального развития на вторичные, обусловленные ими эволюционные события, которые сами по себе обычно не поддаются точной экспериментальной проверке, а потому формулируются как спекулятивные, "подтянутые" под ту или иную экспериментально не верифицируемую концепцию.

При экстраполяции точных данных, полученных генетикой развития, на филогенетические процессы следует опираться на следующие факты:

- Индивидуальное развитие подчинено реализации развивающимся организмом определенной "цели" — преобразованию во взрослый, дефинитивный организм, и, следовательно, оно *целесообразно*. Отсюда следует предположение о целесообразности и эволюционного процесса, коль скоро его осуществление зависит от того же самого материала — ДНК.
- Процесс онтогенеза не случаен. Он протекает направленно от стадии к стадии, так что прохождение одной стадии с необходимостью влечет за собой переход на следующую, точно запрограммированную стадию развития. Всякого рода случайности исключают точную реализацию плана нормального развития. Отчего же эволюция должна основываться на случайных мутациях и идти неведомо куда по "ненаправленному" пути? Просматривая внимательно различные эволюционные ряды, у представителей ко-

торых имеются сходные структурные образования (крылья — у птиц, у летучих мышей, насекомых, древних рептилий, подобие крыльев у некоторых рыб), можно увидеть наличие как бы предопределенного, генетически “запрограммированного” в самой структуре ДНК (как и в случае индивидуального развития) филогенеза, как бы направленного по некоему “преформированному” каналу. Об этом говорил еще великий российский биолог Л.С.Берг, сформулировавший теорию *номогенеза*.

■ В ходе онтогенеза фазы относительно “спокойного” развития сменяются так называемыми критическими периодами, характеризующимися морфогенетической активностью ядер и активацией формообразовательных процессов. Очевидно (и это подтверждается), и в эволюции длительные фазы стазиса, покоя должны сменяться взрывами видообразования. Иными словами, эволюция носит не градуалистский, а пунктуалистский, скачкообразный характер.

РОЛЬ МАКРОМУТАЦИЙ В ЭВОЛЮЦИИ

Следует отметить, что среди эмбриологов давно наблюдалась тенденция рассматривать феномен эволюции не как результат накопления мелких мутаций под влиянием естественного отбора, постепенно и медленно ведущих к формированию нового вида через бесконечные ряды промежуточных форм, а как следствие внезапных и коренных преобразований процессов онтогенеза, сразу вызывающих появление нового вида. В 1908 г. Е.Раббо (E.Rabaud) допускал, что видообразование может быть сопряжено с мутациями большой амплитуды, проявляющимися на ранних этапах морфогенеза и нарушающими сложную систему онтогенетических корреляций. Е.Гийено (Guyennot, 1921) отметил, что Ж.Бюффон был близок к истине, когда, описывая нелепое строение и форму клюва, характерные для некоторых видов птиц, причислял их к тератологическим уклонениям, едва совместимым с жизнью. Гийено подметил, что одни и те же уродства у некоторых групп беспозвоночных (например, иглокожих) представляются то как случайные индивидуальные особенности, то как постоянные признаки видов, родов и семейств. Он предположил, что нередко катастрофические уродства являются очевидными следствиями макромутаций, изменяющих ход онтогенеза. Это — исчезновение способности к полету у многих птиц открытых пространств (страусы, казуары, эпиорнис), которое отнюдь не является следствием приспособления к бегу, но принадлежит к числу уродств, обрекающих его носителей на единственный образ жизни в ограниченном биотопе. Усатые киты — настоящий парадокс природы и живая коллекция уродств. Гийено считал,

что любое животное можно описать в терминах тератологического языка. Так, передние лапы крота — пример ахондроплазии (нарушение окостенения длинных костей конечностей), среди китов наблюдается двусторонняя эктрометрия (врожденное отсутствие конечностей), у змей — амелия. Организация человека уродлива по сравнению с его предками: таковы, например, анатомические особенности, связанные с вертикальным положением тела, отсутствие хвоста, сплошного волосяного покрова и т.д.

По мнению бельгийского эмбриолога А. Далька (A. Dalcq), со времени кембрия посредством радикальных трансформаций самых ранних стадий эмбриогенеза должны были установиться два-три десятка основных планов строения (архетипов). Резкие преобразования строения, случись они у взрослого, обернулись бы для него катастрофой и он был бы обречен на гибель. Однако зародыш, как отмечает Дальк, в силу чрезвычайной пластичности и присущей ему высокой регуляционной способности мог бы их перенести. Основой эволюционного процесса он считает “онтомутацию”, которая заключается в резких, глубоких, радикальных и в то же время жизнеспособных трансформациях в цитоплазме яйцеклетки как морфогенетической системы.

Особенно ясно положения о филогенетической роли резких отклонений эмбрионального развития были сформулированы Р. Гольдшмидтом. Он разработал стройную концепцию макроэволюции, основываясь на принципах генетики развития. Его взгляды выражены в следующих постулатах.

1. Макроэволюция не может быть понята на основе гипотезы о накоплении микромутаций. Она сопровождается реорганизацией генома, реорганизацией хромосом.

2. Изменения хромосомного “паттерна” могут вызывать значительный фенотипический эффект независимо от точковых мутаций.

3. Этот фенотипический эффект основывается на преобразовании систем межтканевых взаимодействий в процессе индивидуального развития и может иметь эволюционное значение, обуславливая появление так называемых “многообещающих уродов”, значительно отклоняющихся в своем строении от нормы. Они могут быть преадаптированы к существованию в определенных условиях среды и, попав в эти условия, дать начало новым таксономическим единицам.

4. Системная реорганизация онтогенеза реализуется либо через эффекты генов-модификаторов, либо благодаря макромутациям, существенно изменяющим функционирование структур типа эндокринных желез, продуцирующих различные гормоны и оказывающих влияние на развитие организма в целом.



Рис. 13.5. Николай Николаевич Воронцов.

Выдающийся зоолог, цитогенетик и эволюционист. Исследовал роль макромутаций в эволюции. Описал мозаичную эволюцию у грызунов и симпатрическое видообразование. Открыл роль сейсмических факторов в динамике эволюционного процесса

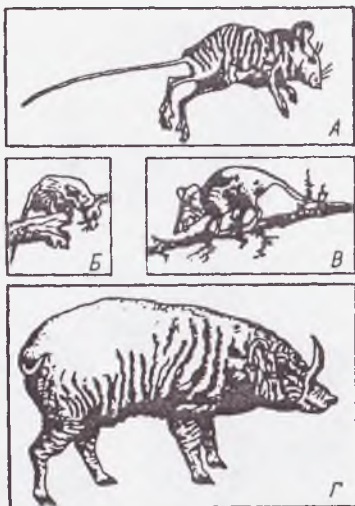
Гольдшмидт приводит в качестве примера такие фенотипические эффекты, основывающиеся на действии гормонов, как акромегалия и гигантизм, карликовость, ахондроплазия. С. Стоккард (С. Stockard) связывает с функцией эндокринных желез многие расовые признаки у собак. Д.К.Беляев продемонстрировал существенные сдвиги в функции эндокринных желез лисиц при их одомашнивании.

