

Главный редактор информационных изданий ВИНТИ  
профессор *П. В. Нестеров*

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

информационных изданий ВИНТИ по биологии

Главный редактор — акад. *Р. В. Петров*Члены редакционной коллегии: к. б. н. *О. Н. Барсова*,к. б. н. *Л. Ф. Борисова* (зам. главного редактора),чл.-корр. АН СССР *А. Л. Бызов*, к. б. н. *А. М. Василенко*,д. б. н. *М. А. Каменская*, акад. *П. Г. Костюк*, к. м. н. *В. А. Кочукова*,чл.-корр. АН СССР *О. А. Крыштал*, к. с.-х. н. *Е. В. Ластовка*,д. м. н. *Ф. З. Меерсон*, д. б. н. *А. А. Михайлова* (зам. главного редактора),чл.-корр. АН СССР *А. А. Ничипорович*, к. б. н. *Т. А. Пронина*,к. м. н. *В. Н. Тарасов*, к. б. н. *А. В. Титова* (ученый секретарь редколлегии),д. б. н. *В. П. Чтецов*, к. б. н. *И. П. Шамардина*,акад. ВАСХНИЛ *В. С. Шевелуха*, чл.-корр. АН СССР *С. В. Шестаков*,д. м. н. *А. И. Шкирельман*Научный редактор к. м. н. *Финогенова М. А.*Рецензенты: д. б. н. *Котелянский В. Е.*, д. б. н. *Михайлов А. Т.*

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МОРФОГЕНЕЗА

*Г. А. Банников*

## ВВЕДЕНИЕ

Образование и поддержание специфической формы клеток, тканей и индивидуумов в целом является фундаментальным свойством живых организмов. Не случайно поэтому, что основа классической биологии — это описательная морфология. Современная биология, в стремлении выйти за пределы только описательного подхода, обратилась к молекулярным механизмам биологических процессов. Однако сегодня из всех биологических дисциплин лишь генетика стала молекулярной в самой своей основе. Остальные разделы биологии являются молекулярными лишь настолько, насколько они используют результаты молекулярной генетики: механизмы передачи генетической информации из поколения в поколение и ее экспрессии на уровне синтеза белков. Выход на новый уровень таких классических биологических дисциплин, как эмбриология, цитология, гистология, зоология и другие зависит от возможностей в объяснении механизмов формообразования в молекулярных терминах. До недавнего времени молекулярная биология, то есть молекулярная генетика, таких возможностей не представляла. В последние годы в этой области происходят несомненные перемены, поскольку намечаются подходы к пониманию молекулярных механизмов таких процессов, как детерминация плана строения тела и его частей, возникновение специфической формы клеток и простейших тканевых структур, процесс перемещения клеток.

Первая часть настоящего обзора посвящена механизмам детерминации плана строения тела и, соответственно, основана на результатах работ с генами сегментации насекомых. Вторая — простейшим морфогенетическим актам, в связи с чем в ней наибольшее внимание уделено молекулам межклеточной адгезии и молекулам, опосредующим взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом.

дения в ооцит в направлении заднего полюса блокируется связыванием с некими, предположительно цитоскелетными структурами, компоненты которых кодируются генами *swallow* и *exuperantia* [38]. Приблизительно в то же самое время у заднего полюса ооцита локально откладываются продукты семейства генов *oskar* [367]. Таким образом, еще не оплодотворенное, только что отложенное яйцо оказывается поляризованным. Роль активности генов *bcd* и *osk* в организации строения тела хорошо иллюстрируется фенотипом соответствующих мутантов. Самки, у которых отсутствует функциональная копия гена *bcd*, откладывают яйца, развивающиеся в эмбрионы без головы и груди [206], а у самок, мутантных по любому из генов *osk*, выводится потомство без брюшных сегментов [38].

После оплодотворения начинается трансляция *bcd* мРНК, и соответствующий белок, диффундируя от переднего полюса, образует градиент концентрации на протяжении приблизительно половины яйца [156]. Белковый продукт гена *bcd* обладает ДНК-связывающим гомеодоменом [422] и, в соответствии с этим, локализуется в ядрах передней части синцитиальной бластодермы. Помимо ДНК-связывающего домена, *bcd*-белок имеет и РНК-распознающий мотив [510], что, по-видимому, имеет отношение к его способности подавлять трансляцию продуктов других материнских генов [157]. Одновременно с распространением *bcd*-белка, белковый продукт гена *nanos* (*nos*) одного из генов группы *osk* - начинает распространяться от заднего полюса в направлении к переднему концу зародыша [366, 539].

Продукт гена *nos* синтезируется в питающих клетках и транспортируется в ооцит [539, 649]. Однако он оказывается сконцентрированным в заднем конце зародыша, то есть на полюсе, противоположном месту его проникновения в ооцит [367]. Таким образом, должны существовать механизмы активного переноса продукта гена *nos*. В этом переносе, по-видимому, участвует один из группы генов *osk*, ген *rimilio* [369]. Другие гены группы *osk*, вероятно, обслуживают синтез продукта гена *nos* и его транспорт в ооцит. "Правильная" локализация продукта гена *nanos* зависит также от материнского гена *Bicaudal* (*BicD*) [649]. Мутации в гене *BicD* приводят к глобальной реорганизации строения тела; так, голова, грудные и передние брюшные сегменты оказываются замещенными на задние брюшные сегменты и терминалии. При этом у эмбрионов, матери которых не-

сут мутантный ген *BicD*, продукт гена *nos* локализуется не в заднем конце тела, а на обоих полюсах. Нарушение локализации *nos*-детерминант приводит к подавлению активности "морфогена" переднего полюса-гена *bicoid*. Анализ локализации самого продукта *BicD* показывает, что в ооцитах дикого типа этот белок распределен равномерно, тогда как при мутациях по гену *BicD* он сконцентрирован на переднем полюсе яйца [649]. Ген *BicD* кодирует цитоплазматический белок, состоящий из 782 аминокислотных остатков, что составляет около 89 кД. Аминокислотная последовательность *BicD*-белка содержит 5 участков длиной в 50-100 остатков с семичленной периодичностью, приводящей к образованию стержневидных доменов в результате закручивания  $\alpha$ -спиралей вокруг друг друга (*coil-coiled*-конформация) [649]. Конформация такого типа характерна для многих белков цитоскелета [475]. Непосредственное сравнение последовательности белка *BicD* с банком данных выявило значительные гомологии с C-концевыми районами тяжелых цепей миозина и с некоторыми белками промежуточных филаментов [649].

Несмотря на внешнее сходство детерминации с помощью материнских генов плана строения переднего и заднего отделов зародыша у *Drosophila*, оказалось, что принципы механизмов, действующих в первом и втором случаях - различны.

Организатор переднего отдела - ген *bicoid* - действует путем прямой регуляции экспрессии некоторых иерархически подчиненных ему регуляторных генов [207, 214, 425, 620]. В этом смысле он ведет себя как классический "градиентный" морфоген [657], концентрации которого в данной узкой зоне определяют, произойдет ли в этой зоне некоторое событие или нет [156]. Напротив, главная, если не единственная роль детерминанты *nanos* заключается в предотвращении трансляции с материнского транскрипта гена *hunchback* (*hb*) (см. ниже) в задней половине зародыша [287, 607]. Таким образом, активность гена *nanos* играет скорее перmissive, чем instructive роль в организации заднего отдела зародыша. Эти события протекают на следующей стадии развития, когда сегментацией начинают управлять гены зиготы, локализация экспрессии которых зависит от локализации продуктов описанных материнских генов.

### 1.1.2. Gap-гены сегментации

За два цикла ядерных делений до наступления целлюляризации бластодермы эмбрион впервые становится подразделенным на зоны, качественно отличающиеся по транскрипции определенных зиготических генов. Известно три главных гена, активирующихся на этой стадии: *hunchback* (*hb*), *Krüppel* (*Kr*) и *Knirps* (*Kni*) [456], каждый из которых кодирует белок, содержащий ДНК-связывающий пальцевидный домен [523, 620]. Эти гены объединяют под названием *gap-генов* (*gap-genes*), поскольку у соответствующих мутантов оказываются "пропущенными" определенные участки тела, например, отсутствие брюшных сегментов при нормально развитых голове, груди и "хвостовой" терминали-тельсоне.

Первоначально экспрессия гена *hb* происходит в двух районах, имеющих размытые границы: один из них распространяется от переднего полюса приблизительно до середины длины яйца, а второй — от заднего полюса примерно до четверти длины яйца сзади [620]. Ген *Kr* в то же время экспрессирован как нечетко отграниченная зона в центральной части яйца [215, 341], а ген *Kni* экспрессируется в двух зонах, одна из которых расположена спереди, а другая — сзади от зоны экспрессии гена *Kr* [299]. Мутации, инактивирующие материнские гены *bcd* и *nos*, приводят к существенным изменениям в локализации экспрессии *gap-генов*. У мутантов по гену *bcd* зиготический ген *hb* остается не экспрессированным, а зона экспрессии гена *Kr* расширяется в направлении переднего конца эмбриона [214, 619]. Аналогичным образом в отсутствие активности только гена *nos* зона экспрессии гена *Kr* сдвигается к заднему концу тела.

На сегодняшний день известно, что как ген *bcd*, так и ген *nos* участвуют в создании ограниченной зоны экспрессии белкового продукта гена *hb*, хотя и играют совершенно разные роли в этом процессе.

Ген *hb* впервые транскрибируется с материнских генов во время оогенеза, и его транскрипт равномерно откладывается по всему яйцу [620]. После оплодотворения продукт гена *nos*, распространяясь от заднего полюса, по-видимому, дестабилизирует материнский транскрипт *hb*, предотвращая его раннюю экспрессию в задней половине зародыша [559]. Вскоре после этого морфоген *bcd*, распространяясь от переднего полюса, включает транскрипцию зиготического гена

*hb* в передней половине тела [559]. Показано, что эта активация транскрипции определяется связыванием продукта гена *bcd* с пятью регуляторными сайтами, лежащими выше точки старта транскрипции в гене *hb* и имеющими консенсус 5'-TCTAATCCC-3' [157]. Активность зиготических генов *hb* абсолютно необходима для нормального развития головы и грудных сегментов и достаточна для этого даже в отсутствие активности материнских генов *hb* [36, 368]. Напротив, присутствие продукта гена *hb* в задней половине зародыша подавляет развитие брюшных сегментов, а роль "морфогена" *nos* сводится лишь к предотвращению накопления этого продукта в соответствующей области. Экспериментальная эктопическая экспрессия кодирующей последовательности гена *hb* в задней половине тела зародыша приводит к образованию фенотипа, имитирующего отсутствие активности *nos*. С другой стороны, при инактивации как материнской активности *hb*, так и гена *nos* развитие зародыша протекает абсолютно нормально [287, 607].

Различия в стратегии организации переднего и задних концов тела зародыша ярко отражаются в результатах следующих экспериментов. Инъекция фактора *nos* в середину зародыша, лишённого как активности *nos*, так и активности *bcd*, индуцирует образование брюшных сегментов, расходящихся от обоих полюсов эмбриона, а не от места инъекции активности *nos* [454]. В то же время аналогичная инъекция фактора *bcd* индуцирует передние сегменты, расходящиеся от места инъекции [454].

Остаются нерешенными, по крайней мере, два существенных вопроса, касающихся роли *gap-генов* в сегментации и механизмов их действия. Во-первых, каков смысл экспрессии материнских генов *hb*, если и в отсутствие этой экспрессии развитие протекает нормально? И, во-вторых, если градиент *nos* не нужен для создания позиционной информации в задней половине тела, то каков ее источник?

Возможный ответ на первый вопрос содержится в гипотезе, высказанной G. Struhl (1989). Эта гипотеза состоит в следующем. При развитии личинки большинства более примитивных, чем *Drosophila*, насекомых на ранних этапах эмбриогенеза образуются только голова и грудные сегменты, а брюшные сегменты начинают отпочковываться позднее из специальной зоны пролиферации [5]. Предполагается, что у таких примитивных насекомых продукт материнских генов *hb* экспрессирован по всему телу эмбриона. Тогда эволюционно бо-

уже продвинутое насекомые, включая *Drosophila*, должны были приобрести специальный механизм элиминации *hb* в задней половине тела — систему, обеспечивающую создание градиента *pos*-белка для того, чтобы приобрести способность одновременной детерминации всех сегментов тела, включая и брюшине.

Что касается второго вопроса, то на него возможны два ответа. Первый — позиционная информация в задней половине тела создается за счет градиента еще не идентифицированных морфогенов. Второй — эта информация возникает только в результате взаимодействия зиготических *gap*-генов между собой. Теоретически возможно существование систем из диффундирующих компонентов, которые способны к "самоорганизации" в пространстве, если каждый из компонентов влияет на интенсивность выработки других. Кандидатом на такую систему в нашем случае могут быть *gap*-гены *Kruppel*, *Knirp*, *tailless (tll)* и их белковые продукты [214, 299]. В пользу механизма самоорганизации говорит сужение границ экспрессии *gap*-генов со временем и образование между этими зонами более четких, чем вначале, границ [299]. Более того, показано, что экспрессия гена *knirp* подавляется активностью гена *tll* и, наоборот, ген *Kr* непосредственно увеличивает активность гена *knirp* [470]. В то же время ген *knirp*, по-видимому, является негативным регулятором гена *Kr* [311]. Установлена последовательность, которую специфически узнает продукт гена *Kr*: AACGGGTTAA [591, 636].

Взаимодействие между *gap*-генами происходит не только в области задней половины тела эмбриона, но и в передней его части. Так, известно, что ген *hb* негативно регулируется геном *Kr* [311]. В соответствии с этим, последовательность, связывающая продукт гена *Kr*, обнаружена впереди двух промоторов гена *hb*. В регуляторной зоне гена обнаружены и сайты связывания продукта самого этого гена: ACNCAAAAAANTA, что указывает на саморегуляцию гена *hb* [636].

Установление четких границ между зонами экспрессии *gap*-генов служит предпосылкой двух последующих процессов: установлению границ будущих парасегментов и спецификации каждого из них.

### 1.1.3. Гены парной регуляции

Границы парасегментов устанавливаются в результате экспрессии генов, которые называют генами "парной" регуляции" (*pair-rule class genes*). Известно 8 генов, принадлежащих к этому классу [456], 6 из которых охарактеризованы на молекулярном уровне [568]. Общей чертой в регуляции активности этих генов является транзиторная экспрессия в виде 7 или 8 четких полос. Тем не менее, экспрессия каждого из генов этого класса имеет свои особенности. Транскрипты двух из них, генов  *runt*  и  *hairy (h)* , которые иногда называют первичными генами парной регуляции, первоначально распределены равномерно, но в период последней интерфазы перед целлюляризацией бластодермы, ранее чем транскрипты других генов этого класса, группируются в 7 комплементарных полос, очерчивающих все тело эмбриона. Именно эти гены играют решающую роль в периодичности локализации транскриптов других генов класса парной регуляции [86, 200, 284]. Транскрипты обоих генов ( *runt* ,  *hairy* ) обнаруживаются также в виде пятен в дорзальной части презумптивного головного отдела.