В начале 30-х годов XX в. были проведены интересные эксперименты на рыбе *Peryophthalmus megaris*, продемонстрировавшие возможность значительной морфогенетической перестройки в условиях трехлетнего непрерывного введения тироксина. У рыбки удлинялись грудные плавники, которые приобретали внешнее сходство с конечностями амфибий, а рассеянные в норме эндокринные элементы, продуцирующие тироксин, группировались в более компактные образования, также наподобие свойственным амфибиям. Изложенные факты дали основания Гольдшмидту сделать вывод о значительном фенотипическом эффекте тех изменений генома, которые отражаются на состоянии механизмов гормонального контроля. Они могут быть ответственны за инициацию серии изменений преадаптивного характера. Российский зоолог Н.Н.Воронцов (рис. 13.5), разделявший взгляд Р.Гольдшмидта, представил два бесспорных факта макромутационного возникновения безволосых видов млекопитающих за счет единственной макромутации типа *hairless* (рис. 13.6). Эти факты противоречат концепции облигатного градуализма. Воронцов полагал, что одним из ведущих факторов, индуцирующих макромутации, является сейсмическая активность. Именно в областях с повышенной сейсмической активностью он обнаружил взрывы видообразовательных процессов у грызунов. На основании собственных данных он подтверждал предположение об африканском появлении первых людей.

Другим примером макромутаций могут служить гомеозисные мутации, выводящие признак на уровень нового таксономичес-

Рис. 13.6. Роль макромутаций в эволюции (по: Воронцов, 1988).

Безволосые мутанты хомячков *Peromyscus maniculatus* (А—В). Видны сохранившиеся вибриссы и складки ороговавшего эпителия. В норме особи этих видов покрыты обычным меховым покровом. А — “носороговый” (*rhinoceros*), редкий рецессивный мутант. Гомозиготы *rh/rh* сохраняют ювенильный волосной покров, который начинает выпадать в возрасте 2 недель, депиляция завершается в течение нескольких недель. Помимо мощно развитых “носороговых” складок кожи видны удлиненные против нормы когти — эффект проявления той же мутации. Б — хомячок в возрасте 6,5 месяцев, нормально пигментированный хомячок — гомозигот по мутации *hairless*. В — молодой безволосый хомячок-альбинос (гомозигот по двум рецессивным — *hairless* и *albino* — несцепленным признакам). Г — безволосость как систематический признак у цейлонской бабирусы



кого ранга. В целом постулируется, таким образом, существование адаптаций, возникновение которых не требует ни ламарковского, ни селектогенетического пути.

Один из самых ведущих палеонтологов современности О.Шиндевольф (рис. 13.7), исходя из факта предварения филогении онтогенезом, выдвинул теорию типострофизма. В ней он игнорировал процессы, протекающие в популяциях, отверг эволюционную роль случайности, признав носителем эволюции отдельную особь. Он считал, что отсутствие промежуточных форм в палеонтологических останках объясняется особенностями эволюционного процесса, который заключается в быстрых трансформациях форм, связанных с резкими изменениями уровня космической и солнечной радиации.

Сходные взгляды под названием “теория прерывистого равновесия” исповедуют американские палеонтологи Н.Элдридж (N.Eldredge), Ст.Стэнли (S.Stanley) и Ст.Гоулд (S.Gould). Они также придают важное значение в эволюции педоморфозу, т.е. таким изменениям онтогенеза, которые характеризуются полной утратой взрослой стадии и



Рис. 13.7. Отто Генрих Шиндевольф. Крупнейший палеонтолог современности.

Один из создателей современной палеонтологии. Сторонник концепции “взрывного” видообразования. Ему принадлежит крылатая фраза: “Первая птица вылетела из яйца динозавра”



Рис. 13.8. Крупнейший отечественный эволюционист, академик Ю.П.Алтухов, директор Института общей генетики РАН им. Н.И.Вавилова. Лауреат Государственной премии.

Автор пионерских работ по популяционной генетике рыб, имеющих огромное значение для развития рыбного хозяйства в нашей стране. Успешно исследует генетические взаимоотношения онто- и филогенеза

соответствующим укорочением индивидуального развития, когда последней становится стадия, бывшая прежде личиночной. Животные приобретают способность размножаться именно на этой стадии. По-видимому, таким путем возникли аппендикулярии, некоторые группы хвостатых земноводных (протеи, сирены), насекомых (гриллоблаттиды), паукообразных (ряд почвенных клещей).

Российский генетик Ю.П.Алтухов (рис. 13.8) подразделил генотип на две части — вариабельную, обеспечивающую внутривидовую изменчивость и разнообразие за счет обычных мутаций, и консервативную, предназначенную для сохранения постоянства данного вида. Процесс видообразования связан только со второй частью генома. Мутации в этой области генома, как правило, летальны. Однако возможны и нелетальные изменения типа макромутаций, которые ведут к видообразовательным событиям. Со взглядами Ю.П.Алтухова перекликается предложение М.Д.Голубовского (высказанное в 70-е годы XX в.) различать в геноме конститутивную и факультативную части. Первая включает в себя набор структурных генов и регуляторных районов, постоянно присутствующих в геноме и являющихся материальным “воплощением” постоянства вида. Вторая состоит из повторяющихся последовательностей, подвижных генетических элементов и регуляторных районов, характеризующихся непостоянным присутствием в геноме и являющихся основной “движущей” силой эволюции, в особенности в случае каких-то катастрофоподобных изменений окружающей среды (сейсмические факторы, радиация и пр.).

КАК ОНТОГЕНЕЗ МОЖЕТ “ДВИГАТЬ” ФИЛОГЕНЕЗ”?

Каковы, однако, те конкретные события и процессы, которые могут обуславливать преобразование типов онтоге-

неза? На мой взгляд, это особый вид мутаций, точкой приложения которых являются временные параметры созревания взаимодействующих систем в развитии. В сущности, весь процесс онтогенеза представляет собой цепь эмбриональных индукций, взаимодействий *индуктор — компетентная ткань*. Полноценное осуществление эмбриональной индукции зависит от того, насколько точно по времени созревание индуктора соответствует созреванию компетентной ткани. В нормальных условиях реагирующая компетентная система приобретает способность отвечать формообразовательным процессом на стимулирующий импульс индуктора в тот момент времени, когда индуктор становится способным продуцировать этот импульс. Рассогласования во времени созревания индуктора и компетентной ткани ведут к нарушению соответствующих морфогенетических процессов. Мутации, вызывающие такие рассогласования, по-видимому, распространены достаточно широко. Так, у мышей известны мутанты с нарушением индуктивных взаимодействий между выростом вольфова протока и метанефрогенной мезенхимой, которое обусловлено временным рассогласованием в созревании этих тканей, в результате чего нарушается развитие почки. При совмещении в органной культуре индуктора и компетентной системы от мутантных и нормальных зародышей почечная ткань развивается нормально. Примером такого процесса являются описанные в главе восьмой результаты наших с О.И. Богомоловой экспериментов на зародышах аксолотля. Как отмечалось, становление пигментации у амфибий определяется взаимодействием эпидермиса, выступающего в качестве индуктора, и ткани нервного гребня, который является источником меланобластов, мигрирующих субэпидермально под влиянием индуктора. Одна из мутаций (*d*) вызывает в гомозиготе (*dd*) резкое ослабление окраски аксолотля: у животного слегка окрашена лишь спина (так называемая белая раса аксолотлей). Мы показали, что отсутствие окраски детерминируется не утратой индуцирующих свойств эпидермиса или способности меланобластов мигрировать и синтезировать пигмент, а рассогласованием времени созревания этих двух взаимодействующих закладок, составляющих, таким образом, единую корреляционную систему.

Типичным случаем, который характеризуется распадом, дезинтеграцией такого рода корреляционных систем, является *доместикация*. Это было продемонстрировано И.И. Шмальгаузенем и Д.К. Беляевым. Корреляционная система оказывается нарушенной во многих случаях, не нарушается лишь функционирование жизненно важных органов. Например, в окраске домашних животных обычно отмечается неправильное распределение пятен различного цвета (у коров, собак, кошек, морских свинок), чего не бывает у диких животных, где имеется либо однотонная окраска, либо

закономерное распределение полос или пятен. Следует отметить, что генетический контроль однотонной серой окраски достаточно сложен, тем не менее сложный корреляционный механизм легко разрушается. Мутации, проявляющиеся в процессе domestikации животных (по-видимому, в своем большинстве накопленные ранее, но не распространявшиеся в популяциях в силу малой жизнеспособности мутантов в естественной обстановке), в условиях их размножения под охраной человека действуют на уровне корреляционных соотношений. При этом существенные корреляции часто теряются, а взамен устанавливаются совершенно новые. Развитие хохлы и перьев на ногах у кур, а также курдюка у овец обусловлены действительно новыми корреляциями. Установление новых признаков связано с установлением новых корреляций. И.И. Шмальгаузен рассматривает редукцию органов как распад корреляционных систем, а атавизм — как локальную реинтеграцию, в основе которых лежат сдвиги во времени наступления формообразовательных реакций.

ЗНАЧЕНИЕ ВРЕМЕНИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ЭВОЛЮЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Детальный биохимический анализ развития личиночных и имагинальных тканей у разных видов *Drosophila* группы *virilis* позволил выявить видовую специфичность времени биохимического становления исследованных тканей. Межлинейные различия в поведении лабораторных животных в ряде случаев являются результатом различных скоростей накопления нейрхимических субстратов в ходе развития. Каковы возможные фенотипические основы выраженной вариабильности формообразования, обусловленной сдвигами временных параметров созревания взаимодействующих тканей?

Предположим, что в развивающейся системе имеется два гена A_1 и A_2 (которые могут быть аллельными и не-аллельными, что в общем не принципиально для данного случая), осуществляющие

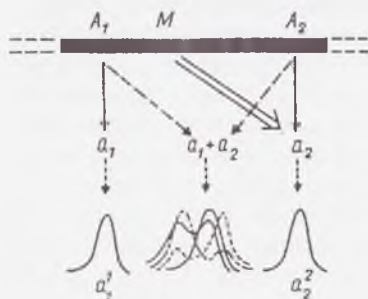


Рис. 13.9. Гипотетическая схема макромутации (М), влияющей на морфогенетические процессы (по: Корочкин, 1993).

a_1 — продукт кодируется геном A_1 и детерминирует реализацию морфогенетической реакции. $a_1 \times a_2$ — продукт, кодируется геном A_2 и принимает участие в морфогенетических процессах только под влиянием гена-модификатора M . В этом случае он детерминирует реализацию морфогенетической реакции a_1^2 . Взаимодействие продуктов обеспечивает вариации в морфогенетических событиях, контролируемых каждым из них

контроль соответствующих морфогенетических реакций (a_1^1 и a_2^2) через синтез специфических веществ a_1 и a_2 (рис. 13.9). Очевидно, при многоуровневом контроле реализации признака сам факт транскрипции данного локуса еще не означает, что контролируемый им признак будет выражен в фенотипе. Существуют многочисленные генетические контролирующие элементы, которые способны подавить проявление признака на том или ином этапе его осуществления.

Допустим, что морфогенетическая реакция, контролируемая геном A_2 , не имеет выхода в фенотип вследствие блока на том или ином уровне регуляции, например, торможения синтеза вещества a_2 или рассогласования времени его синтеза с временем созревания реагирующей системы. В таком случае осуществится лишь один морфогенетический процесс — a_1^1 . Допустим теперь, что в одном из генов-модификаторов (M) произошла мутация, результатом которой стали совмещение времени синтеза вещества a_2 и созревания реагирующей системы, а, следовательно, и выход в фенотип признака, контролируемого геном A_2 . В таком случае осуществляется также событие a_2^2 . Если между реакциями a_1^1 и a_2^2 имеет место взаимодействие, то возможны различные дополнительные, “промежуточные” формообразовательные процессы. Поскольку на относительную выраженность каждой из этих реакций в фенотипе будут влиять многочисленные гены-модификаторы, количество различных возникающих при этом фенотипических вариантов практически безгранично. Следует также учитывать возможность того, что ген M контролирует уровень того или иного гормона в развивающемся организме. Это в свою очередь существенно отразится на общем гормональном балансе. Последний же играет важную роль в регуляции особенностей (в том числе и временных) фенотипического выражения целого комплекса различных признаков и осуществлении разнообразных морфогенетических реакций.

Изменения временных характеристик, например преждевременная или задержанная пролиферация определенных групп клеток, способны преобразить фенотипический “облик” организма. Хорошие примеры такого “преображения” можно найти в работах д'А.Томпсона. Как показано на заимствованном из его работы рисунке (рис. 13.10), путем простого преобразования координат достигаются значительные различия между органическими формами. Так, заменив координаты рисунка, изображающего морскую рыбу *Scaurus*, на изогнутую ортогональную систему, мы получим изображение не очень отдаленного рода *Pomacanthus*, которое по отношению к *Scaurus* вполне можно назвать “счастливым монстром” Р.Гольдшмидта. По-видимому, именно такие преобразования реализуются в ходе морфогенетического процесса, ход которого изменен макромутацией.