Механизмы, обеспечивающие периодичность локализации транскриптов генов  *runt*  и  *h* , пока еще плохо изучены. Эти механизмы, вероятно, включают в себя как взаимодействие с продуктами генов  *gap*  класса, так и взаимодействие генов парной экспрессии между собой. Одна из трудностей в объяснении периодичности локализации транскриптов генов  *runt*  и  *h*  состоит в том, что в пределах одной зоны экспрессии  *gap* -генов содержится несколько полос экспрессии генов "парной регуляции". Поскольку образование "зебры" из транскриптов генов  *runt*  и  *h*  происходит до того, как границы между зонами экспрессии  *gap* -генов становятся четкими, то первый этап обсуждаемого механизма, по-видимому, состоит в усилении или подавлении экспрессии гена  *runt*  и  *h*  в ответ на ту или иную локальную комбинацию продуктов  *gap* -генов. В результате возникает зональный рисунок экспрессии генов  *runt*  и  *h* , который затем корректируется и стабилизируется благодаря взаимной репрессии одного гена другим [299]. Указания на то, что дело обстоит, в принципе, именно таким образом, содержатся в результатах следующих экспериментов. Мутации генов  *hb* ,  *Kr*  и  *knirp*  приводят к изменению характера экспрессии генов  *runt*  и  *h*  [301]. Мутационный анализ выявил в регуляторной зоне гена  *h*  (протяженностью более 10 п.н.), примыкающей к 5'-концу его кодирующей последова-

тельности, несколько элементов, каждый из которых регулирует транскрипцию этого гена только в определенной зоне эмбриона. Предполагается, что эти элементы отвечают на различные комбинации концентраций продуктов *gap*-генов [285].

Сходная ситуация обнаружена при анализе регуляторной зоны еще одного гена, принадлежащего к классу "парной регуляции" гена *even skipped (eve)*. Пространственная периодичность экспрессии этого гена также зависит от активности *gap*-генов. Было показано, что в составе 5-фланкирующей регуляторной зоны этого гена длиной 8 п.н. содержатся элементы, контролирующие возникновение только строго определенных полос активности гена *eve* [232, 257]. Более того, показано, что в упомянутых контрольных элементах гена *eve* содержится различное число участков связывания белков *hb* и *Kr*. Так, элемент, предположительно контролирующий 3-ю полосу транскрипции *eve*, содержит 20 участков связывания *hb* и вообще не содержит участков связывания *Kr*. В то же время элемент, контролирующий 2-ю полосу, содержит 3 сайта *hb* и 6 сайтов *Kr* [591]. Доказано, что, по крайней мере, часть этих сайтов принимает участие в регуляции локальной экспрессии гена *eve*: делеция 11 из 20 сайтов связывания белка *hb* в контрольном элементе 3-й полосы и делеция одного сайта *hb* и трех сайтов *Kr* в контролирующем элементе 2-й полосы приводят к подавлению экспрессии гена *eve* в соответствующих полосах [232]. На основании этих данных было высказано предположение, что один и тот же конечный результат — локальная активация (или подавление) экспрессии генов "парной регуляции" — может быть опосредован несколькими различными комбинациями локальных концентраций регуляторных белков. При этом каждая из таких комбинаций "использует" свой регуляторный элемент, содержащий соответствующий уникальнейший набор сайтов связывания факторов транскрипции (в первую очередь белков *gap*-генов) [84]. До сих пор остается неясным, образуется ли "полосатый" рисунок в экспрессии генов *h* и *eve* в результате активации этих генов в пределах полосы или в результате подавления экспрессии в промежутках между полосами [84]. Приведенные выше эксперименты, в которых делеции, захватывающие различные по протяженности регуляторные зоны генов *h* и *eve*, вызывают исчезновение определенных полос экспрессии [232, 257, 285], на первый взгляд, говорят в пользу первого механизма —

активации. С другой стороны, было показано, что у тройных мутантов с инактивацией генов *hb, Kr, kni* ген *h* остается активным, хотя его транскрипт распределен в виде диффузной зоны, захватывающей район, где в норме наблюдается "полосатый" рисунок [87]. Этот результат может быть интерпретирован только на основе второго механизма — подавления экспрессии в "промежутках". Теоретически кажущееся противоречие между результатами [285] и [87] разрешимо. Например, как предполагает [84], *gap*-белки могут действовать как репрессоры, и в этом случае утраченные в результате описанных делений регуляторные участки [285] требуются для преодоления репрессии. Насколько эта схема соответствует реальности, покажет будущее.

Пространственная регуляция двух других генов, принадлежащих к классу генов "парной регуляции" — генов *fushi tarazu (ftz)* и *paired (prd)* в основном зависит от активности генов *h* и *unt* [84, 299]. Так, например, ген *ftz* главным образом негативно регулируется геном *h*, в результате чего образуются промежутки между полосами транскриптов *ftz*. На это указывает тот факт, что у мутантов, утративших функцию гена *h*, ген *ftz* экспрессируется без промежутков [86, 284], тогда как эктопическая экспрессия гена *h* подавляет активность гена *ftz* [305]. Ген *eve*, помимо регуляции *gap*-белками (о чем было сказано выше), так же как и ген *ftz*, регулируется первичным геном парной регуляции. Регулятором этого гена выступает, однако, не ген *h* (регулирующий ген *ftz*), а другой первичный ген парной регуляции — *unt* [299]. В результате транскрипты генов *ftz* и *eve* образуют семь взаимоисключающих полос шириной по 4 клеточных ядра каждая. Образование четких, резко обрывающихся границ экспрессии генов *eve* и *ftz*, зависит от положительной ауторегуляции этих генов [199, 271]. В гене *ftz* обнаружен удаленный от структурной части гена энхансерный элемент, содержащий несколько участков связывания продукта этого гена [271]. Другой регуляторный элемент гена *ftz* длиной 600 п.н., непосредственно примыкающий к 5-концевой части гена, содержит в себе множественные активационные и репрессорные элементы, являющиеся мишенями регуляторных белков, далеко не все из которых идентифицированы в настоящее время [136]. Одним из таких регуляторов является продукт гомеобокс-содержащего (см. ниже) гена *caudal (cad)*. Белок *cad* усиливает транскрипцию гена *ftz* в задней половине тела эмбриона, связываясь с

множественными сайтами TTTATG, локализованными в его промоторе [137]. В то же самое время, когда возникает периодичный и реципрокный рисунок экспрессии генов *eve* и *ftz*, происходит становление пространственной закономерности в экспрессии гена *prd* [205]. Вначале ген *prd* экспрессируется в виде 7 широких полос шириной приблизительно в 6 ядер каждая. Затем рисунок трансформируется в 14-полосый: образуются промежутки в середине каждой из первоначальных полос [2].

Результатом всех описанных выше событий является то, что к концу целлюляризации бластодерма представляет собой "зебру", расчерченную полосами активности генов парной регуляции. Уже в этот момент, еще до начала гастрюляции, границы и спецификация (то есть, грудной, третий брюшной и т.п.) будущих сегментов уже определены с точностью до одной клетки.

#### 1.1.4. Гены полярности сегментов

Точная разметка границ сегментов осуществляется благодаря активности так называемых "генов полярности сегментов": генов *engrailed(en)*, *wingless (wg)*, *gooseberry (gsb)* — пространственные закономерности экспрессии которых заданы локализацией активности генов парной регуляции [2, 300]. Транскрипты генов *en* и *wg* накапливаются в виде 14 узких поперечных полос в момент завершения целлюляризации. Почти в то же самое время с помощью антител там же удается локализовать отложение продукта гена *en*, при этом отчетливо выявляется, что ширина полосы составляет одну клетку [85]. 14 полосок продуктов экспрессии гена *en* маркируют на этой стадии переднюю границу парасегментов, а примыкающие к ним 14 полосок продуктов экспрессии гена *wg* — заднюю границу другого парасегмента [2, 85].

Интересно, что возникновение четных и нечетных полосок продуктов экспрессии гена *en* требует сочетания активности различных генов парной регуляции: нечетные полоски возникают в том месте, где активны гены *eve* и *prd*, а четные — в местах активности *ftz* и гена *odd-paired. (opa)* [300]. Напротив, ген *wg* начинает активироваться только в тех клетках, которые не экспрессируют ни гена *eve*, ни гена *ftz*. Такие полоски шириной в одну клетку возникают в самом конце стадии бластодермы в результате сужения

полос экспрессии генов *eve* и *ftz* [200]. Третий ген полярности сегментов — *gsb* — активируется в виде полосок шириной в 2 клетки, которые перекрывают полоски экспрессии генов *en* и *wg* [27].

Образовавшиеся полоски активности генов полярности сегментов служат точками отсчета для возникновения и поддержания общего для каждого сегмента плана клеточного строения. Возникновение такого плана строения парасегмента, по-видимому, происходит при участии межклеточных взаимодействий, основанных на секретах и рецепции сигнальных молекул. Этот вывод базируется, в частности, на анализе действия гена *wg*. Утрата этого гена приводит к аномальному развитию не только тех клеток, в которых ген *wg* экспрессируется в норме, но захватывает 3/4 каждого парасегмента [18]. Далее, постоянная активность гена *en* в клетках передней границы парасегмента требует экспрессии гена *wg* в клетках задней границы примыкающего парасегмента [147, 414]. Ген *wg* кодирует белок, имеющий сигнальный пептид и богатый цистеином C-конец, что указывает на то, что он секретируется. Кроме того, белок *wg* гомологичен продукту мышинового онкогена *int-1*, который является секреторным белком [472, 515]. Наконец, результаты электронно-микроскопического исследования распределения белкового продукта гена *wg* указывают на то, что этот белок, по-видимому, играет роль паракринного сигнала [6396]. Внутри клеток, экспрессирующих ген *wg*, соответствующий белковый продукт обнаружен в мелких мембраносвязывающих пузырьках и мультивезикулярных тельцах. Кроме того, белок *wg* выявлен на наружной поверхности таких клеток, в межклеточном пространстве, а иногда и в соседних *en*-экспрессирующих клетках в виде мультивезикулярных телец [6396]. Таким образом, весьма вероятно, что клетки, экспрессирующие ген *wg*, способны подавать сигналы окружающим их клеткам.

Интересно, что мышинный гомолог гена *wg* *Drosophila* ген *int-1* экспрессируется в ранних эмбрионах мыши в развивающейся нервной системе и что экспрессия эта пространственно упорядочена [652a]. Было бы крайне интересно узнать, не состоит ли роль *int-1* белка в это время в организации нейрональных компартментов. Характер ответа на сигналы, обусловленные продуктом гена *wg*, может зависеть от индивидуальной компетенции отвечающих клеток, которая определяется активностью других генов. Одним из таких генов, определяющим

дифференциальный ответ на  $wg$ -сигналы, является еще один, до сих пор не упоминавшийся ген полярности сегментов — ген *patched* (*psc*): в отсутствие активности этого гена ген *sc* начинает экспрессироваться по обе стороны от зоны активности гена  $wg$ .

Белковый продукт гена *psc*, скорее всего, опосредует межклеточные мембранные взаимодействия. Во всяком случае в его аминокислотной последовательности, выведенной из секвенированной последовательности нуклеотидов, содержится по крайней мере 7 трансмембранных  $\alpha$ -спиралей [281]. *Psc* мРНК вначале локализуется в виде широких зон в центре каждого парасегмента, которые затем преобразуются в 2 полосы экспрессии на каждый парасегмент вследствие образования промежутка. Установлено, что мутация гена *psc*, ведущие к утрате функции, фенотипически отражаются на клетках, не экспрессирующих этот ген. Этот факт так же говорит о том, что продукт гена *psc* участвует в приеме или передаче сигналов соседним клеткам [281].

Остается загадочным механизм функционирования гена полярности сегментов, называемого *armadillo* (*arm*). Мутации этого гена приводят к изменениям в организации задней части каждого сегмента, не затрагивая их передней части [490]. В то же время этот ген равномерно экспрессирован по всему телу эмбриона и предположительно кодирует белок, ассоциированный с цитоскелетом [514].

Приведенные выше сведения практически исчерпывают сегодняшние знания о механизмах возникновения общего плана клеточной организации парасегментов. Несмотря на скудность этих данных, они позволяют сделать вывод, что, в отличие от предыдущих стадий развития, процесс организации сегмента включает не только взаимодействия генов внутри клеток, но и межклеточные взаимодействия.

### 1.1.5. Гомеотические селекторные гены

Спецификация типа парасегментов происходит в результате избирательной активации так называемых гомеотических селекторных генов, входящих в два комплекса тесно сцепленных генов: комплекс *Antennapedia* (*ANT-C*) и комплекс *Bithorax* (*BX-C*) [2]. К гомеотическим генам по классическому определению относят те гены, мутации которых приводят к трансформации сегментов одного типа в другой. Комплекс *ANT-C* содержит гены, управляющие спецификацией пе-

редних парасегментов груди, а комплекс *BX-C* — гены, определяющие различия между парасегментами заднего конца тела. Кроме того, еще 2 гомеотических гена *Deformed* (*Dfd*) и *labial* (*lab*), не входящих в *ANT-C* и *BX-C*, ответственны за спецификацию головных сегментов, а ген *Sex combs reduced* (*Scr*) — за передние сегменты груди [161].

Все гомеотические гены содержат высококонсервативную последовательность из 180 п.н., кодирующую ДНК-связывающий белковый домен, который в первое время считали мотивом, специфичным для генов сегментации [220]. В настоящее время стало ясно, что гомеобокс присутствует в самых разнообразных регуляторных генах эукариот [3, 270].

Избирательность активации того или иного гомеотического гена в определенном участке тела опосредуется, по крайней мере, двумя различными механизмами. Первый зависит от продуктов других генов сегментации. Второй — от взаимодействий гомеотических генов между собой.

Транскрипция гомеотических генов впервые начинается непосредственно перед целлюляризацией бластодермы, примерно в то же время, когда активируются гены парной регуляции. На этих ранних этапах транскрипты гомеотических генов равномерно распределены на территории обширных перекрывающихся между собой зон тела личинки. В локализации этих зон ведущую роль, по-видимому, играют уже знакомые нам материнские гены полярности и *gap*-гены [2, 258]. Например, транскрипты с обоих промоторов гена *Antennapedia* (*Antp*) накапливаются в зоне активности гена *Kr*, хотя транскрипция с промотора *P1* зависит исключительно от активности гена *Kr*, тогда как локализация зоны транскрипта с промотора *P2* определяется взаимодействием генов *bcd*, *osk* и *hb* [2]. Сужение зон экспрессии гомеотических генов происходит в результате их взаимодействия с генами парной регуляции, в результате чего возникает приуроченность экспрессии того или иного гомеотического гена или их комбинации к определенному парасегменту. Так, например, активность гена *ftz* в зонах соответствующих будущим парасегментам (*PS*) 2, 4 и 6, приводит к тому, что в этих зонах максимально концентрируется экспрессия гомеотических генов *Scr*, *Antp* и *Ubx*, соответственно [85]. В отсутствие активности гена *ftz*, экспрессируется, хотя и на низком уровне, как ген *Antp*, так и ген *Ubx*, что происходит в зоне, соответствующей парасегменту 5 и является предпосылкой для его уникальной спецификации. Установившийся в пределах данного парасегмента уровень экспрес-

сии гомеотических генов определяет спецификацию парасегмента. Так, у мутантов по гену *Scr* транскрибируется лабиальный сегмент, часть которого образуется из *PS2*, а у мутантов *Antp* транскрибируется второй грудной сегмент, происходящий из *PS4*. У мутантов же по гену *Ubx* первый брюшной сегмент, возникающий из *PS6*, трансформируется во второй грудной [2]. Сегмент-специфический характер различных тканей: кутикулы, нервной системы – в некоторых случаях зависит от соответствующих изоформ гомеобелков. Так, ген *Ubx* кодирует семейство близкородственных белков, являющихся продуктами альтернативного сплайсинга первичного транскрипта длиной в 77 т.н. [345, 458]. Все члены этого семейства имеют общий N-концевой район длиной в 247 аминокислотных остатков и общий C-концевой домен размером в 99 аминокислотных остатков, содержащий гомеодомен. Различия между белками семейства *Ubx* определяются присутствием или отсутствием трех факультативных элементов размером в 9, 17 и 17 аминокислотных остатков, обозначенных как *b*, *I* и *II* соответственно. Все 3 факультативных элемента сгруппированы вместе между облигатными N- и C-концевыми доменами. Индивидуальные члены семейства белков *Ubx* отличаются друг от друга как по времени экспрессии, так и тканевой локализации. Например, изоформа *Ubx-Ia*, содержащая факультативные элементы *I* и *II*, наиболее интенсивно экспрессируется в раннем эмбриогенезе, в то время как изоформа *Ubx-IVa*, не содержащая ни одного факультативного элемента, появляется позднее [345]. Более того, если *Ubx-Ia* первоначально появляется в эпидермальных тканях, то *Ubx-IVa* – в центральной нервной системе. Эктопическая экспрессия изоформ *Ubx I* и *IV*, индуцированная в опытах с генными конструкциями [409], приводит к сегмент-специфической трансформации как элементов кутикулы, так и периферической нервной системы эмбриона, тогда как изоформа *I* способна вызывать трансформацию только нервной системы. Таким образом, члены семейства белков *Ubx* функционально различны, хотя основная информация, определяющая их специфическую способность действовать в качестве селекторных генов, содержится в гомеодомене, лежащем на C-конце молекулы [409].