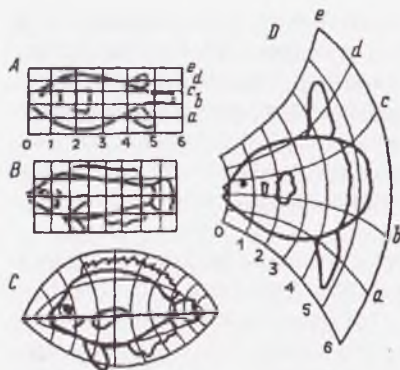


Рис. 13.10. Трансформации Д'Арси Томпсона (по: Корочкин, 1993).

Рисунок демонстрирует, что изменения (вариации) в направлении роста и клеточной пролиферации (линии координатной сетки) во время развития могут вызвать существенные сдвиги в фенотипе животных (в данном случае рыбок). Макромутации, вызывающие такого рода изменения, способны продуцировать изменения видоспецифических, а то и родоспецифических признаков посредством, например, сдвигов скорости митотического цикла. *A* — *Diodon*; *B* — *Scaurus*; *C* — *Pomacanthus*; *D* — *Orthogoriscus*. Остальные объяснения в тексте

И в этом смысле сходство или различие органических форм и структур отнюдь не является доказательством их родственного происхождения. Отношение в этом случае подобно известным в логике отношениям равносильности. Равносильные формулы — это те, которые независимо от значений истинности входных переменных характеризуются идентичностью выходных значений истинности. Например:

		$(p \rightarrow \sim q)$		$\sim(p \wedge q)$			
p	q	$\sim q$	$(p \rightarrow \sim q)$	p	q	$p \wedge q$	$\sim(p \wedge q)$
и	и	л	л	и	и	и	л
л	и	л	и	л	и	л	и
и	л	и	и	и	л	л	и
л	л	и	и	л	л	л	и

Разве не подобно отношениям равносильности развитие камерного глаза у головоногих и позвоночных (рис.13.11)? Схема отчетливо демонстрирует, как на основе совершенно различных морфогенетических процессов формируются подобные органы. Именно таким путем может быть осуществлено конвергентное развитие признаков у филогенетически неродственных организмов. В основе событий, последовательно строящих данную структуру, лежит, очевидно, генетически запрограммированный план развития. Последовательное развертывание этих событий регулируется сложным и точно настроенным генетическим механизмом, начало которому может положить одноразовая макромутация Гольдшмидта.

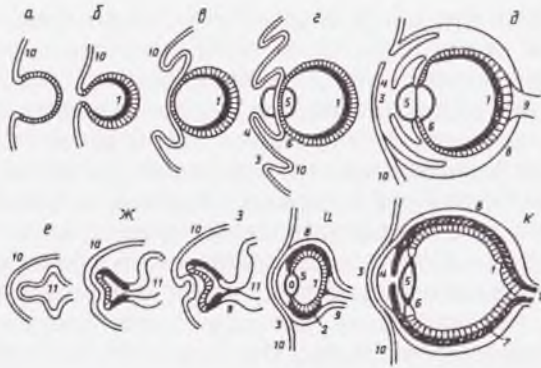


Рис. 13.11. Схема эмбрионального развития и строения глаза головоногих моллюсков (а-д) и позвоночных (е-к) (по: Иорданский, 1979).

Глаза этих чрезвычайно далеких друг от друга групп животных обладают замечательным сходством общей конструкции и многих деталей строения (хрусталик со специальным мышечным аппаратом, осуществляющим его аккомодацию, радужина, окружающая зрачок и способная изменять его диаметр, склера, роговица и др.). Однако у головоногих глаза развиваются как впячивание покровов, у позвоночных — как боковые выросты головного мозга.

1 — сетчатка; 2 — пигментная оболочка; 3 — роговица; 4 — радужина; 5 — хрусталик; 6 — ресничное (эпителиальное) тело; 7 — сосудистая оболочка; 8 — склера; 9 — зрительный нерв; 10 — покровная эктодерма; 11 — головной мозг

РОЛЬ ГЕТЕРОХРОМАТИНА В ЭВОЛЮЦИИ

Что же, однако, заставит гены изменять время экспрессии? Есть основания предполагать, что существенная роль в этом принадлежит гетерохроматиновым участкам хромосом, которые могут составлять от 20 до 80% генома.

У дрозофилы гены, необходимые для обеспечения жизнеспособности и плодовитости самцов, были локализованы в Y-хромосоме и центромерном гетерохроматине хромосомы 2. Гетерохроматиновые области оказывают действие на компенсацию дозы рДНК, экспрессию кластера генов, тесно сцепленных в хромосоме 2, мейотическое поведение хромосом, рекомбинацию, супрессию эффекта положения. Более того, специфические области Y-хромосомы подавляют экспрессию X-сцепленных генов в семенниках.

Фенотипический эффект изменения количества гетерохроматина часто проявляется в раннем эмбриогенезе, обуславливая, например, снижение количества клеток на орган или сохранение фетальных характеристик после рождения. Именно гетерохроматину и в первую очередь входящей в его состав сателлитной ДНК приписывают роль регулятора скорости клеточного деления и роста и, следовательно, временных параметров индивидуального развития.

Гетерохроматин и сателлитная ДНК, возможно, оказывают воздействие на время экспрессии генов двояким способом: они могут ассоциироваться с определенным классом белков, которые влияют на структуру хроматина, и могут также влиять на трехмерную организацию интерфазного ядра. Так, нарушение пигментации у аксолотлей, связанное с изменениями временных параметров созревания тканей, обусловлено, вероятно, делецией кусочка гетерохроматина в области ядрышкового организатора. У *Drosophila littoralis* получены лабораторные сублинии, отличающиеся наличием или отсутствием гетерохроматинового блока в районе G4 хромосомы 2, прилежащем к кластеру генов, кодирующих изоферменты эстеразы. Оказалось, что присутствие гетерохроматинового блока сдвигает время экспрессии изоферментов эстеразы в различных органах дрозофилы в ходе онтогенеза. Особенно интересны случаи, когда гетерохроматиновый блок локализуется вблизи района G5 хромосомы 2 *D. littoralis*, содержащего гены, кодирующие три изофермента бета-эстеразы, в том числе эстеразы, расщепляющей ювенильный гормон (ЮГ-эстеразы). В этом случае особи, гомозиготные по гетерохроматиновому блоку, погибают на стадии куколки. Характерно также и то, что не только задерживается время появления изоферментов ЮГ-эстеразы, но и тормозится свойственный нормальному развитию рост их активности. Предполагается, что сохранение низкого уровня активности ЮГ-эстеразы обуславливает дисбаланс в соотношении экдизон/ювенильный гормон, так что сложившийся гормональный статус развивающейся дрозофилы не позволяет завершить метаморфоз. И.Ю. Раушенбах выдвинула гипотезу, согласно которой этот изофермент, являясь органо- и тканеспецифичным, составляет целостную систему вместе с нейроэндокринными органами. Эта система регулирует адаптивную реакцию дрозофилы. В результате селекции в данной фенотипической системе отбираются комплексы генов-модификаторов, контролирующих экспрессию ЮГ-эстеразы в критические моменты развития особей, способствуя сохранению или элиминации сложившихся генотипов в определенных условиях среды. В соответствии с этими представлениями колебания активности ЮГ-эстеразы являются частью реакции онтогенетической системы, принимающей участие в регуляции процесса индивидуального развития и, возможно, играющей исключительную роль в этой регуляции. Внезапные и глубокие наследственные перестройки функционирования именно таких систем могут произвести на свет "многообещающих уродов" с эволюционным будущим.

Таким образом, можно себе представить, что перераспределение гетерохроматина вызывает функциональную реорганизацию генома в целом, либо затрагивает лишь отдельные признаки, либо

достаточно глубоко преобразует фенотипическое становление систем таких признаков.

Особый интерес в связи с этим представляет организация кариотипа у разных видов *Drosophila* группы *virilis*, обнаруживающих отчетливые различия в количестве гетерохроматина на геном и отчасти в его распределении по хромосомам. Эта группа дрозофилид включает по крайней мере 12 видов, объединяемых в филалы по степени морфологического и биохимического сходства, а также скрещиваемости между собой. Различные филалы очень четко различаются по количеству сателлитной ДНК, собранной преимущественно в гетерохроматиновых районах хромосом.

Так, у *D. virilis* количество сателлитной ДНК составляет почти 50% генома. Филала *texana* (*D. texana*, *D. americana*, *D. novamexicana*, *D. lummei*) характеризуется значительным уменьшением количества гетерохроматина по сравнению с *D. virilis*. В филалах *littoralis* и *montana* наблюдается дальнейшее снижение количества гетерохроматина, так что значительная часть блока альфа-гетерохроматина полностью выпадает (рис. 13.12).

Дж. Голл (D. Gall) с сотрудниками обнаружили, что имеется три главных типа сателлитной ДНК у *D. virilis*: 25% генома — последовательность нуклеотидов 5' АСАААСТ, 8% генома — 5' АТАААСТ и 8% — 5' АСАААТТ. Была также продемонстрирована тканевая

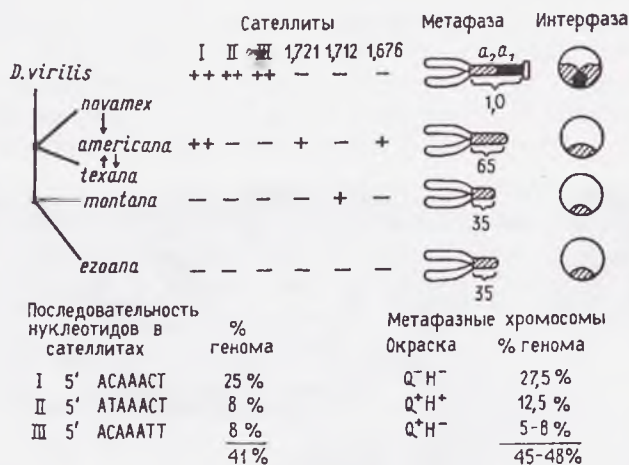


Рис. 13.12. Взаимосвязь между наличием сателлитных ДНК и гетерохроматина у близких видов *Drosophila* группы *virilis* (по: Holmquist, 1975).

Слева — эволюционное древо видов группы *virilis*; в центре — наличие (++) или отсутствие (-) различных сателлитов у видов. справа — количество гетерохроматина и степень его светимости в метафазных хромосомах и интерфазных ядрах. За единицу принято количество гетерохроматина у *D. virilis*; альфа1 — проксимальный, ярко флуоресцирующий и альфа2 — дистальный, не флуоресцирующий блок гетерохроматина

специфичность в распределении и дифференциальной репликации разных фракций сателлитной ДНК (см. Главу третью).

Распределение небольших количеств сателлитной ДНК, содержащихся в эухроматиновых районах, также различается у разных видов *Drosophila* группы *virilis*.

Томский цитогенетик В.Н.Стегний сделал выдающееся открытие, показав, что различия в количестве сателлитной ДНК сопровождаются видоспецифическими различиями в трехмерной организации хроматина ядра, в спецификации точек прикрепления хромосом к ядерному матриксу. При этом никогда не обнаруживается внутривидовое разнообразие по данному признаку, а следовательно, его изменение происходит в результате макромутации, имеющей видообразовательное значение.

Какие же факторы вызывают в ходе эволюции перераспределение гетерохроматина? Л.И.Корочкин и М.Б.Евгеньев (рис. 13.13; 13.14) предположили, что такого рода события происходят благодаря подвижным генетическим элементам, как бы “растаскивающим” кусочки гетерохроматиновой ДНК по разным ячеекам генома, результатом чего и являются голдшмидтовские макромутации. Подвижные генетические элементы (ПГЭ) могут по крайней мере двояким способом влиять на реализацию наследственной информации в развитии. Во-первых, внедряясь в область структурного гена, они изменяют скорость транскрипции, в результате чего концентрация кодируемого этим геном белка изменяется в несколько раз. Так, в лаборатории американского генетика К.Лаури (K.Lauri) было показано, что инсерция ПГЭ в зону гена, который кодирует алкогольдегидрогеназу, вызывает снижение активности фермента примерно в 4 раза. Если в подобной ситуации окажется ген, кодирующий тот или иной фактор, формирующий

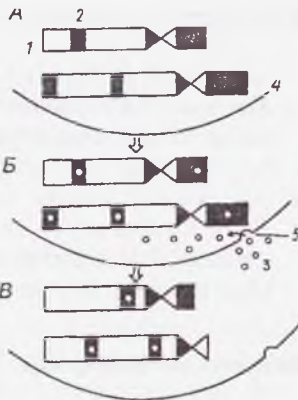


Рис. 13.13. Всесоюзная конференция по биологии и генетике развития дрозофилы во Львове в 1987 г. В первом ряду слева направо — организаторы конференции М.Б.Евгеньев, Л.И.Корочкин, Ю.Н.Александров

Рис. 13.14. Гипотетическая схема включения подвижных генетических элементов в процесс видообразования (по: Корочкин, 1993).

А — нормальный паттерн распределения сателлитной ДНК. Б — инсерция подвижных генетических элементов. В — перераспределение сателлитной ДНК

1 — хромосомы; 2 — сателлитная ДНК; 3 — подвижные генетические элементы; 4 — ядерная мембрана; 5 — изменения "восприимчивости" к подвижным генетическим элементам



полярный градиент, это существенно скажется на развитии эмбриона. Во-вторых, ПГЭ способны изменять временной паттерн экспрессии генов, что точно так же оказывает влияние на взаимодействие тканей в развитии и соответственно на морфогенетические процессы.