Детали молекулярных механизмов, регулирующих экспрессию гомеотических генов в онтогенезе, пока известны плохо. Тем не менее, совершенно очевидно, что, кроме влияния других генов сегментации, в регуляции активности гомеоти-

ческих генов, играют роль взаимодействия этих генов между собой, причем эти взаимодействия основаны на структурной организации этих генов в хромосомах. Как уже говорилось, мутации различных локусов комплексов *ANT-C* и *VX-C* отражаются в трансформации различных районов тела. Замечательно при этом то, что порядок расположения этих локусов в пределах комплексов *ANT-C* и *VX-C* соответствует пространственному расположению районов тела, подвергающихся трансформации [381, 426]. Такое поразительное пространственное соответствие обнаружено не только у *D.melanogaster*. У жука *Tribolium* обнаружен единый гигантский комплекс, объединяющий функции комплексов *ANT-C* и *VX-C*, генетическая карта которого совпадает с организацией тела по продольной оси на всем его протяжении [32]. Кластеры гомеотических генов, организованные таким образом, называют *НОМ-комплекс*ами, а члены этих комплексов *НОМ-гена*ми [3].

*НОМ-комплексы* обладают еще одним интересным свойством. Уровень экспрессии данного *НОМ-гена*, установившийся в клетках с определенной локализацией вдоль передне-задней оси тела, поддерживается далее на протяжении всего эмбрионального развития. Именно этот феномен определяет результаты классических экспериментов, в которых было показано, что пересадка имагинальных дисков из одного района тела личинки в другой не приводит к изменению направления дифференцировки составляющих их клеток. Клетки пересаженных имагинальных дисков развиваются в структуры, соответствующие их первоначальному положению [221]. Инактивация какого-либо *НОМ-гена* в группе клеток имагинального диска рентгеновским облучением в позднем периоде развития может привести к тому, что потомки этих клеток приобретут черты, свойственные клеткам иного района тела [431]. Феномен поддержания уровня экспрессии гомеотических генов может, по крайней мере, частично объясняться их аутоактивацией, что было показано для гена *Dfd*, управляющего спецификацией сегментов челюстей [353].

Число гомеотических генов меньше числа сегментов тела. Так, комплекс *VX-C*, управляющий спецификацией, по крайней мере, девяти сегментов, состоит только из трех структурных генов: *Ubx*, *abd A*, *abd B*. Гибридизация *in situ* показывает, что эти гены действительно экспрессируются один за другим вдоль продольной оси тела в соответствии с их хромосомной локализацией [2]. Однако все эти три гена неравномерно активированы в различных клетках, составляющих данный пара-



сегмент: рисунок их экспрессии уникален для каждого парасегмента. Уникальность таких рисунков определяется тем, какие из энхансерных элементов, входящих в сложный регуляторный комплекс генов *ВХ-С*, функционируют в пределах данного парасегмента [486].

Многие из гомеозисных мутаций затрагивают именно регуляторные зоны, а не структурные гомеотические гены. При этом имеется соответствие между порядком расположения регуляторных элементов на хромосоме и локализацией фенотипических выражений мутаций этих элементов вдоль продольной оси тела. Таким образом, создается впечатление, что регуляторные элементы, отвечающие за характер экспрессии генов *ВХ-С* в следующих один за другим парасегментах, включаются в порядке их расположения в геноме.

Помимо влияния активности других генов сегментации и взаимодействия между генами *НОМ-комплекса*, в становлении сегмент-специфического характера экспрессии гомеотических генов принимают участие и некоторые другие локусы. Одним из таких локусов является локус *trithorax* (*trx*). Мутации в этом локусе вызывают, в частности, трансформацию 1-го и 3-го грудного сегментов во 2-й грудной сегмент [301a]. Наиболее вероятно, что продукт гена *trx* необходим для устойчивого поддержания экспрессии генов комплекса *ВС-Х*. [296, 297]. Активность гена *trx* необходима также для нормального функционирования генов комплекса *АНТ-С* [298, 548].

Клонирование и секвенирование *trx* кДНК показало, что этот ген кодирует высокомолекулярный белок, состоящий из 3759 аминокислотных остатков, содержащий несколько участков, богатых цистеином, которые могут принимать конформацию, сходную с  $Zn$ -связывающим пальцеподобными доменами [420]. Цистеин-богатые фрагменты *trx*, экспрессированные в *E.coli*, действительно обладали  $Zn$ -связывающей активностью, что дало основание авторам этой работы предположить, что продукт гена *trx* является металл-зависимым ДНК-связывающим белком [420].

Известен так же ген *Pc*, который является репрессором генов комплекса *ВС-Х* [317]. Показано, что ген *Pc* кодирует ядерный белок, связывающийся с несколькими специфическими сайтами на хромосомах *Drosophila*, расположенными в том же числе в районах *ВС-С* и *АНТ-С* [683].

Механизмы, управляющие последовательной активацией *НОМ-генов* вдоль продольной оси тела, и механизмы стаби-

лизации этой активности в потомстве соматических клеток остаются мало изученными, несмотря на быстрый прогресс в этой области [156, 299, 527].

Каковы бы не были молекулярные механизмы работы *НОМ-комплексов*, с биологической точки зрения эти генные комплексы представляют собой аппарат, обеспечивающий "запоминание" положения эмбриональной клетки в какой-либо системе координат и трансформацию этой, "позиционной" информации в определенный морфологический рисунок, упорядоченный вдоль некой оси. Такой осью может быть не только продольная ось тела. Наиболее яркие примеры функционирования *НОМ-комплексов*, не связанного с сегментацией тела, можно найти у позвоночных.

Обнаружение у позвоночных генных комплексов, гомологичных *НОМ-комплексам* у насекомых, было облегчено высокой консервативностью последовательности гомеобокса, что позволило с помощью нуклеотидных зондов "выловить" гомологичные гены у разных животных. Здесь уместно заметить, что наличие гомеобокса в составе гена не может рассматриваться как признак того, что этот ген играет какую-либо определенную роль в процессах эмбрионального развития. Дело в том, что с обнаружением все новых и новых мотивов этого рода, в разной степени гомологичных друг другу, понятие гомеобокса стало очень расплывчатым. Существует плавный переход между гомеобоксами гомеотических генов (таких, как *Antp*, *Ubx*) и гомеобоксами в генах таких регуляторных белков, как бактериальные репрессоры [466] и продукты генов типа спаривания у дрожжей [659]. Крайние члены этого ряда объединяет только сохранение положения нескольких критических кодонов, необходимых для сохранения конформации "спираль-поворот-спираль" гомеодомена в соответствующем белке. У дрозофилы немало генов, несущих гомеобоксы, сильно дивергировавшие от гомеобокса гомеотических генов, не принимают участие в процессе сегментации, а у позвоночных в это семейство попадают многие регуляторные гены, в том числе и те, которые кодируют тканеспецифические факторы транскрипции [49, 303]. Тем не менее, используя специфические зонды на гомеобокс гена *Antp* дрозофилы, удалось обнаружить истинно гомологичные гены у позвоночных [160, 217, 237].

Гены позвоночных, выявленные с помощью зондов на гомеобокс типа *Antp*, чрезвычайно близки к генам насекомых и гомологичны не только в области гомеобокса, но и в других

консервативных областях. Гомологичность же по гомеодомену в соответствующих белках чрезвычайно высока. В некоторых случаях в белке позвоночных идентичными оказались 59 из 60 аминокислотных остатков гомеодомена *Antp*. В белках позвоночных родственных белкам, кодируемым гомеотическими генами *Scr* и *Dfd*, гомология составляет более 40% [237, 511].

Последовательность нуклеотидов в гомеобоксах гомеотических генов *lab*, *caudal (cad)* и *Abd-B* существенно отличается от последовательностей гомеобоксов семейства *Antp*. Однако и для этих генов были обнаружены специфические гомологи у позвоночных. В случае генов *lab* [23] и *cad* [162] гомологии в пределах гомеобокса и других частей гена достаточно велики для безоговорочного признания их гомологичности соответствующим генам позвоночных. Несколько более слабые гомологии обнаружены в случае гена *Abd-B* [160, 237].

Крайне важно, что как и у насекомых, гены позвоночных, обладающие гомеобоксами типа *Antp*, вместе с генами гомологичными *lab*, *cad*, *Abd-B* собраны в геноме в кластеры. В геноме мыши существует, по крайней мере, 4 таких кластера, называемых *HOX*-комплексами. *HOX-1* [159] и *HOX-2* [236] являются полными дубликатами предкового кластера и содержат полный набор соответствующих генов. Комплексы *HOX-3* [65] и *HOX-5* [160], по-видимому, неполны.

Мышиные гомологи генов *lab*, *Dfd*, *Antp*, *Abd-B* расположены в *HOX*-кластере в том же порядке, что и родственные им гены насекомых, а границы их экспрессии столь же упорядочены вдоль оси тела [160, 216, 237]. Для других позвоночных данных по экспрессии генов *HOX*-комплексов пока нет, однако существование самих комплексов доказано для рыб, шпорцевой лягушки, кур и человека. У каждого из этих видов возможно идентифицировать индивидуальные гены, гомологичные генам насекомых. Там, где это исследовалось, обнаружена и коллинеарность расположения этих генов в геноме мух и позвоночных, включая человека [56].

Очевидно, что единственным правдоподобным объяснением столь высокого соответствия между *HOX*-комплексами насекомых и *HOX*-кластерами позвоночных является их истинная гомологичность, происхождение от генного комплекса предка, общего для насекомых и позвоночных [3]. Конвергентный механизм образования комплекса высокогомологичных генов, расположенных в одном и том же порядке и подчиняю-

щихся тем же закономерностям экспрессии в пространстве, представляется крайне маловероятным. Таким образом, наиболее продвинутые в эволюции представители двух главных ветвей животного царства первичноротых и вторичноротых: насекомые и позвоночные обладают, по существу, одной и той же системой молекулярных механизмов распознавания пространственных осей. Как мы видели у насекомых, главная роль *HOX*-комплексов состоит в организации плана строения всего тела и теснейшим образом связана с метамеризацией. Позвоночные, по-видимому, также используют *HOX*-комплексы для организации передне-задней оси, хотя метамеризация у них выражена относительно слабо и не играет такой большой роли в организации тела. Данные, касающиеся участия *HOX*-генов в задне-передней спецификации тела позвоночных, относительно скудны и не создают законченной картины механизмов этого процесса.

Тем не менее у шпорцевой лягушки один из генов *HOX*-комплекса *Xhox3* со всей очевидностью участвует в становлении передне-задней полярности эмбрионов [527]. Спецификация позиционной информации вдоль передне-задней оси тела эмбрионов амфибий впервые начинает проявляться в мезодерме, которая, в свою очередь, определяет различия вдоль продольной оси в покрывающей ее эктодерме [587]. В период поздней гаструлы-ранней нейрулы образуется градиент концентрации мРНК *Xhox3* в мезодерме, причем наименьшее количество мРНК обнаруживается в головном, а наибольшее - в хвостовом отделах [526]. За создание градиента экспрессии *Xhox3*, по-видимому, ответственны градиенты полипептидных факторов роста из семейства  $\beta$ -трансформирующего фактора роста (ТФР) (ХТС-МГ) и щелочного фактора роста фибробластов (ФРФ) [527]. Введение синтетической мРНК *Xhox3* в различные участки мезодермы не препятствует процессу гаструляции, но приводит к нарушениям развития вдоль передне-задней оси. В частности, высокие концентрации мРНК *Xhox3*, введенные в клетки мезодермы переднего конца эмбриона (то есть туда, где эта РНК в норме содержится в наименьших количествах), предотвращают развитие головы [525]. Таким образом, продукт гена *Xhox3*, по-видимому, необходим для интерпретации позиционной информации вдоль передне-задней оси тела у амфибий, хотя экспрессии этого гена недостаточно для спецификации головных и хвостовых структур.

В противоположность гену *Xhox3*, некоторые другие гены позвоночных, гомологичные гомеотическим генам семейства

Аналогично экспрессируются ограниченными зонами вдоль передне-задней оси тела [278]. Например, один из таких генов шпорцевой лягушки *XINBox1* на стадии почки хвоста обнаруживается в ядрах клеток в узкой зоне, захватывающей производные различных зародышевых листков: нервный гребень, передний участок спинного мозга, лежащие на том же уровне сомиты и участок промежуточной и латеральной мезодермы. Примечательно, что передне-задние границы экспрессии *XINBox1* в этих различных структурах точно совпадают [463]. Найти объяснение такому точному совпадению передне-задних границ экспрессии гена на столь поздней стадии развития нелегко. Это совпадение не может быть обусловлено градиентами каких-либо морфогенов хотя бы потому, что в этом случае молекулы морфогена должны были бы образовывать идентичные градиенты концентрации в совершенно разнородных средах: эктодерме и мезодерме. Отброшена на основании опытов и другая теоретическая возможность: независимое образование зоны экспрессии *XINBox1* в эктодерме и мезодерме до гаструляции и последующее их точное совмещение по окончании гаструляции [143]. Остается предположить, что клетки мезодермы, экспрессирующие ген *XINBox1*, каким-то образом индуцирует экспрессию этого гена в прилежащих к ним сверху клетках эктодермы [143]. Если учесть, что продукт гена *XINBox1* — ядерный фактор транскрипции, то становится ясно, что механизм предполагаемой индукции должен быть достаточно сложным.

Сходный феномен обнаружен и при развитии ранних зародышей мышей. Методом гибридизации *in situ* было показано, что в 7,5-суточных мышечных эмбрионах экспрессия гомеотических генов имеет совпадающие границы в мезодерме и нейроэктодерме [216]. На более поздних стадиях развития в середине беременности задне-передние границы экспрессии одних и тех же генов в различных тканях становятся несовпадающими [639], по-видимому, в результате прекращения мезодермальной индукции и смещения первоначально прилегающих друг к другу зон в ходе роста и развития. Тот же результат дают и исследования с помощью антител. Так, антитела к продукту гена *XINBox1* выявляют совпадение задне-передних границ зон экспрессии в мезо- и эктодерме мышей на 9-е сутки развития, тогда как к 13-м суткам границы совершенно не совпадают, вероятно, вследствие механического смещения экспрессирующей зоны в центральной нервной системе быстро растущим головным мозгом [143].

Трудности в изучении механизмов спецификации вдоль задне-передней оси тела у позвоночных во многом определяются отсутствием достаточного числа соответствующих мутаций. Создание трансгенных животных и животных, химерных по генам, гомологичным генам сегментации у насекомых, возможно, позволит преодолеть эти трудности. Количество таких работ нарастает. Так, было показано, что относительно короткий фрагмент промотора гена *Нох-1.3* достаточен для того, чтобы присоединенный к нему ген  $\beta$ -галактозидазы экспрессировался у мышей только в свойственном *Нох-1.3* сегменте спинного мозга [678].

Эктопическая экспрессия гена *Нох-1.1* под контролем промотора  $\beta$ -актина и трансгенных мышей приводит к множественным черепно-лицевым аномалиям, обусловленным нарушениями дифференцировки производных нервного гребня [21]. Начато изучение химерных мышей, содержащих эмбриональные стволовые клетки, несущие мутантную аллель гена *Нох-1.1*. [681].

Помимо спецификации всего тела вдоль продольной оси, *НОХ*-комплексы позвоночных ответственны за "сегментацию" некоторых отдельных тканей и органов. Наиболее отчетливо пространственно упорядоченная экспрессия генов *НОХ-2* кластера мыши обнаружена при развитии нервной системы позвоночных [237].

На определенной стадии развития передний мозг позвоночных состоит из семи или восьми пузырей, называемых ромбимерами, разделенных неглубокими перетяжками. Эти пузыри и перетяжки являются макроскопическим отражением упорядоченной сегментарной организации нейронов и глии в нервной трубке, соответствующей пространственному расположению закладок корешков моторных нейронов черепа и черепных сенсорных ганглиев [395], которые, в свою очередь, соответствуют серии иннервируемых ими жаберных дуг. Методом гибридизации *in situ* было показано, что гистологические признаки сегментации переднего мозга сочетаются с периодичностью экспрессии гена *Krox*, мРНК которого обнаруживается в ромбимерах 3 и 5 [653] и протоонкогена *int-2*, мРНК которого локализуется в ромбимерах 5 и 6 [655]. Самый же значительный результат состоит в том, что гены *НОХ-2* комплекса *НОХ-2.1, -2.6, -2.7, -2.8* и *-2.9* так же экспрессируются отдельными доменами, причем передняя граница их экспрессии совпадает с границами ромбимеров [435, 654]. Более того, при продвижении на один ген по хромосоме передняя граница

экспрессии передвигается на 2 ромбомера вперед, точно так же, как передняя граница экспрессии следующих один за другим НОМ-генов *Drosophila* разделена обычно двумя сегментами [435]. Таким образом, мы видим, как НОХ-комплекс позвоночных и НОМ-комплекс насекомых, при поразительном сходстве в функционировании, находят различное применение: один – для сегментации всего тела, а другой – для “сегментации” части нервной системы. Участием НОХ-комплекса в развитии нервной системы позвоночных не исчерпывается его роль в процессах эмбрионального морфогенеза. Недавно появились работы, доказывающие необходимость функционирования НОХ-5 комплекса генов мыши для формирования проксимально-дистального плана строения конечностей [152, 382, 462, 464, 553]. Данные, свидетельствующие об участии НОМ-генов в развитии конечностей у насекомых, не известны. Известно, только, что ген *Distal-less*, ответственный за спецификацию позиционной информации вдоль проксимально-дистальной оси конечностей у *Drosophila*, также содержит гомеобокс [115].

В развитии повторяющихся вдоль оси тела структур у позвоночных принимает участие ген *Pax 1*, член семейства генов мыши гомологичных генам *prd* и *gsb* дрозофилы, содержащих консервативную последовательность так называемой *paired box*, кодирующую белковый домен длиной в 128 аминокислотных остатков [144]. Этот домен может принимать конформацию  $\alpha$ -спираль-поворот- $\alpha$  спираль, обнаруживаемую во многих ДНК-связывающих белках [58]. Ген *Pax 1* транскрибируется в склеротомах дифференцирующихся сомитов на 9-е сутки развития эмбрионов мыши, в вентральной мезенхиме латеральнее хорды – на 10-е сутки, в перихордальных конденсатах – на 12-е сутки и, наконец, в межпозвоночных дисках. *Pax 1* мРНК обнаруживается также в тимусе и грудины [144]. Известная с конца сороковых годов мутация *indulated (un)* [663] оказалась точечной мутацией в области *paired box* гена *Pax 1*, приводящей к замене глицина на серию [20].

Смысл этого факта в том, что фенотипическое выражение мутации *un* состоит в недоразвитии задней части каждого позвонка, увеличении размеров межпозвоночных дисков и аномалиях развития грудины. Таким образом, мышинный гомолог генов парной регуляции *Drosophila*, ответственный за “маркировку” границ парасегментов у этого насекомого, несомненно участвует в становлении метамерных структур у позвоночных.

### 1.1.6. Гены сегментации и нейрогенез

При исследовании экспрессии генов сегментации в эмбриогенезе *Drosophila* для многих из них, помимо экспрессии на стадии бластодермы, был выявлен второй, более поздний пик экспрессии в некоторых тканях, в первую очередь – в дифференцирующихся нейронах. Это касается генов *ftz*, *eve* и *Kr* [148, 149, 150], а также генов *en*, *wg* и *ubx* [69, 146, 299]. Все эти гены упорядоченно экспрессируются в определенных, хотя и перекрывающихся группах нейробластов или нейронов. Конкретные функции этой второй волны экспрессии генов сегментации пока неясны. Хотя имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на возможное участие этих генов в детерминации судьбы нейронов [148, 149]. Так, было показано, что специфическое подавление экспрессии гена *ftz* в идентифицируемых нейронах приводит к изменению характера роста их аксонов [149].

Весьма вероятно, что первичной функцией гена *en* в эволюции являлась именно спецификация судьбы определенных нейронов, а функция организации повторяющихся структур: сегментация тела или нервной системы – более позднее эволюционное приобретение [477]. Авторы использовали моноклональное антитело, распознающее консервативный участок гомеодомена *en*-белка у животных, принадлежащих к различным эволюционным ветвям: насекомых-дрозофилы и кузнечика, ракообразных – речного рака и омара, аниелид двух разных групп – пиявки и малощетиковых и, наконец, у представителей трех различных классов: хордовых – костистых рыб, амфибий и птиц. С помощью этого антитела был проведен анализ распределения продукта гена *en* в эмбриональном развитии перечисленных выше животных. У всех изученных членистоногих, включая насекомых и ракообразных, наблюдали практически идентичный характер экспрессии: *en*-белок был обнаружен в заднем отделе каждого метамера во время сегментации и в сегментарно повторяющихся группах клеток во время нейрогенеза. Ни у одного из других изученных организмов не было обнаружено экспрессии гена *en* в момент метамеризации тела их эмбрионов. В то же время у всех животных ген *en* так или иначе экспрессировался при нейрогенезе. В ранних зародышах пиявки (*Helobdella triserialis*) ген *en*, в некотором интервале времени, экспрессируется в потомстве одного из телобластов, а затем его экспрессия возобновляется в немногих ганглиях в пределах нескольких передних сег-

ментов тела. У другого представителя круглых червей — олигохеты *Eisenia foetida* белок *en* обнаружен в ядрах клеток развивающейся центральной нервной системы и образует периодический сегментарный рисунок.

У всех трех исследованных хордовых обнаружен сходный характер экспрессии гена *en*: белок обнаруживается в определенном районе развивающейся нервной трубки (задний отдел среднего мозга и передний отдел заднего мозга), но не в образующихся метамерах. Этот тип экспрессии напоминает экспрессию гена *en* у пиявки и отличается от региональной периодической экспрессии генов сегментации в развивающейся нервной системе *Drosophila* [149]. Правда, у рыбы-зебры белок *en*, помимо зональной экспрессии в нервной трубке, может быть обнаружен в ядрах 3-4 клеток в каждом сомите. Поскольку *en*-белок появляется в сомитах уже после того, как эти структуры сформированы, он, по-видимому, участвует не в их формировании, а в определении судьбы метамерных субпопуляций мезодермы. Надо заметить, что интерпретация различий в распределении белка *en* у разных видов затруднена тем обстоятельством, что у многих животных существует два гена *en*. Так, у *Drosophila* — это собственно ген *en* и ген *invested*, который в консервативных участках гомологичен гену *en* более чем на 80% [120]. Два гена описаны также у мыши: *En-1* и *En-2* [135, 316], рыбы-зебры [194] и человека [390]. Нельзя исключить, что примененное авторами [477] моноклональное антитело у одного вида животных узнает продукты обоих генов *en*, тогда как у другого вида — только один. Этим, например, можно объяснить "дополнительную" иммунореактивность сомитов у рыбы-зебры, в отличие от шпорцевой лягушки и кур.

Тем не менее, кажется достаточно убедительным, что характер экспрессии гена *en* существенно отличается у животных, принадлежащих к различным направлениям эволюции. При этом наиболее простое объяснение этих различий заключается в предположении, что первоначально ген *en* "использовался" для спецификации судьбы определенных элементов нервной системы. Эта первоначальная функция сохраняется у пиявки и хордовых. В ходе эволюции некоторые животные "приспособили" этот ген для организации повторяющихся вдоль оси тела групп нейронов (олигохета и членистоногие) или детерминации метамерии всего тела (членистоногие).

## 1.2. Установление дорзо-вентральной оси и дорзо-вентральная компартиментализация

Для полного "картирования" будущего строения тела, помимо передне-задней оси и сегментации, естественно, требуется установление дорзо-вентральной оси и создание определенных границ вдоль нее. Подразделение тела на компартменты вдоль дорзо-вентральной оси у *Drosophila* протекает практически одновременно с сегментацией. Механизм этого процесса так же состоит из каскада генных взаимодействий, и так же как и процесс сегментации, начинается с трансформации информации материнских генов в дифференциальную экспрессию генов зиготы.

### 1.2.1. Материнские гены

Известно 11 генов дрозофилы: *gastrulation-defective*, *dorsal* (*dl*), *windbeutel*, *nudel*, *tube*, *pipe*, *snake*, *easter*, *Toll*, *spätzla*, *pelle* [10, 11, 455], мутации которых у матерей приводят к появлению эмбрионов, лишенных всех латеральных и вентральных производных, прежде всего мезодермы, а также вентральной кутикулы [7], и один ген *cactus* (*cact*), мутации которого вызывают развитие только вентральных структур [562]. Четыре из 12 упомянутых генов дрозофилы клонированы, и установлено, что они имеют гомологи у позвоночных [379]. В противоположность тому, что известно о морфогене передней половины тела — гене *bcd*, в настоящее время не имеется данных, которые говорили бы о градиентном распределении транскриптов материнских генов дорзо-вентральной полярности, или о том, что различная концентрация продуктов этих генов определяет позиционную информацию. Таким образом, образование дорзо-вентральной полярности происходит по механизму, отличающемуся от механизма становления передне-задней оси [379].

Судя по тому, что мутации, инактивирующие функцию каждого из 11 материнских генов, приводят к одному и тому же фенотипу — дорзализации эмбрионов — все эти гены вовлечены в каскад реакций, приводящий к асимметричному распределению материнских детерминант дорзо-вентральной полярности. Эксперименты по трансплантации цитоплазмы или мРНК зародышей дикого типа в мутантные эмбрионы и секвенирование клонированных генов показывают, что функции этих генов сильно различаются. Так, нормальное развитие зародышей му-



ванных мутантов *dl* – белок локализуется только в цитоплазме, а у вентрализованных – ядерный градиент сдвигается в дорзальном направлении.

Среди изученных генов, действие которых предшествует активности гена *dl*, ближе всего к нему в цепи реакций находится ген *Toll* [9]: гены *kudel*, *pipe*, *gastrulation defective*, *snake* и *easter* действуют "раньше", чем *Toll*. Кроме того, ген *Toll* – единственный из этой группы генов, продукт которого способен детерминировать организацию дорзо–вентральной оси: восстановление способности к нормальному развитию у мутантов, утративших активность гена *Toll*, может быть достигнуто инъекцией цитоплазмы из любого района тела зародышей дикого типа, но при этом, в противоположность всем мутантам этого класса (в том числе и *dl*–мутантам), место инъекции детерминирует ту область, в которой будут образовываться наиболее вентральные структуры [7]. Тем не менее, транскрипт гена *Toll* равномерно распределен в раннем зародыше [260], поэтому остается неизвестным, каким образом *Toll*–белок накапливается или модифицируется в будущей вентральной области. Ген *Toll* кодирует мембранный белок, имеющий большой внеклеточный домен, содержащий многократно повторяющиеся 22–26–членные последовательности, богатые лейцином [260]. Белок с очень сходной структурой, хаоптин, играет важную роль в межклеточной адгезии при морфогенезе фоторецепторных структур у *Drosophila* [512, 639 в]. Структурное сходство с *Toll*–белком имеют и некоторые белки млекопитающих, в том числе  $\alpha$ –цепь *Ib*–гликопротеиде тромбоцитов (*GP1b- $\alpha$* ) [461]. Внеклеточный домен *GP1b- $\alpha$*  функционирует как рецептор для тромбина и фактора фон Виллебранда, а внутриклеточный домен, по-видимому, ассоциирован с активным цитоскелетом [461]. По аналогии с *GP1b- $\alpha$*  можно предположить, что *Toll*–белок является рецептором каких-то диффундирующих лигандов. Каким образом связывание этих лигандов с *Toll*–белком способствует созданию позиционной информации – неизвестно [379]. Поскольку по существующим генетическим наблюдениям [8] активность гена *Toll* играет, вероятно, прямую роль в регуляции внутриклеточного распределения продукта гена *dl*, можно предположить, что "активированный" *Toll*–белок высвобождает "заякоренную" цитоплазматическую форму белка *dl*, изменяя состояние актиновых филаментов [534].

В этом тексте пока не упоминалась еще одна группа генов, от активности которых в оогенезе зависит как дорзо–вентральная полярность оболочки яйца, так и зародыша. Эта группа генов включает гены *gurken* и *torpedo*, мутанты которых имеют вентрализованный фенотип, а также гены *fs* (1) *K10*, *Carriccino*, *spaire* –дорзализирующие фенотип [410, 561]. По всей видимости, эти гены ответственны за глобальную пространственную организацию ооцита, поскольку некоторые мутации этих генов влияют на становление не только дорзо–вентральной, но и передне–задней оси. О механизме действия этих генов практически ничего неизвестно. Неизвестно также, взаимодействует ли какой-либо из этих генов с дорзализирующей группой материнских генов, упоминаемых выше, или с геном *cactus*. Тем не менее, обнаружили [599], что у мутантов по гену *torpedo*, кодирующему белок, гомологичный рецептору эпидермального фактора роста позвоночных [113], нарушается градиент ядерной локализации гена *dorsal*. G. Steward (1989) предполагает, что ген *torpedo* действует на самой ранней стадии реакций, ведущих к определению дорзо–вентральной оси, воздействуя на один из генов дорзализации и (или) ген *cactus*.

T. Hunt [291] высказывает точку зрения, согласно которой позиционная информация вдоль дорзо–вентральной оси исходит от генов группы *torpedo*, интерпретируется продуктами гена *Toll* и "передается" гену *dl* посредством двух других генов дорзализации: *pelle* и *tube*, которые пока не охарактеризованы в молекулярных терминах.

Поскольку мутации гена *cactus* приводят к вентрализованному фенотипу, в соответствии с чем у этих мутантов продукт гена *dl* обнаруживается в ядрах не только будущих вентральных областей, но и в ядрах презумптивной дорзальной стороны тела [524], многие авторы предполагают, что пока еще не идентифицированный продукт этого гена выполняет роль цитоплазматического "якоря" белка *dl* [291, 524].

Поведение *dl*–белка напоминает поведение фактора транскрипции *NF- $\kappa$ B*, участвующего в активации транскрипции гена  $\kappa$ –цепей *Ig* в В–лимфоцитах [376]. Этот белок обнаруживается в ядрах активированных лимфоцитов, а в стимулированных клетках находится в комплексе с цитоплазматическим "якорем", *I- $\kappa$ B*. Фактор *NF- $\kappa$ B* высвобождается из комплекса благодаря модификациям белка *I- $\kappa$ B*, опосредованным протеинкиназой *C*. В случае предполагаемого комплекса *dl-cactus* условием его разрушения скорее являются модификации белка *dl* [291, 524].