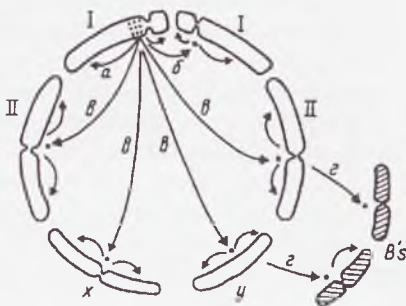
Иными словами, происходящие в определенных точках генома элиминации, вставки и перераспределения блоков сателлитной ДНК, обусловленные их "захватом" перемещающимися подвижными генетическими элементами, могут быть механизмом реализации направленности эволюционного процесса, поскольку сайты вставок ПГЭ расположены закономерно, а не разбросаны в беспорядке по геному. Такого рода перемещения, по-видимому, способствуют "взрывам" различных инверсий и транслокаций, как правило, сопровождающих видообразование В работах М.Б.Евгеньева четко продемонстрирована корреляция в расположении сателлитной ДНК и ПГЭ у различных видов *Drosophila* группы *virilis*, что является косвенным подтверждением этой гипотезы.

Как показал английский генетик Г.Довер (G.Dover), перемещения ПГЭ носят "массовый" характер и связаны с резким увеличением их количества на геном, что могло бы являться молекулярно-генетическим механизмом сальтационного видообразования. Возможный механизм этого процесса иллюстрирует рис. 13.15.

И все же основанные на данных генетики развития эволюционные представления являются лишь гипотетическими, и решающее слово пока что остается за палеонтологами.

Рис. 13.15. Схема внутригеномной миграции последовательности с исходной хромосомы I на гомологичные и негомологичные хромосомы (по: Dover, 1989).

Распространение может быть связано либо с транспозицией элемента, либо с асимметричной конверсией в диспергированном семействе членов дикого типа членами варианта



Рекомендуемая литература

1. *Алтухов Ю. П.* Генетические процессы в популяциях. М.: Наука, 1983.
2. *Корочкин Л. И.* Влияние концепции целостности живых систем на становление системной биологической парадигмы//Природа биологического познания. М.: Наука, 1991. С. 142—162.
3. *Назаров В. И.* Учение о макроэволюции. М.: Наука, 1991.
4. *Рэфф Р., Кофман Т.* Эмбрионы, гены, эволюция. М.: Мир. 1986.
5. *Стегний В. Н.* Архитектоника генома. Системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во НГУ, 1991.

? Вопросы для повторения

1. В чем единство индивидуального и исторического развития?
2. Какова роль макромутаций в эволюции?
3. Как онтогенез может “двигать” филогенез?
4. Каково значение времени экспрессии генов в эволюционном процессе?
5. Какова роль гетерохроматина в эволюции?

ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

На одном из международных симпозиумов, посвященных многочисленным аспектам генетики развития, эмбриологии и генетики пришли к единому мнению, что механизмы онтогенеза на различных уровнях его реализации *универсальны и консервативны*.

Можно сказать, что строительные “кирпичики”, а порой и целые блоки, из которых складывается будущий организм, похожи друг на друга. Сходны и системы управления “строительством”. Специфика же развития разных организмов формируется за счет временных и пространственных различий в последовательности соединения этих “кирпичиков” в некое целостное “образование” (рис. 14.1).

Изложенный в предыдущих главах материал позволяет сформулировать общие закономерности генетической регуляции онтогенеза, которые проявляются в ходе такого “строительства”. Эти закономерности касаются:

- *взаимодействия генов в развитии;*
- *организации генных систем (“сетей”), контролирующих развитие,*
- *особенностей функционирования этих систем.*

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕНОВ В РАЗВИТИИ

■ Сходство генотипической структуры ядер клеток многоклеточного организма не препятствует регионализации развивающегося зародыша, его постепенно прогрессирующей и последовательной, строго закономерной гетерогенизации благодаря *дифференциальной экспрессии генов*. У эукариот дифференциальная экспрессия носит *многоуровневый характер*, так что “включение” того или иного гена и активация его транскрипции еще не означают выхода кодируемого им признака в клеточный фенотип. Как было показано в предыдущих главах, путь от гена к признаку тернист и сложен и в соответствии с догадками родоначальников генетики

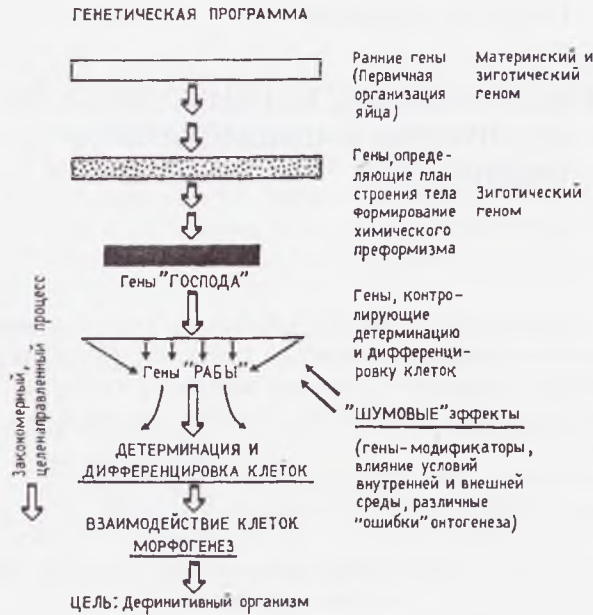


Рис. 14.1. Схема генетического контроля индивидуального развития на разных этапах

развития зависит от значительной части генома, от продуктов многих генов и градиента их распределения в развивающемся зародыше, а также от особенностей их взаимодействия друг с другом и с конкретным геном, функции которого изучаются. Основу индивидуального развития составляет, следовательно, *взаимодействие генов*, их *системное*, а не автономное функционирование. В какой-то степени правы были и Т.Г.Морган, и Р.Гольдшмидт, поскольку фактически “работают” обе представленные ими модели, так что дифференциальная экспрессия генов может быть реализована на уровне как дифференциальной транскрипции, так и дифференциальной трансляции, а также на уровне посттрансляционных событий, на тканевом или даже организменном уровне.

■ Система генов, регулирующих развитие того или иного признака (или морфогенетического процесса) организована по *иерархическому принципу*, так что в каждом регуляторном генетическом “каскаде” существуют “*гены-господа*” и “*гены-рабы*”. Первые в случае их активации являются своеобразным триггером, “разрешающим” реализацию определенного морфогенетического процесса и включающим “каскад” генов, осуществляющих этот процесс. С генами такого рода мы встречались при описании работ В.Геринга о морфогенезе глаза у дрозофилы.