Два других охарактеризованных в молекулярных терминах гена, участвующих в становлении дорзо-вентральной полярности — гены *snake* и *easter* — кодируют внеклеточные сериновые протеазы [92, 141]. На основании данных по строению активных центров двух этих протеаз [92] считается маловероятным, что какой-либо из этих ферментов может служить субстратом для другого. С другой стороны, вполне вероятно, что субстратом для *easter* протеазы является Toll-белок, и можно предположить, что "активация" белка Toll состоит в протеолизе этого белка. Интерпретируя фенотипические выражения двойных мутаций, доминантных по гену *easter* и рецессивных по гену Toll [92], предположили, что продукты этих генов образуют замкнутую регуляторную цепь, амплифицирующую пространственно локализованную активность обоих генов.

Следует подчеркнуть, что все приведенные выше соображения относительно роли генов *snake*, *easter*, *caucus*, Toll в становлении дорзовентральной полярности, к сожалению, спекулятивны. Реальные процессы, происходящие до возникновения ядерного градиента белка dl и механизм становления этого градиента пока неизвестны.

Некоторые предварительные идеи, касающиеся функции самого белка dl, дают информацию об его последовательности. Последовательность первых 300 нуклеотидов гена dl почти на 50% идентична эквивалентной части онкогена *v-rel* [598]. С-концевые участки этих белков совершенно различны. Вирусный белок p59<sup>v-rel</sup> высокоонкогенен для клеток кур и индюков [227, 641]. Мало, что известно об естественной функции клеточного гена *rel* у птиц, хотя доказано, что он способен трансактивировать поздний промотор вируса полиомы [223]. Хотя продукт вирусного онкогена *v-rel* обычно является ядерным белком, продукт клеточного протоонкогена чаще обнаруживается в цитоплазме. Карбоксильный конец молекулы белка *v-rel* содержит сигнал цитоплазматической локализации, способный конкурировать с сигналом ядерной локализации [255], который также имеется в белке *c-rel* и идентичен таковому сигналу в dl-белке. Трансформация клеток под действием продукта *v-rel* происходит одинаково эффективно как при цитоплазматической, так и ядерной локализации белка [227], что трудно объяснить на сегодняшний день.

Показано так же, что dl-белок способен активировать экспрессию с некоторых промоторов, но, по-видимому, неза-

висимо от каких-либо специфических регуляторных последовательностей [534].

Таким образом, как по аналогии с белком *rel*, так и по прямым данным, продукт гена dl способен к регуляции активности генов. Тем не менее, конкретный механизм его активности остается неизвестным. В то же время тесная корреляция между характером распределения dl-белка между ядром и цитоплазмой в разных областях тела при различных мутациях и фенотипом соответствующих мутаций ясно указывает на то, что концентрация dl-белка в ядре определяет будущую локализацию потомков этой клетки вдоль дорзо-вентральной оси. Таким образом, концентрация dl-белка в ядре является мерой дорзо-вентральной позиционной информации. Интерпретация этой информации осуществляется группой зиготических генов.

### 1.2.2. Зиготические гены

Существуют, по крайней мере, восемь зиготических генов, которые требуются для упорядоченной дифференцировки вдоль дорзо-вентральной оси. На сегодняшний день 5 из этих генов клонированы. Зародыши, мутантные по генам *zen* и *dpp Hind*, утрачивают нормальные дорзальные структуры [304, 640]. Отсутствие активности генов *snail*, *twist* приводит к отсутствию вентрального образования — мезодермы [577], тогда как мутации гена *single-minded* утрачивают производные наиболее вентральной эктодермы [127, 630].

Как и при экспрессии генов сегментации из класса парной регуляции, домены экспрессии некоторых из перечисленных выше генов первоначально весьма широки и перекрываются между собой, но со временем утончаются в более узкие полоски. Так, в случае гена *zen* это сужение зон экспрессии происходит в период ранней гаструляции [154] и, вероятно, при прямом взаимодействии белкового продукта гена dl с геном *zen* [534]. В других случаях утончение полос происходит более медленно и заканчивается позднее [468], когда зародыш уже состоит из клеток. Следовательно, в основе этого процесса лежат взаимодействия клеток. В связи с этим примечательно, что продукт гена *dpp Hind* оказался гомологом ТФР-β млекопитающих — пептида, участвующего в межклеточных взаимодействиях [468].

В противоположность постепенному сужению зон экспрессии дорзальных зиготических генов, экспрессия зиготических



генов, детерминирующих развитие вентральных производных, сразу же точно локализуется в пространстве. Эти различия согласуются с тем, что клетки дорзальной эктодермы остаются плюрипотентными еще некоторое время после стадии бластодермы [621], тогда как по направлению к вентральной стороне потенциал клеток становится все более и более ограниченным. Так, ген *twist* экспрессируется только в тех клетках бластодермы, которые будут инвагинировать в брюшную бороздку и образуют мезодерму [629]. Ген *single-minded (sim)* экспрессируется в виде двух узких полосок по обе стороны от зоны экспрессии гена *twist* [127, 630]. Как ген *sim*, так и ген *twist* кодируют ядерные белки [127, 629].

Двойные гетерозиготы по генам *dl* и *twist* ( $dl^{-/+}; twist^{-/+}$ ) не способны к образованию мезодермы, так же как и гомозиготы  $twist^{-}$ , а двойные гетерозиготы по генам *dl* и *snail* ( $dl^{-/+}; sna^{-/+}$ ) имеют фенотип гомозигот *snail*. Интерпретация этих данных состоит в том, что пониженная доза продукта гена *dl* вызывает уменьшение уровня активности генов *twist* и *snail*. Таким образом, механизм действия гена *dl*, по-видимому, состоит в региональной активации генов *twist* и *snail*. Как продукт гена *twist*, так и продукт гена *snail*, вероятно, способны связываться со специфическими последовательностями ДНК, так как первый из них содержит амфипатический мотив спираль-петля-спираль [438], а второй — 5 "цинковых пальцев" [60]. Вполне вероятно, что продукт гена *dl* может выполнять и еще одну функцию: подавлять экспрессию генов *frp* и *zen* в вентральных областях тела [379].

Таким образом, каскад взаимодействий, по крайней мере 12 материнских генов, приводит к преимущественной локализации продукта гена *dorsal* в ядрах вентральных областей тела ранних эмбрионов *Drosophila*. В свою очередь, активность гена *dl* приводит к региональной экспрессии некоторых зиготических генов, детерминирующих судьбу клеток вдоль дорзо-вентральной оси. Детальная регионализация вдоль этой оси определяется взаимодействием зиготических генов этой группы. Обращает на себя внимание принципиальное сходство между спецификацией судьбы клеток вдоль задне-передней оси в пределах одного парасегмента и вдоль всей дорзо-вентральной оси. Так же, как наиболее передние клетки каждого парасегмента жестко маркируются на стадии бластодермы путем активации в них гена *en*, так и наибо-

лее вентральные клетки тела зародыша с большой точностью сразу же маркируются благодаря экспрессии гена *twi*. Далее спецификация кзади парасегмента и спецификация более дорзальных структур протекает постепенно и при участии внеклеточных сигнальных молекул (продукт гена *wg* при спецификации парасегмента и продукт гена *frp* при спецификации дорзальных структур).

Если сравнивать стратегии становления задне-передней и дорзо-вентральной осей у *Drosophila* в целом, то можно увидеть о другое сходство этих процессов. В каждой из трех рассмотренных здесь систем образование ориентации и асимметрии (система организации передней и задней половины тела и система дорзо-вентральной организации) первоначальный толчок к асимметрии заложен в полярности фолликулов, возникающей на раннем этапе оогенеза. Полярное расположение питающих клеток по отношению к ооциту определяет возникновение асимметрии при становлении задне-передней оси в переднем и заднем отделах тела, в то время как для становления дорзо-вентральной оси определяющим фактором является асимметрия соматических фолликулярных клеток [561]. Помимо двух систем генов, определяющих передне-заднюю полярность переднего и заднего концов тела, существует отдельная, не упоминавшаяся в этом тексте система материнских генов, заведующая спецификацией терминалиев тела мухи. Центральную роль в этой системе играет ген *torso* [215]. Так же как в случае системы генов, определяющих дорзо-вентральную полярность, первоначальным толчком, закладывающим асимметрию в экспрессию генов группы *torso*, являются сигналы, посылаемые асимметрично расположенными специализированными фолликулярными клетками [338]. Вероятно, что рецептором этих сигналов служит продукт самого гена *torso*, который является мембранным рецептором тирозинкиназного типа [588].

Несмотря на сходства в принципах функционирования систем генов, обеспечивающих детерминацию плана строения тела мухи, критические этапы в действии этих систем регулируются различными механизмами. Так, система материнских генов, отвечающая за правильную локализацию активности зиготических генов в переднем конце тела, "использует" для этого градиент белка *bcd*, образующийся за счет его диффузии от прелокализованного транскрипта соответствующего гена. Закономерное распределение экспрессии зиготических генов в задней части зародыша возникает, главным образом, благодаря пространствен-

ной самоорганизации этой системы генов. Наконец, дорзо-вентральная упорядоченность активности соответствующих генов строится на сложнейшей цепи реакций, приводящих к градиенту транслокации белка *dl* в ядра.

Мало что известно о механизмах образования дорзо-вентральной и передне-задней осей у позвоночных. Тем более трудно сказать, в какой степени аналогичны или гомологичны эти процессы у позвоночных и насекомых. Однако даже на уровне сегодняшних скудных знаний некоторое сходство между ними уловить удается.

У амфибий зрелое яйцо асимметрично и состоит из анимальной (будущая эктодерма) и вегетативной (будущая энтодерма) гемисфер. Направление дорзо-вентральной и задне-передней осей детерминируется при оплодотворении: через точку вхождения спермия проходит вентральный меридиан и в том же полушарии яйца будет находиться хвостовая часть зародыша. Первым актом, определяющим оси, является определяемый местом вхождения спермия сдвиг цитоплазмы по отношению к кортексу яйца [639-и]. Неизвестные сегодня механизмы преобразуют этот сдвиг в выработку энтодермой полипептидов, принадлежащих к семействам ТФР- $\beta$  и ФРФ, которые индуцируют образование мезодермы из наиболее близких к вегетативному полушарию клеток эктодермы [584]. Это последнее утверждение основано на нескольких группах фактов. Обнаружено, что выделяемый культивируемыми клетками шпорцевой лягушки фактор ХТС-MIF, способный индуцировать мезодерму в анимальных полусферах, принадлежит к  $\beta 2$ -семейству ТФР [521, 583, 585]. Сами очищенные ТФР- $\beta 2$  и ФРФ обладают тем же действием [330, 581]. Далее обнаружено, что ооциты действительно содержат мРНК ФРФ [329], а известная ранее мРНК, называемая *Vg1* и локализуемая в вегетативном полюсе яйца, принадлежит к семейству ТФР [646]. Интересно, при этом, что *Vg1* РНК несколько гомологичнее гену *dpp*, участвующего в спецификации дорзальных областей тела ранних зародышей *Drosophila* [468], чем гену ТФР. *Vg1* РНК равномерно распределена по вегетативному полушарию и равномерно же транскрибируется [133]. По аналогии с другими членами семейства ТФР, белковый продукт *Vg1* должен быть процессирован до активного фрагмента. Действительно, такой процессинг в зародышах был обнаружен [615].

Проявления дифференцировки вдоль дорзо-вентральной оси начинаются с мезодермы в момент ее возникновения (то же

самое верно для дифференцировки вдоль передне-задней оси тела). На основании данных, приведенных в предыдущем абзаце была сформирована концепция, согласно которой сигнал для вентрализации части мезодермы — это ФРФ, а сигнал для дорзализации другой ее части — это продукт *Vg1* [658]. Согласно этой модели, активный ФРФ локализуется по всему вегетативному полушарию и распространяется в направлении анимального полюса, в то время как продукт *Vg1* (сходный с белком *dpp*) ограничен дорзальным районом вегетативной области. Эта широко распространенная точка зрения никем не опровергнута, но и не доказана окончательно. В частности, остается неизвестным, локализуется ли процессированный пептид *Vg1* в дорзальном районе вегетативной области и имеет ли он биологическую активность. Абсолютно неизвестно также, каким образом смешение цитоплазмы относительно кортекса способно вызывать ориентированную секрецию ФРФ (в направлении анимального полюса) и локальное накопление модифицированного продукта *Vg1*. Важно подчеркнуть, что контроль этих процессов не может осуществляться ни на уровне транскрипции, ни на уровне трансляции [658]. Регуляция не может зависеть от активности зиготических генов, так как ни один из них еще не транскрибируется на этой стадии. Следовательно, механизм контроля имеет другую природу. В этой связи уместно упомянуть недавние работы [331, 639-л], в которых показано, что на стадии образования мезодермы эмбрион шпорцевой лягушки, помимо транскрипта, кодирующего ФРФ, и самого ФРФ, содержит короткий антисмысловой транскрипт, перекрывающий часть кодирующей последовательности ФРФ. Этот антисмысловой транскрипт кодирует высококонсервативный полипептид с мол. массой в 25 кД. Обнаружено также, что эта антисмысловая РНК при образовании дуплекса с мРНК ФРФ вызывает в ней замену некоторых оснований. По-видимому, эти взаимодействия изменяют стабильность мРНК ФРФ.

Образование мезодермы у шпорцевой лягушки неразрывно связано с ее регионализацией как вдоль передне-задней оси, так и вдоль дорзо-вентральной оси. Передне-заднюю спецификацию мезодермы и связанную с этим процессом дифференциальную экспрессию гомеотических генов мы описывали ранее. Дорзо-вентральная поляризация мезодермы так же отражается в дифференциальной экспрессии генов. Так, в момент гаструляции ген *MyoD* (ядерный фосфопротеид способный активировать гены, создающие мышечный фенотип) начинает

экспрессироваться в районе будущих сомитов [282]. В то же самое время ген *xtwi*, гомолог гена *twi*, участвующего в спецификации района будущей мезодермы при компартиментализации вдоль дорзально-вентральной оси у *Drosophila*, начинает экспрессироваться во всей мезодерме зародыша, за исключением сомитов [283]. Еще один ген, немедленно экспрессирующийся в возникающей мезодерме — ген *Mix.1*, содержащий гомеобокс типа *paired* [520].

Таким образом, механизмы детерминации дорзо-вентральной оси у насекомых и амфибий, как и следовало ожидать, совершенно различны. Некоторое сходство, однако, можно обнаружить, сравнивая позднюю стадию дорзо-вентральной спецификации у *Drosophila*, которая протекает в уже целлюляризированной бластодерме с индукцией мезодермы у шпорцевой лягушки. В обоих случаях в процессе участвуют факторы роста из семейства ТФР- $\beta$ . У *Drosophila* это происходит при активации гена *dpp*, а у шпорцевой лягушки, видимо, при локальном накоплении продукта *Vg1*. Кроме того, у обоих, столь далеко филогенетически отстоящих друг от друга организмов, возникновение мезодермы тесно связано с экспрессией гомологичных генов: *twi* и *xtwi*.

При рассмотрении раннего развития *Drosophila* можно обнаружить две различные фазы этого процесса. Первая фаза состоит в подразделении тела на все более и более мелкие домены, каждый из которых характеризуется экспрессией определенного набора регуляторных генов. Реализация этого процесса происходит до целлюляризации зародыша в основном благодаря взаимодействию генов, кодирующих факторы транскрипции, содержащие ДНК-связывающие гомеодомены или "цинковые пальцы". Начинается эта фаза с асимметрической локализации материнских детерминант и заканчивается установлением трехмерных "ортогональных" доменов тела, внутри которых происходит последующая биохимическая и морфологическая спецификация.

Эта последующая фаза начинается после того, как бластодерма приобретает клеточное строение и, следовательно, основана на выработке и приеме межклеточных сигнальных молекул.

Хотя синцитиальная стадия развития характерна лишь для небольшой группы насекомых, принципы, лежащие в основе ранней компартиментализации зародышей *Drosophila* вероятно, широко реализуются в раннем эмбриогенезе животных. Примером может служить локализация *Vg1*-транскрипта в вегетативном полюсе яйца шпорцевой лягушки.

Во второй фазе развития *Drosophila*-спецификации определенных доменов, основанной на взаимодействии клеток внутри ограниченного компартамента тела, очевидно, используются молекулярные механизмы, общие для всех организмов. В этих процессах и у насекомых, и у позвоночных участвуют близкородственные гены: семейства факторов роста, гены *engrailed*, *twist*, *wingless* и *int1*; НОМ и НОХ-комплексы).

Одновременно с завершением детерминации общего плана строения тела и наступлением стадии клеточной бластодермы начинаются собственно морфогенетические процессы, связанные с гастрულიей. Тело зародыша начинает приобретать все более сложную форму в результате неравномерного увеличения размеров его участков и, главное, вследствие их изгибов и перемещений. Эти процессы требуют включения новых классов генов, кодирующих "морфогенетические" молекулы. К ним, в первую очередь, можно отнести молекулы, опосредующие межклеточную адгезию, молекулы, обуславливающие прикрепление клеток к неклеточным субстратам, а также молекулярные компоненты цитоскелета, от которых зависит форма клеток, их способность к перемещению и некоторые другие механические свойства, позволяющие создавать дифференциальное распределение механических напряжений в пространстве и преобразовывать эти напряжения в изменение формы.

В какой степени дифференциальная экспрессия генов морфогенетических молекул определяется характером пространственного распределения активности гомеотических генов и других факторов транскрипции, установившихся на предморфогенетической стадии развития, — это тот важнейший вопрос, который, вероятно, будет решаться в ближайшие годы при изучении развития на примере *Drosophila*. Первые результаты исследований такого рода весьма многообещающи. Так, продукт гена *SP2* дрозофилы, первоначально обнаруженный как специфически локализованный поверхностный антиген, оказался родственными рецепторам фибронектина, принадлежащим к семейству интегринов [50], и, таким образом, принадлежит к числу молекул, опосредующих взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом. Ген *SP2* впервые экспрессируется в раннем эмбриогенезе и, вполне вероятно, активируется ядерным белком *twist*. Во всяком случае, мутации по гену *twist* предотвращают экспрессию гена *PS2*. Идентифицированы гены *Drosophila*, кодирующие белки семейства фасцилинов, которые имеют значительное сходство с молекулами межклеточной адгезии позвоночных [43, 259, 586]. Фасцилины

избирательно экспрессируются на конусах роста фасцикулированных аксонов некоторых групп нейронов и, возможно, участвуют в процессе образования избирательных нервных связей в центральной нервной системе [25, 178, 684]. Предполагают [299], что включение генов фасцилинов в определенных подгруппах нейронов может регулироваться различными гомеобоксодержащими генами, маркирующими специфические зоны центральной нервной системы.

Для того, чтобы получить более полное представление о структуре и функционировании морфологических молекул, мы должны обратиться к тем данным, которые получены на более изученном в этом отношении материале — клеткам позвоночных.

## 2. МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ

В первом приближении образование новой формы можно выразить как сумму нескольких "элементарных" событий: локальное увеличение или уменьшение клеточной массы, перемещение отдельных клеток или их коллективов, изменение формы индивидуальных клеток или клеток в составе агрегатов, трансформации клеточного пласта в популяцию свободно мигрирующих клеток и, наоборот, превращение мезенхимы в эпителий, изгиб клеточных пластов.

Понятно, что эти "элементарные" события слагаются из взаимодействия огромного числа самых различных молекулярных взаимодействий. Тем не менее, для каждого такого события можно попытаться, пусть грубо, выявить такие звенья молекулярных взаимодействий, которые являются движущей силой происходящих изменений.

Локальное увеличение или уменьшение клеточной массы,

матрикса, молекулами специализированных соединений между клетками и молекулами, составляющими цитоскелет. Ниже мы рассмотрим структуру этих молекул, их свойства и механизмы некоторых опосредуемых ими морфогенетических событий.

### 2.1. Молекулы межклеточной адгезии

Молекулами межклеточной адгезии (ММА) (cell adhesion molecules) (CAMs) называют интегральные мембранные гликопротеины, имеющие протяженный внеклеточный домен (N-концевая часть молекулы) и участвующие в межклеточной адгезии, как правило, вне специализированных контактных структур клеточной поверхности [170]. Несколько таких гликопротеинов довольно хорошо изучены. Это так называемые N-CAM [131]; L-CAM [212], P-кадгерин [451]; N-кадгерин и L-гликопротеин [612]. Приведенные названия имеют много синонимов, так как соответствующие молекулы были описаны независимыми группами авторов. Так, N-CAM идентичен антигену BSP-2 [231], L-CAM известен также под названиями увоморулин [516], E-кадгерин [439], cell CAM 120/80 [134] и Arc-1 [34]. Молекулы, описанные под названием N-cal CAM [128] и A-CAM [639] оказались идентичными N-кадгерину. Особенно "не повезло" гликопротеину L1, который именовали как NILE [29]; Ng CAM [244], 8D9 [375], G4-гликопротеин [508], антиген 69A1 [494] и белок ASCS4 [609]. В последние годы было описано несколько ММА, которые, судя по их первичной структуре, не родственны N-CAM, кадгеринам и гликопротеину L1. К этим ММА относятся гликопротеин F11, который экспрессирован на поверхности нейронов и представлен дуб-

R-когнин, адгезионный фактор, специфический для эмбриональных клеток сетчатки [256] с мол. массой 50 кД, а также астротактин, имеющий мол. массу 100 кД и опосредующий адгезию между нейронами и астроцитами [175]. Первичная структура этих трех последних ММА пока неизвестна.

Особый тип ММА (CSA) обнаружен у слизевика *Dictyostellium* [447], у которого агрегация клеток представляет собой переход из одной фазы жизненного цикла в другую. ММА *Drosophila* будут описаны ниже.

### 2.1.1. Структура молекул и специфичность экспрессии N-CAM

#### 2.1.1.1. N-CAM

На сегодняшний день, пожалуй, наиболее изученная молекула межклеточной адгезии. На гаплоидный набор в клетках птиц и млекопитающих содержится единственный ген, кодирующий N-CAM, который у мыши расположен на хромосоме 9 [131]. Существуют, по крайней мере, 10 полипептидных форм N-CAM [233, 503, 543], возникающих при альтернативном сплайсинге [467]. Три главные, наиболее часто встречающиеся изоформы, представляют собой гликопротеины с мол. массами 180, 140 и 120 кД [24, 131]. Наиболее высокомолекулярная изоформа имеет 3 домена: цитоплазматический (С-концевой), трансмембранный и внеклеточный. В N-концевой части внеклеточного домена последовательно расположено 5 так называемых иммуноглобулино-подобных доменов. Эти домены образованы участками последовательности длиной около 100 аминокислотных остатков, каждый из которых содержит 2 цистеиновых остатка, образующих внутримолекулярные дисульфидные связи. Эти S-S связи стабилизируются взаимодействиями между другими консервативными остатками последовательности, в результате чего образуются 2β-слоя, свернутые вокруг гидрофобного ядра. Такие домены обнаружены во многих белках (впервые в иммуноглобулинах), участвующих в адгезии или связывании [656]. Эти белки составляют так называемое суперсемейство иммуноглобулинов, весьма вероятно, имеющее одного общего эволюционного предка. Из известных членов этого семейства, молекула N-CAM, видимо, наиболее близка по структуре к этому общему предку [168].

Наиболее высокомолекулярная (180 кД) форма N-CAM (1d-полипептид) отличается от "средней" (140 кД) изоформы (sd-полипептид) размером цитоплазматического домена. В полипептиде sd отсутствует участок цитоплазматического домена длиной в 261 аминокислотный остаток, кодируемый 18-м экзоном [131]. Третья изоформа N-CAM (120 кД) (ssd-полипептид) вовсе не имеет ни цитоплазматического, ни трансмембранного домена. Взамен этого на С-конце ssd-полипептида имеется последовательность, кодируемая 15-м экзоном, отсутствующая в 1d и sd-изоформах. Благодаря своей уникальной последовательности, ssd N-CAM способен заякориваться в мембране через фосфатидилинозитол [168]. Различия между изоформами N-CAM в строении цитоплазматического домена должны влиять на ассоциацию этих изоформ с компонентами цитоскелета или обуславливать различия в способности к фосфорилированию, так как 18-й экзон кодирует несколько сайтов фосфорилирования [403], а также область, предположительно участвующую во взаимодействии с цитоскелетом [498]. Таким образом, реакции клеток на связывание различных изоформ N-CAM с внеклеточным лигандом (N-CAM другой клетки) могут существенно различаться. Укороченная ssd изоформа N-CAM может регулируемо высвобождаться из связи с мембраной через лиганды и становиться секреторируемой молекулой, накапливаясь во внеклеточном матриксе [116, 119].

Известны также формы альтернативного сплайсинга N-CAM, изменяющие структуру внеклеточного домена [543]. Обнаружена изоформа N-CAM человека, специфическая для мышечных клеток, которая имеет небольшую дополнительную последовательность в том районе внеклеточного домена, который примыкает к мембране [145].

Из других важных особенностей строения молекул N-CAM следует отметить сайт связывания полисиаловых кислот, находящийся в Ig-подобном домене, который расположен ближе других к мембране и находится приблизительно в середине молекулы [132], и гепарин-связывающий участок, локализованный на N-конце [117].

Полисиаловые кислоты являются обычным компонентом стенки некоторых бактерий, но не встречаются у животных, за исключением молекул N-CAM [132]. Количество полисиаловой кислоты, связанной с N-CAM, может варьировать в 3-4 раза, причем во взрослом организме наблюдается уменьшение сиалирования по сравнению с эмбриональными формами N-CAM

[171, 536]. Вариации в степени полисиалирования изменяют силу связывания между молекулами N-CAM; так, переход эмбриональных форм N-CAM во "взрослые" формы увеличивает связывание в 3-4 раза [274, 536].

Связывание гепарина с соответствующими N-концевым доменом N-CAM, по-видимому, индуцирует конформационные изменения молекулы, способствующие взаимодействию двух N-CAM различных клеток [118, 119].

В этой же части внеклеточного домена всех изоформ N-CAM, которая находится ближе к трансмембранному домену, расположены 2 так называемых фибронектино-подобных повтора III типа. Последовательность этого типа около 100 аминокислотных остатков в длину, впервые была обнаружена в фибронектине, где повторяется по крайней мере, 15 раз. Повторы этого типа встречаются во многих белках внеклеточного матрикса и некоторых ММА, например, в L1, фасцилине II и контактине [6]. Функциональная роль фибронектино-подобных повторов типа III неизвестна.

N-CAM характеризуется гомофильным типом связывания второго порядка, то есть одна молекула N-CAM связывается с другой такой же молекулой, находящейся на поверхности соседней клетки [169, 274, 535]. Структура связывающего центра и физико-химическая природа связывания неизвестны. Известно только, что связывающий центр находится на N-конце молекулы, но не совпадает с участком связывания гепарина [117] и, что связывание не зависит от присутствия иона  $Ca^{2+}$  [535]. Показано, что сравнительно небольшое изменение плотности молекул N-CAM на единицу поверхности приводит к резкому увеличению скорости связывания искусственных лигандных пузырьков, содержащих встроенный N-CAM [167]. Это, по-видимому, означает, что увеличение поверхностной плотности молекул N-CAM приводит к образованию мультивалентных компонентов, образующихся либо за счет дис-взаимодействий внеклеточных доменов этих молекул, либо за счет закоривания их цитоплазматических доменов на цитоскелет.

N-CAM начинает экспрессироваться на ранних этапах эмбриогенеза в клетках всех трех зародышевых листков [129]. Однако Id-изоформа N-CAM, как и соответствующая мРНК, обнаруживаются только в клетках нервной системы, но не в других тканях [436, 499, 504]. Дифференциальная экспрессия N-CAM на поверхности различных клеток в эмбриогенезе, координированная с дифференциальной экспрессией

других ММА, по-видимому, играет огромную роль в морфогенетических событиях [201, 202, 276]. Мы вернемся к этому вопросу позже.

#### 2.1.1.2. L-CAM и другие кадгерины

L-CAM и другие кадгерины имеют очень сходную друг с другом структуру, которая резко отличается от структуры большинства других ММА [167]. L-CAM не содержит Ig-подобных доменов и фибронектин-подобных повторов типа III, не содержит полисиаловой кислоты и участка связывания гепарина. Молекула L-CAM, имеющая мол. массу 124 кД, закреплена в мембране посредством гидрофобного трансмембранного домена, имеет короткий внутриклеточный и более протяженный N-концевой внеклеточный домен, на конце которого расположен центр связывания [212]. Молекула состоит из 4 высококонсервативных взаимогомологических доменов и имеет 4 сайта гликозилирования, а также 6 сайтов связывания иона  $Ca^{2+}$ . Как конформация молекулы L-CAM, так и связывающая активность зависят от присутствия кальция. При удалении этого металла L-CAM становится сверхчувствительной к протеолизу [516]. Подобно N-CAM, L-CAM характеризуется гомофильным типом связывания [167].

L-CAM обнаруживается уже на поверхности неоплодотворенной яйцеклетки у мыши, а его синтез начинается с поздней двухклеточной стадии [459, 639ж]. Затем экспрессия этого гликопротеина постепенно становится ограниченной эпителиальными тканями [167, 459, 671]. Р-кадгерин обнаруживают в основном на поверхности клеток плаценты и децидуальных клеток [452]. N-кадгерин у кур впервые появляется на мезодермальных клетках при гастрюляции [262], а затем экспрессирован в нервной ткани, хрусталике и миокарде у кур и мышей [262, 263, 612].

#### 2.1.1.3. L1-гликопротеин

Гликопротеин L1, как и большинство ММА, принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов [430]. L1-гликопротеин имеет мол. массу около 200 кД и может подвергаться посттрансляционному расщеплению на два фрагмента: 135 и 80 кД [430]. В молекуле L1 имеется 6 Ig-подобных домена, сгруппированных ближе к N-концу внеклеточного домена и 3 фибронектин-подобных повтора типа III локализован-

ных ближе к С-концу внеклеточной части этого гликопротеина. Интересной особенностью L1-гликопротеинов является присутствие двух RGD-содержащих последовательностей в одном из Ig-подобных доменов [430]. RGD-последовательность идентифицирована во многих гликопротеинах внеклеточного матрикса, в которых она специфически распознается соответствующими клеточными рецепторами семейства интегринов (см. ниже) и таким образом опосредует адгезию клеток [533]. Функционируют ли RGD-последовательность гликопротеина L1 как лиганды интегринов — неизвестно, и этот вопрос нельзя решить априори, поскольку к настоящему времени идентифицировано более 120 белков, содержащих RGD-последовательность, большинство из которых не связывается с интегринными и не имеет адгезионных свойств [665].

Гликопротеин L1 обнаруживают на поверхности аксонов ограниченной популяции постмитотических нейронов центральной нервной системы [326, 554] и шванновских клетках периферической нервной системы [413, 541]. Гликопротеин L1, по-видимому, участвует в адгезии между нейронами и адгезии нейронов к клеткам глии в процессе миграции нейронов [384]. Гомофильное связывание L1-L1 протекает очень медленно [318], однако присутствие N-CAM способно резко изменить кинетику этого процесса. L1-гликопротеин связывается с N-CAM на поверхности одной и той же клетки (дис-связывание) посредством углеводных остатков [319]. Такое дис-связывание приводит к резкому усилению транс-связывания молекулы L1 и комплексом L1-N-CAM, находящихся на поверхности соседних клеток [318]. Поскольку L1 не экспрессирован на клетках глии, то связывание между этими клетками и нейронами, опосредованное L1, должно носить гетерофильный характер, однако лиганд для L1 на поверхности глии неизвестен [167]. Помимо нервной системы, L1 обнаружен в клетках герминативной зоны крипт взрослых мышей, но не в дифференцированных базальных или апикальных клетках крипт [631]. В той же работе было показано, что агрегация предварительно диссоциированных клеток крипт, но не клеток ворсинок, предотвращается антителами к L1. Эти наблюдения показывают, что L1 участвует в организации популяции клеток крипты.