■ Генетические и молекулярно-генетические системы, управляющие развитием, удивительно консервативны и присущи как примитивным, так и высокоразвитым организмам. Как мы видели, мышинный ген *small eyes* способен заменить ген *eyeless* дрозофилы и “запустить” процесс развития глаза в ходе метаморфоза развивающейся мухи. Специфичность развивающегося органа (возникает глаз дрозофилы, а не мышцы!), очевидно, обусловлена особенностями функционирования генов промежуточного звена между “генами-господами” и “генами рабами”, например генами типа гомеозисных (“гены-селекторы”). От них может зависеть синтез продуктов, которые обуславливают специфические межклеточные взаимодействия, детерминирующие становление вполне определенной *формы*.

■ Весь процесс индивидуального развития осуществляется, как мы имели возможность убедиться, на основе двух типов воздействия генов друг на друга: *активирующего* и *тормозящего*. Таким образом, регионализация эмбриона, спецификация его клеток, их взаимовлияния в ходе морфогенеза основаны на “игре” этих факторов и установлении некоего “баланса” таких антиномических состояний, разных в различных областях развивающегося зародыша. Итогом этого тонко сбалансированного процесса является неравномерное распределение генопродуктов вдоль эмбриональных осей, так что создается система полярных градиентов распределения биологически активных веществ, своеобразная химическая мозаика, химически преформированный “план строения” организма, воплощаемый в жизнь в ходе онтогенеза.

Специфическое соотношение различных генопродуктов в различных регионах зародыша есть молекулярно-генетическая основа так называемой *позиционной информации* — понятия, широко используемого в современной экспериментальной эмбриологии, но до сих пор конкретно не раскрытого. Под позиционной информацией подразумевается зависимость судьбы той или иной клетки от того положения (позиции) в системе развивающегося организма, которое она занимает. Совершенно очевидно, что “сигналом”, передающим позиционную информацию как раз и являются особенности молекулярной “микросреды”, в пределах которой происходит становление данной клетки (клеток).

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ

■ Некоторые генные системы, последовательно включающиеся в процессе развития, организованы по *кластерному принципу*. В частности, порядок расположения *НОХ*-генов соответствует временной последовательности их активации в ходе развития. Подоб-

ного рода явления описаны также у некоторых эукариот, например у дрожжей.

■ *Колинеарность в расположении генов и контролируемых ими признаков.* Этот удивительный феномен означает соответствие линейного расположения генов линейной последовательности распределения детерминируемых ими признаков в теле развивающегося зародыша. Об этом говорилось в главе о гомеозисных генах: признаки, которые они контролируют (голова, грудь, брюхо), расположены точно в той же последовательности, что и соответствующие комплексы генов (*ANT-C, BX-C, abd-A, Abd-B*). Иными словами, в определенном участке хромосомы как бы “нарисована” в молекулярных терминах миниатюрная мушка-дрозофила или мышка, или человек. Получается нечто похожее на то, о чем думали преформисты XVII в. Только они полагали, что в половой клетке присутствует миниатюрный человек в буквальном смысле этого слова, в действительности же его “образ записан”, но в определенной структуре клетки, несущей наследственную информацию (хромосома), и на специфическом языке (молекулярно-генетическом).

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ РАЗВИТИЕ

■ *“Опережающее” функционирование генов в ходе онтогенеза.* Как уже отмечалось, многие продукты синтезируются в развивающемся зародыше “заранее”, часто задолго до того, как они будут востребованы. Это, в частности, вещества, которые участвуют в “разметке” плана строения организма (продукты генов сегментации, гомеозисных генов), в осуществлении эмбриональной индукции (индуцирующие вещества и их ингибиторы). Некоторые молекулы, например глобин, образуются еще в яйцеклетке, задолго до того, как начнут выполнять свои функции в клетках эритроидного ряда.

■ *Автономия частей при единстве целого.* Это качество функциональной динамики генома отчетливо проявляется в раннем эмбриогенезе при созревании индуктора (хордомезодермы) и компетентной ткани (нейроэктодермы). Очевидно, генетические системы, регулирующие созревание индуцирующих свойств хордомезодермы и способность компетентной ткани реагировать на воздействие индуктора, функционируют в автономном режиме, независимо от того, находится ли данная развивающаяся эмбриональная закладка в составе целого зародыша или вне его. *Целостность* же развивающейся системы обеспечивается за счет того, что в норме сроки созревания двух взаимодействующих тканей строго “подогнаны” один к другому, как бы “синхронизирова-

ны", в результате чего достигается нормальное течение онтогенетического процесса.

Как уже отмечалось, мутации, которые вызывают рассогласование времени созревания взаимодействующих систем в развитии, нарушают целостность и гармонию морфогенетических событий и ведут к появлению различного рода дефектов развития.

■ Можно выделить *три автономно функционирующих генетических системы*, контролирующих три соответственно автономных процесса:

- формообразовательные события;
- дифференцировка специфических морфологических типов клеток;
- химическая спецификация этих клеток.

Известны случаи, когда процесс нейруляции проходит нормально, и нервная трубка замыкается, однако дифференцировки входящих в ее состав нейробластов не происходит. Точно так же возможен синтез нейроспецифических белков в клетках. В частности, в ходе экзогастроуляции, когда происходит не выпячивание, а, напротив, выпячивание хордомезодермы, эктодерма как бы отделяется от остальной части зародыша и морфогенетические процессы в ней не происходят, так что и нервная трубка не формируется, и дифференцировки нейробластов не происходит, однако нейроспецифические белки в них синтезируются!

Таковы в общих чертах особенности функционирования генов, контролирующих развитие, — общие для организмов, принадлежащих самым разнообразным таксонам.

Содержание

Предисловие.....	3
Введение.....	4
Глава первая. ЧТО ТАКОЕ БИОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ И КАК ОНА СООТНОСИТСЯ С ГЕНЕТИКОЙ. ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ — ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АСПЕКТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ.....	7
Этапы становления генетики развития.....	8
Глава вторая. ВЕДУЩАЯ РОЛЬ ЯДРА В РЕГУЛЯЦИИ ФОРМО- ОБРАЗОВАНИЯ.....	24
Дискуссии о роли ядра в развитии.....	24
Опыты по доказательству ведущей роли ядра в развитии.....	24
Обратимы ли изменения ядер в развитии?.....	29
Проблема клонирования животных. Пути решения, сложности и во- просы.....	31
Клон и копия — это одно и то же или нет?.....	35
Что влияет на функции ядер в развитии?.....	35
Как цитоплазма влияет на работу генов?.....	38
Морфогенетическая активность ядер и ее периодичность.....	39
Глава третья. РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ И ЭКСПРЕССИИ ГЕ- НОВ В РАЗВИТИИ.....	43
Как устроен ген?.....	43
Как “работает” ген?.....	45
Регуляторная часть гена.....	46
Многоуровневый принцип регуляции экспрессии генов.....	50
Глава четвертая. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕ- ЧЕНИЕ ПЛАНА СТРОЕНИЯ ОРГАНИЗМА.....	77
Откуда берет начало онтогенез?.....	77
В чем суть ооплазматической сегрегации?.....	77
“Чудесные” свойства полярной плазмы.....	79
Отчего ооцит обладает полярностью?.....	81
Как формируется ооцит?.....	83
Как гены контролируют формирование анимально-вегетативного градиента?.....	84