#### 2.1.1.4. ММА *Drosophila*

У *Drosophila* было клонировано 3 последовательности высокоомологичных генам ММА позвоночных. Это фасцилин II, гомологичный N-CAM [259], нейроглиан, гомологичный гликопротеину L1 [43] и последовательность 1 (2) gl, кодирующая белок, гомологичный ММА семейства кадгеринов [333]. Кроме того, было клонировано 2 гена, кодирующих ММА, не принадлежащих ни к одному из известных семейств: фасцилин I и фасцилин III [178, 586, 684].

Фасцилин I представляет собой мембраносвязанный гликопротеин, экспрессирующийся на поверхности всех аксонов периферической нервной системы и фасцикулированных аксонах центральной нервной системы, а также на поверхности некоторых ненейрональных клеток в период эмбрионального развития [25, 684]. Судя по последовательности кДНК, фасцилин I — это белок, имеющий мол. массу 70 кД и состоящий из четырех тандемных доменов по 150 аминокислот каждый; 3 из 4 доменов содержат высококонсервативные гомологичные повторы длиной в 40 аминокислот [684]. В мембране фасцилина I, по-видимому, закорен на фосфатидилинозитол [178]. Трансфекция культивируемых клеток дрозофилы линии S2 кДНК фасцилина I показывает, что этот белок является гомофильной ММА, которая может осуществлять сортировку клеток в агрегаты [178].

#### 2.1.2. Закономерности экспрессии N-CAM и кадгеринов при морфогенетических процессах

Как можно заключить уже из предыдущего раздела, такие ММА, как N-CAM и N-кадгерин, экспрессируются на поверхности клеток самого разного происхождения и имеющих различную судьбу [167, 612]. Некоторая тканевая специфичность свойственна для L-CAM и P-кадгерина. Таким образом, изменения в экспрессии ММА коррелируют в основном не с образованием специфической ткани, а с такими элементарными морфогенетическими событиями, как отщепление (сегрегация) дочерней субпопуляции клеток от исходной материнской популяции, переход из стационарного состояния к состоянию миграции или переход к агрегации клеток из состояния рыхлой упаковки. Рассмотрим несколько примеров, иллюстрирующих характер изменений в экспрессии L- и N- при морфогенетических процессах. L-CAM и N-CAM являются

ся уже на очень ранних стадиях эмбриогенеза, раньше, чем другие известные ММА, поэтому их иногда называют первичными ММА [167]. L-CAM экспрессирован на двухклеточной стадии [639ж], а N-CAM может быть обнаружен у кур уже на стадии бластодермы (клетки которой экспрессируют и L-CAM) [173].

С наступлением гастрულიции клетки эпибласта, мигрирующие через первичную полосу, утрачивают обе ММА, а при последующей конденсации в мезобласт реэкспрессируют N-CAM, но не L-CAM [129]. В период нейрональной индукции клетки эпибласта утрачивают либо один, либо другой CAM, в зависимости от расположения относительно индуктора. Клетки эпибласта, превращающиеся в нейрональную пластинку, утрачивают L-CAM, а клетки будущей соматической эктодермы более медленно и постепенно теряют N-CAM на своей поверхности [129].

Когда клетки нервного гребня отделяются от своих N-CAM-положительных соседей по нейроэпителию и мигрируют по определенным путям по своему телу зародыша, они утрачивают экспрессию N-CAM, но при реагрегации и образовании сенсорных ганглиев они вновь восстанавливают N-CAM, на своей поверхности [612].

Эпителий эмбриональной кишки до образования придатков содержит как N-CAM, как и L-CAM. В момент почкования из него зачатка поджелудочной железы эпителий кишки содержит уже только L-CAM, тогда как зачаток продолжает экспрессировать обе ММА. Позднее при образовании ацинусов железы N-CAM исчезает и в этих структурах [129]. Сходная последовательность событий наблюдается и при образовании других производных эмбриональной кишки: щитовидной железы, печени и желчного пузыря.

При образовании у кур Вольфовых протоков из промежуточной мезодермы к экспрессированному ранее N-CAM добавляется L-CAM. Впоследствии при удлинении протока экспрессия N-CAM ослабевает, а экспрессия L-CAM усиливается. Мезонефрические протоки, образующиеся из N-CAM-положительной мезенхимы, содержат N-CAM, но сливаясь с Вольфовыми протоками, теряют эту ММА и начинают экспрессировать L-CAM. В боуменовской капсуле клетки париетального слоя содержат L-CAM, тогда как подоциты и эндотелий не экспрессируют ни N-, ни L-CAM [129, 627].

С началом образования зачатков конечностей у зародышей кур эктодерма, покрывающая почку конечности, начинает эк-

спрессировать как N-, так и L-CAM, в противоположность "покойшейся" эктодерме стенки тела, содержащей только L-CAM. При этом большая часть эктодермы почки конечности экспрессирует L-CAM только в пределах короткого интервала времени, тогда как апикальный эктодермальный гребень окрашивается антителами к обеим ММА во все время своего существования. Мезенхима почки конечности на первых этапах гомогенно окрашивается антителами к N-CAM. Затем N-CAM исчезает из тех областей, в которых образуется хрящ, а на более поздних стадиях содержание этой ММА сильно возрастает в образовавшихся мышцах, связках и перихондрии [129].

Особенно впечатляющий пример сложного морфогенеза, при котором чередующаяся упорядоченная экспрессия N-CAM<sup>+</sup> и L-CAM<sup>+</sup>-клеточных субпопуляций точно соответствует возникающей структуре — это процесс образования перьев. В различные временные интервалы зоны эпителиальных клеток, экспрессирующих L-CAM, начинают перемежаться с зонами клеток, содержащих N-CAM. Зоны L-CAM-содержащих клеток позднее начинают вырабатывать кератины и образуют элементы пера того или иного порядка, а зоны клеток, экспрессирующих N-CAM отмирают [110, 111].

Таким образом, изучение локализации ММА в период эмбрионального морфогенеза дает основание полагать, что эти молекулы играют важную, а возможно, и решающую роль в обособлении клеточных субпопуляций, а также участвуют в процессах эпителиально-мезенхимальных переходов. Описательно-коррелятивные исследования, однако, недостаточны для однозначного установления причинно-следственных связей и, тем более, для понимания механизмов, посредством которых ММА управляют поведением клеток.

### 2.1.3. Роль ММА в морфогенезе

#### 2.1.3.1. N-CAM и кадгерин

Предпринято немало попыток экспериментальной проверки значения ММА в морфогенетических процессах. Во многих работах для этой цели использовали специфические антитела к ММА, добавленные в культуры клеток, органы культуры или инъекцированные в зародыш. Инкубация фрагментов кожи 7-суточных зародышей цыплят, с Fab'-фрагментами антител к L-CAM приводит к нарушению развития перьев [210]. Антитела против N-CAM и N-кадгерина подавляют рост аксонов



клеток ганглиев сетчатки поверх глиальных клеток [445], при этом аксоны значительно лучше разрастаются поверх клеток, экспрессирующих N-кадгерин, чем поверх тех же клеток, в которых экспрессия N-кадгерина подавлена [415a].

Инъекция антител к N-CAM в область развивающейся зрительной системы зародышей цыплят, где экспрессия этой ММА обнаружена на аксонах клеток сетчатки и прилежащих клетках радиальной глии, приводит к смещению аксонов с поверхности клеток глии, нарушению фасцикуляции аксонов, дезорганизации зрительного пути в целом [202, 575, 623].

Эти исследования подтверждают иммуноморфологические данные, указывающие на важную роль ММА во взаимодействии клеточных поверхностей при морфогенетических процессах. Однако результаты экспериментов с применением блокирующих антител трудно поддаются однозначной интерпретации. Дело в том, что антитела или даже их фрагменты, связываясь с соответствующими антигенами на поверхности клеток, независимо от их специфичности, могут создавать стерические препятствия для нормального функционирования других, не родственных антигену, мембранных молекул, а также вызывать общие изменения поверхностной мембраны, тем самым влияя на многие свойства клетки. Эксперименты, убедительно демонстрирующие роль ММА в морфологической организации клеточных коллективов, были проведены при использовании трансфекции генов ММА в культивируемые клетки, до этого не экспрессировавшие таких генов. В одной из таких работ [423] культивируемые клетки плейоморфной саркомы мышей S-180 трансфицировали либо кДНК L-CAM, либо кДНК N-CAM, либо и тот, и другой. Исходная клеточная культура содержала смесь округлых и веретеновидных клеток при любой клеточной плотности. В результате трансфекции клетки начинали экспрессировать L-CAM (S-180L), N-CAM (S-180N), либо обе ММА (S-180L/N). При низкой клеточной плотности клеток S-180L никаких морфологических изменений в культуре не обнаруживали. Однако при достижении конfluence-ности клетки S-180L образовывали эпителиоидный пласт, в котором клетки становились распластанными, приобретали полигональную форму и тесно контактировали друг с другом. Клетки S-180N не изменяли своих морфологических характеристик, хотя были способны связывать липидные пузырьки со встроенной N-CAM. Клетки S-180L/N вели себя подобно клеткам S-180L. В эпителиоидных пластах и

тех, и других клеток L-CAM, по данным иммунофлуоресцентной микроскопии, концентрировался в области межклеточных контактов и сораспределялся с кортикальными пучками актиновых филаментов, в то время как в клетках S-180N-N-CAM равномерно распределялся по клеточной поверхности. При совместном культивировании клеток S-180L и клеток S-180L/N, N-CAM не концентрировался в районах контактов между S-180L и S-180L/N. Такую концентрацию N-CAM можно было наблюдать только в районах контактов клеток S-180L/N между собой. Fab'-фрагменты антител к L-CAM диссоциировали эпителиоидные пласты клеток S-180L и S-180L/N на клетки, морфологически неотличимые от нетрансфицированных, что является дополнительным контролем причинной связи между экспрессией L-CAM и образованием эпителиоидного пласта. Электронно-микроскопическое изучение ультраструктуры эпителиоидных пластов показало, что, в отличие от истинных эпителиальных структур, эпителиоидный пласт не имеет базо-апикальной полярности, а между клетками пласта отсутствуют десмосомы и плотные контакты. С другой стороны, в отличие от нетрансформированных клеток, между клетками пласта обнаружены многочисленные структуры щелевых и адгезионных контактов. Опыты по инъектированию красителя показали, что щелевые контакты между клетками эпителиоидного пласта функционально активны.

Морфологическое выражение результатов трансфекции L-CAM в мезенхимоподобные клетки зависит от каких-то неизвестных свойств трансфицируемой линии. Так, в отличие от клеток S-180, клетки линии L при трансфекции куриных генов L-CAM или N-CAM [172] или мышинного гена L-CAM [439] не образуют эпителиоидного пласта, но склеиваются в агрегаты. Отметим, что L-клетки одинаково реагируют агрегацией как на трансфекцию гена N-CAM, так и гена L-CAM [172], тогда как клетки S-180 меняют морфологию только при трансфекции геном L-CAM [423]. Трудно сказать, чем определяется различие в поведении двух линий клеток после их трансформации ДНК ММА. Образование либо эпителиоидного пласта, либо образование агрегатов может зависеть от интенсивности взаимодействия клеток двух различных линий с молекулами внеклеточного матрикса подложки. Морфологическая реакция клеток на экспрессию ММА может зависеть также от организации цитоскелета и характера взаимодействий данной ММА с его элементами. Экспериментальным подтверждением этой точки зрения служит работа [440], в которой

было показано, что укорочение цитоплазматического домена L-CAM, предположительно несущего сайты взаимодействия с молекулами цитоскелета, блокирует агрегацию клеток. Трудно себе представить, что изменение длины цитоплазматического домена L-CAM способно препятствовать взаимодействию N-концевых центров связывания этой молекулы друг с другом. Более вероятное объяснение состоит в том, что гомофильные взаимодействия молекул L-CAM недостаточны для агрегации, для которой, помимо этого, требуется взаимодействие цитоплазматического домена MMA с молекулами цитоскелета. О том, что такие взаимодействия реальны, говорят результаты работы, в которой обнаружено, что в

клетках собаки МДСК L-CAM находится в ассоциации с цитоскелетными белками - анкирином [444].

Ванной выше работе [423] содержится важное сообщение в том, что между клетками эпителия, индуцированного трансфекцией L-CAM, многочисленные адгезионные и щелевые контакты часто распределяются гомогенно по контактным мембранам, в ряде работ было отмечено L-CAM с участками мембраны, входящими в реализованных контактных структур адгезионного [339m]. Интересно, что контактные структуры такого типа могут возникать между клетками, несущими на поверхности различные MMA, принадлежащими к разным семействам кадгеринам: L-CAM (E-кадгерин) и N-CAM (N-кадгерин) [639m]. О структуре и молекулярном составе межклеточных контактов адгезионного типа известно много. Эти межклеточные контакты схожи по структуре с так называемыми фокальными контактами между клеткой и внеклеточным субстратом. Между этими структурами имеется сходство и по биохимическому составу: цитоплазматический плак обеих структур связывают с винкулином [222], и обе структуры заякориваются на актиновых филаментах [80]. Ключевым компонентом фокальных контактов являются трансмембранные интегрины, которые своим внеклеточным доменом взаимодействуют со специфическими сайтами молекул внеклеточного матрикса, а посредством цитоплазматического домена взаимодействуют с рядом других белков (талин, винкулин,  $\alpha$ -актинин), связанных с актиновыми филаментами [80]. Можно предположить, что MMA играют в межклеточных контактах ад-

гезионного типа ту же роль, что интегрины в фокальных контактах между клеткой и субстратом. Более того, при неизвестных пока дополнительных условиях взаимодействие между двумя MMA на прилегающих друг к другу клетках, возможно, инициирует сборку структур межклеточных контактов адгезионного типа. Вполне вероятно, что именно образование адгезионных контактов, заякоренных на актиновый цитоскелет, определяет возникновение структуры эпителиоидного пласта взамен простых клеточных агрегатов, которые возникают при склеивании клеток за счет "неструктурированных" MMA.

При индукции образования функционирующих щелевых контактов в описанных опытах в культуре, экспрессия L-CAM, по-видимому, играет ключевую роль. Так, показано, что количество щелевых контактов в клетках S-180 увеличивается и при склеивании их агглютинином из проростков пшеницы [423], причем эпителиоидного пласта при этом не возникает. Тем не менее при морфогенезе *in vivo* дифференциальная экспрессия различных MMA в сегрегирующихся друг от друга группах клеток может играть решающую роль в образовании субпопуляций клеток, связанных между собой щелевыми контактами, но не имеющими таких контактов с клетками других субпопуляций. Эта компартиментализация, по-видимому, играет важнейшую роль в эмбриональном развитии [388], поскольку границы таких компартиментов у ранних зародышей совпадают с границами районов на картах судьбы клеток в развитии [47, 642]. Зависимость образования щелевых контактов от присутствия MMA на поверхности клеток подтверждается результатами исследования взаимоотношения экспрессии N-CAM и функционирования щелевых контактов в нервной пластинке [323].