Как гены контролируют формирование дорсо-вентрального градиента?.....	88
Как гены контролируют формирование терминальных структур?	91
Глава пятая. СЕГМЕНТАЦИЯ РАЗВИВАЮЩИХСЯ ОРГАНИЗМОВ И ЕЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ	93
Классификация генов сегментации. Сегрегационные и гомеозисные гены.....	93
Сегрегационные гены. GAP-гены.....	95
Pair-rule-гены.....	97
Гены сегментарной полярности	98
Глава шестая. ОТКРЫТИЕ ГОМЕОЗИСНЫХ ГЕНОВ, ИХ РОЛЬ В РАЗВИТИИ	100
Что такое гомеозисные гены?.....	100
Генные комплексы ANT-C и BX-C.....	101
Особенности гомеозисных генов на примере локуса Ubx	101
Гипотеза Э. Льюиса о механизме функционирования гомеозисных генов и ее эволюционный смысл.....	105
Молекулярно-генетический анализ гомеозисных генов	107
Гомеобокс и гомеодомен.....	109
Роль гомеобоксодержащих генов в развитии млекопитающих	112
Принцип коллинеарности и гомеобокс-содержащие гены	114
Гомеозисные гены и морфогенетические процессы	115
Гены, контролирующие функционирование гомеозисных генов.....	117
“Гены-господа” и “гены-рабы”. Опыты Вальтера Геринга.....	120
Глава седьмая. ЭМБРИОНАЛЬНАЯ ИНДУКЦИЯ И ГЕНЫ, ЕЕ КОНТРОЛИРУЮЩИЕ	126
Что такое эмбриональная индукция?	126
Что такое индуктор и компетентная ткань?	128
Какова молекулярная природа индуктора?.....	137
Гены и молекулярная природа индукторов.....	139
Гены и некоторые особенности взаимодействия молекулярных индуцирующих факторов	149
Глава восьмая. НЕКОТОРЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕТЕРМИНАЦИИ И ТРАНСДЕТЕРМИНАЦИИ	154
Что такое позиционная информация, детерминация и дифференцировка?.....	154
Как обнаружить состояние детерминации?.....	155
Как изучать региональные особенности детерминации?	156
Что такое компартмент?.....	158
Детерминация и транскрипция умеренно повторяющихся последовательностей.....	159
Что такое трансдетерминация?.....	161
Какова природа трансдетерминации?	163
Детерминация и взаимодействие тканевых закладок	165

Глава девятая. ДЕТЕРМИНАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОМ ОСВЕЩЕНИИ	171
Как соотносятся детерминация и дифференцировка?	171
Как можно следить за активностью генов в дифференцирующейся клетке?	172
Как функционируют тканеспецифические гены?	178
Как генные ансамбли ("сети") регулируют экспрессию тканеспецифических генов?	183
Как организована регуляторная область, контролирующая тканеспецифичность экспрессии генов?	186
Глава десятая. ГЕНЕТИЧЕСКИ ПРОГРАММИРОВАННАЯ СМЕРТЬ КЛЕТОК (АПОПТОЗ)	190
Что такое апоптоз?	190
В чем заключаются отличия апоптоза от обычной некротической гибели клеток?	190
Фазы апоптоза. Гены, его контролирующие	192
Апоптоз и нейротрофические факторы	194
Взаимодействие генов апоптоза	195
Другие факторы, действующие на апоптоз. Апоптоз и болезни	196
Глава одиннадцатая. ТКАНЕВЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕ-НОВ	200
Клеточные популяции гетерогенны	200
Что такое структурно-генетический мозаицизм?	200
Что такое соматический мозаицизм?	204
Что такое соматический кроссинговер?	206
Что такое эффект положения мозаичного типа?	207
Что такое функционально-генетический мозаицизм?	208
Что такое химерные (аллофенные) мышцы?	211
Что такое клеточные ансамбли?	213
Глава двенадцатая. ДЕТЕРМИНАЦИЯ ПОЛА И ЕЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ	216
Что такое половые хромосомы?	216
Балансовая теория К.Бриджеса	217
Роль Y-хромосомы в детерминации пола млекопитающих	217
Молекулярно-генетические основы определения пола	219
Молекулярная генетика пола млекопитающих	225
Роль гена SRY в регуляции пола млекопитающих	227
Как генетики помогают "управлять" полом у животных?	231
Глава тринадцатая. ГЕНЫ, ОНТОГЕНЕЗ И ЭВОЛЮЦИОННОЕ РАЗВИТИЕ	234
В чем единство индивидуального и исторического развития? Генетика и биогенетический закон	234
Роль макромутаций в эволюции	240

Как онтогенез может “двигать” филогенез”?	244
Значение времени экспрессии генов в эволюционном процессе	246
Роль гетерохроматина в эволюции	249
Глава четырнадцатая. ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ	255
Особенности взаимодействия генов в развитии	255
Организация генетических систем, контролирующих развитие	257
Особенности функционирования генетических систем, контролирующих развитие	258

Учебное издание

КОРОЧКИН ЛЕОНИД ИВАНОВИЧ

**Биология индивидуально развития
(генетический аспект)**

Зав. редакцией

Г.С.Савельева

Редактор

Г.Г.Есакова

Художественный редактор

Ю.М.Добрянская

Переплет художника

В.А.Чернецова

Технический редактор

З.С.Кондрашова

Компьютерная верстка

И.Д.Труфанова

Изд.лиц. № 040414 от 18.04.97

Подписано в печать 16.12.02. Формат 60х90/16.

Бумага офс. № 1. Офсетная печать. Усл.печ.л. 16,5.

Уч.-изд. л. 16,71. Тираж 3000 экз. Заказ 7852

Изд. № 7474.

Ордена “Знак Почета” Издательство Московского университета.

103009, Москва, ул. Б.Никитская, 5/7.

Тел.: 229-50-91. Факс: 203-66-71.

E-mail: kd_mgu@df.ru

Тел.: 939-33-23 (отдел реализации)

В издательстве МГУ

работает служба “КНИГА—ПОЧТОЙ”

Тел.: 229075-41

Отпечатано в полном соответствии
с качеством предоставленных диапозитивов
в ОАО «Можайский полиграфический комбинат».
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.