Отдельного комментария заслуживает "эпителиализация" клеток S-180, трансфицированных кДНК L-CAM. Авторы этой работы [423] настаивают на том, что описанная ими система представляет собой модель мезенхимально-эпителиального перехода, который является одним из ключевых и широко распространенных "элементарных" событий морфогенеза [626]. Тем не менее, пласт клеток, образующийся в описанных условиях, лишен некоторых важнейших свойств, присущих классическому эпителию: базально-апикальной полярности, десмосомальных контактных структур и связанных с ними промежуточных филаментов эпителиального типа - кератиновых филаментов [197, 428]. Это несоответствие можно интерпретировать по-разному. Можно допустить, что описанный феномен

эпителиоидного пласта, физической и фодр

В цитир наблюдение лиоидного и появляются ты. Хотя М тирующим на ассоциал состав спет типа [53, адгезионно на своей п да, к одно и A-CAM ( лярном сос известно н ультрастру между кле контактны ческому с содержит на себе п понентом молекулы взаимодей клеточного мена, чер ассоцииро положить,

по своим механизмам действительно имеет непосредственное отношение к образованию "эпителия" из "мезенхимы", но эпителиализация данной линии клеток не доходит до конца в использованных условиях культивирования. В естественных условиях раннего эмбриогенеза аналогичный процесс заканчивается образованием "истинного" эпителия. В пользу такой точки зрения косвенно свидетельствует ограничение экспрессии L-CAM только эпителиальными тканями [167]. Альтернативная точка зрения может состоять в том, что образование "эпителиоидного" пласта не имеет прямого отношения к эпителиальной дифференцировке в узком смысле этого слова, а является более общим способом интеграции клеток в единый компартмент, интегрированный единой системой контактных структур шелевого адгезионного типа. В соответствии с этой точкой зрения, дальнейшая судьба такой обособленной группы клеток может быть различна, например, образование эпителия, мышцы или нервного ганглия.

Суммируя то, что известно о структуре и закономерностях экспрессии первичных ММА: L-CAM и других кадгеринов, а также N-CAM, и учитывая результаты экспериментального вмешательства в экспрессию этих молекул, можно прийти к следующим заключениям. Роль этих белков в морфогенезе состоит в физическом обособлении клеточных коллективов на ранних стадиях эмбриогенеза. Гомофильное связывание идентичных (или принадлежащих к одному типу) ММА на соседних клетках приводит к сегрегации локальной клеточной популяции от соседней субпопуляции, в свою очередь объединенной связыванием посредством другой ММА. Возникающая таким образом обособленность является прелюдией в расхождении судеб соседних субпопуляций. Связывание клеток друг с другом посредством первичных ММА индуцирует образование между ними контактных структур типа адгезионных и шелевых.

В результате члены субпопуляции, экспрессирующие на своей поверхности гомофильно взаимодействующие ММА, образуют единый и отграниченный компартмент по двум параметрам: существование между ними высокопроницаемых шелевых контактов и существование единой системы активного цитоскелета, непрерывность которой обеспечивается контактными структурами адгезионного типа.

Роль специфических нейральных ММА, таких как гликопротеин L-1 или фасцилин I *Drosophila*, по-видимому, состоит в объединении определенных аксонов в пучки и в выборе пути распространения аксонов. Об этом говорит, например, работа, в которой было показано, что антитела к гликопротеину L 1 (G4) [508], но не к N-кадгерину [417], подавляют фасцикуляцию аксонов в культуре. Наиболее интересным объектом для изучения роли нейральных ММА является *Drosophila*. Выше уже упоминался фасцилин I, гликопротеин, экспрессирующийся на поверхности некоторых фасцикулированных аксонов центральной нервной системы *Drosophila*. В гене фасцилина I идентифицированы мутации, приводящие к отсутствию выработки белка и показано, что эти мутации не сказываются каким-либо заметным образом на развитии нервной системы. Обнаружено, однако, сильное генетическое взаимодействие этих мутаций с геном *Abelson (abl)*. Ген *abl* дрозофилы кодирует цитоплазматическую тирозинкиназу, которая в эмбриогенезе экспрессируется исключительно в аксонах развивающейся центральной нервной системы. Как и мутанты по гену фасцилина I, *abl*-мутанты развиваются нормально. Однако при исследовании двойных мутантов: фасцилин I-*abl* были обнаружены сильные нарушения путей роста аксонов, особенно выраженные в комиссуриальном тракте, именно там, где при нормальном развитии наблюдается перекрывание экспрессии обоих белков. Авторы наблюдали очевидные ошибки в выборе путей вращающихся ростовых конусов аксонов [178].

Результаты этих опытов, по-видимому, говорят о вырожденности функции фасцилина I в адгезии нервных клеток. Другими словам при отсутствии фасцилина I его роль в адгезии и выборе пути роста аксона берет на себя какая-то другая система, компонентом которой является тирозинкиназа, кодируемая геном *abl*. Вырожденность систем адгезии нервных клеток позвоночных была показана и в опытах, в которых для подавления функционирования индивидуальных ММА использовали специфические антитела. Было показано, что и в этих случаях значительные функциональные нарушения происходят только при "выключении" более чем одной системы адгезии [46, 89, 445, 635].

Возможно, что альтернативной системой, берущей на себя роль фасцилина I в детерминации пути роста аксонов, является система, включающая в себя взаимодействие интегрино-

вых рецепторов с молекулами внеклеточного матрикса. Это предположение кажется вероятным потому, что для таких систем показана ассоциация с клеточными тирозинкиназами [184, 254, 370].

Несмотря на то, что у мутантов только по гену фасцилина I не было обнаружено морфологических изменений в развивающемся мозге, тонкие функциональные дефекты обнаружить все-таки удалось. Мухи, гомозиготные по фасцилин I нуль мутациям, проявляют пониженную координацию движений [178]. Такая дискоординация дает возможность предположить, что следствием утраты функции фасцилина I оказываются избирательные дефекты в пути следования небольшого числа аксонов, возможно, тех немногих, в которых не экспрессированы компоненты альтернативной системы, компенсирующей отсутствие функции гена фасцилина I при выборе правильного пути роста аксонов.

## 2.2. Молекулы внеклеточного матрикса и клеточные молекулы адгезии к субстрату

Роль внеклеточного вещества в образовании и поддержании формы организмов очевидна даже при поверхностном взгляде. Банальными примерами могут служить кости, хрящи, плотная и рыхлая соединительная ткани, состоящие в основном из внеклеточного вещества и определяющие форму тела и практически всех органов. От взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом зависят и более тонкие морфогенетические процессы, такие, как направления миграции клеток [628], образование таких упорядоченных структур как капилляры [238], базо-апикальная поляризация эпителия [265] и т.п. Участие внеклеточного матрикса в этих процессах было осознано уже много лет назад, однако молекулярные механизмы взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом только начинают вырисовываться.

### 2.2.1. Внеклеточный матрикс (ВКМ)

Не считая высокомолекулярного внеклеточного матрикса кости и хряща, можно выделить два типа внеклеточного матрикса (ВКМ), отличающихся как по биохимическому составу, так и надмолекулярной организацией: интерстициальный ВКМ и ВКМ базальных мембран. Интерстициальный ВКМ составляет структурную основу соединительной ткани и представ-

ляет собой более или менее упорядоченную сеть волокон. Базальные мембраны выглядят как ультраструктурно упорядоченные слои, подстилающие или окружающие эпителий, мышцы, жировые и нервные клетки.

#### 2.2.1.1. Интерстициальный внеклеточный матрикс

Мажорными компонентами любого ВКМ, в основном определяющим его геометрию на надмолекулярном уровне, являются коллагены.

##### 2.2.1.1.1. Коллагены

Биохимии и молекулярной биологии коллагенов посвящена огромная литература, которая недавно была подробно проанализирована [78, 419]. Здесь я остановлюсь только на узловых сведениях из этой области и тех новых данных, которые касаются фибриллогенеза. Взаимодействие клеток с коллагенами в процессах морфогенеза описано в другом разделе.

Поперечно-исчерченные коллагеновые фибриллы могут иметь различный диаметр, длину и взаимное расположение, например, быть ориентированными. Вариации этих параметров влияют на механические свойства интерстициального ВКМ и, соответственно, на формообразовательные процессы. Основу поперечно-исчерченных коллагеновых фибрилл интерстициального матрикса составляют коллагены I и III типов [351]. В последнее время появились данные, заставляющие думать, что большинство, если не все исчерченные фибриллы, построены из двух или более типов коллагена. Так, исчерченные фибриллы роговицы являются кополимерами типов I и V [45]. Фибриллы кожи содержат как I, так и III тип коллагена, а возможно, и V тип [78]. Коллагеновые фибриллы сухожилий, которые считали примером системы фибрилл, содержащих только один тип коллагена, оказались состоящими из I, III и, вероятно, XII типа коллагенов [608].

Все коллагены, образующие исчерченные фибриллы, должны обладать критическими характеристиками, позволяющими образование таких фибрилл: длина их трехспиральных доменов должна составлять около 295 нм, а элементы, обуславливающие линейное распределение зарядов, должны подчиняться одному и тому же закону. Этим критериям отвечают интерстициальные коллагены типов I, III, V и XI [78] и, следовательно, каждый из них в отдельности мог бы образовывать исчерченные

фибриллы. Биологический смысл "смешанного" фибриллообразования, как полагают, состоит в том, что, варьируя соотношения индивидуальных коллагенов, клетки могут контролировать такие параметры фибриллогенеза, как число сайтов инициации, скорость удлинения фибриллы относительно приращения ее диаметра, конечный диаметр и, возможно, даже ориентацию фибрилл [78]. С этой концепцией согласуются данные об изменениях соотношений коллагенов I, II и V типов в зависимости от ткани и интервала развития. Другой способ регуляции фибриллообразования состоит в создании специальных внеклеточных компартментов [668]. Показано, что процесс фибриллогенеза, опосредуемый фибробластами сухожилий цыплят, протекает в специальных глубоких и узких карманах, образуемых плазматической мембраной и сообщающихся с внеклеточным пространством. При этом образование фибрилл происходит в наиболее узких и удаленных от внеклеточного пространства компартментах, объединение этих фибрилл в пучки — в более периферически расположенных отделах, а макроагрегаты коллагена образуются уже в широких отделах, непосредственно соединенных с внеклеточным пространством. Такая пространственная организация фибриллогенеза позволяет создавать определенные локальные концентрации модифицирующих коллаген ферментов и контролировать ориентацию фибрилл [668].

В соединительной ткани присутствует также коллаген типа VI, не входящий в состав исчерченных фибрилл [632]. Коллаген VI образует самостоятельную тонкую сеть с периодичностью 100 нм [75]. Ультраструктурные параметры этой сети могут быть обеспечены ассоциацией тетрамеров коллагена VI конец в конец [179].

Сеть коллагена VI обнаруживают как на поверхности клеток, так и вокруг и между исчерченными коллагеновыми фибриллами, как *in vitro*, так и *in vivo* [74, 75, 324, 639]. Эти фибриллы присутствуют как в тканях эмбриона [75], так и в тканях взрослых организмов [324]. В дерме сеть коллагена VI сильно сконцентрирована вокруг базальных мембран эндотелия, нервов и жировых клеток, отделяя эти структуры от исчерченных коллагеновых волокон [78]. Хотя электронно-микроскопически не обнаруживаются соединения между сетью коллагена VI и базальной мембраной, эластическими волокнами или сетью исчерченных филаментов, биохимические данные говорят о том, что такие соединения существуют [126].

Коллаген типа VI по своей структуре и биосинтезу резко отличается от других коллагенов [424]. Мономеры коллагена VI представляют собой 3 генетически различные молекулы, причем мол. масса  $\alpha 3$ -субъединицы — 260 кД, почти вдвое превышает мол. массу двух других: 150 ( $\alpha 1$ ) и 140 ( $\alpha 2$ ) кД [121, 122]. Аминокислотная последовательность  $\alpha 3$ -цепи показывает, что только 336 остатков из, по крайней мере, 2648, составляют домен, имеющий собственно "коллагеновую" конформацию [55]. Этот коллагеновый домен фланкирован с N-конца девятью повторами по 200 остатков в длину, последовательность остатков в которых высокомолекулярная коллаген-связывающим повтором А-типа в гликопротеине, называемом фактором Виллебранда [473]. На С-конце  $\alpha 3$ -цепи находится еще два таких повтора [55]. Повторы А-типа обнаружены также в "неколлагеновых" доменах  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -цепей коллагена VI [54, 108, 343]. Рекомбинантная  $\alpha 3$ -цепь связывается с иммобилизованным коллагеном I типа, причем это связывание обладает специфичностью и имеет насыщение. Таким образом, А-повторы, по крайней мере, в  $\alpha 3$ -цепи функционально активны. В расчете на все 3 цепи коллагена VI молекула содержит 17 повторов А-типа, которые при совместном функционировании могут сильно увеличивать аффинность коллагена VI к коллагену I. Возможно, что сродство коллагена VI к коллагену I локально регулируется количеством содержащихся в молекуле А-повторов. Об этом говорит тот факт, что  $\alpha 3$ -цепь, экстрагированная из тканей, представлена большой серией молекул, отличающихся друг от друга по мол. массе на величину А-повтора [121]. По-видимому, эта микрорегетерогенность обусловлена альтернативным сплайсингом экзонов, кодирующих повторы А-типа [55]. Локальные вариации в степени связи сети коллагена VI с фибриллами коллагена I могут быть основой тонких модулирующих пластичности соединительной ткани. В связи с этим уместно вспомнить, что в культурах фибробластов от больных с синдромом Cutix laxa, характеризующихся утратой эластичности кожи, обнаружено усиление синтеза и секреции коллагена VI [126], что говорит об определенном вкладе этого компонента в механические свойства дермы.

Другая важнейшая особенность структуры коллагена VI состоит в присутствии трех последовательностей Arg-Гли-Asp в каждом из "коллагеновых" доменов  $\alpha 3$ -субъединицы [55]. Важно, что эти последовательности, известные как сайты связывания с интегринами в молекуле  $\alpha 3$  (VI) функционально

активны. Это было показано в опытах, в которых рекомбинантная  $\alpha 3$ -цепь обеспечивала адгезию клеток к субстрату, причем пептид Арг-Гли-Асп-Сер подавлял эту адгезию [55]. Нативный коллаген VI также способен вызывать прикрепление и распластывание клеток, причем эти процессы только частично зависят от последовательности Арг-Гли-Асп [16, 645]. Таким образом, в функции

Последовательность Арг-Гли-Асп-Сер (RGDS), расположенная в домене "связывания с клеткой", взаимодействует с большинством культивируемых клеток через интегриновый рецептор  $\alpha 5\beta 1$  [76, 294, 533]. Позднее был описан другой участок молекулы фибронектина, действующий синергично с RGDS и расположенный на 20 кД ближе к N-концу молекулы, но в пределах домена

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

...

V25 участок ШСS –сегмента, а еще более конкретно, его С–концевую последовательность GREILDVPST [247]. Вторым участком вариаций является один из экзонов, кодирующий повтор III типа (ED-A), который в результате сплайсинга может быть полностью пропущен в зрелой мРНК. Альтернативный сплайсинг по домену ED-A тканеспецифичен. ED-A кодирующая последовательность отсутствует в мРНК фибронектина, вырабатываемой клетками печени [123], а сам ED-A–домен исключен из фибронектина плазмы крови [479], основным источником которого является печень [613]. Иммуноморфологическим методом показано, что в организме взрослого человека ED-A-содержащие фибронектины имеют весьма избирательную локализацию, по сравнению с теми молекулами, которые не содержат этого домена. В тканях плодов спектр тканей, содержащих ED-A фибронектины гораздо шире, хотя и весьма специфичен [228б, 228в].

Как было показано с помощью соответствующих моноклональных антител, среди фибронектинов, продуцируемых SV-40 трансформированными клетками в культуральную среду, значительно выше содержание молекул, содержащих домены ШСS и ED-A, чем среди фибронектинов, вырабатываемых культивируемыми нормальными фибробластами человека [59, 88].

Третий участок альтернативного сплайсинга – домен ED-B, повтор III типа, кодируемый одним экзоном – может быть либо целиком опущен, либо включен в молекулу фибронектина [251, 566, 680]. У домена ED-B есть две интересные особенности. Во-первых, этот домен является самым консервативным участком молекулы фибронектина: гомология между человеком и крысой составляет 100%, а между человеком и курицей – 96% [450]. При использовании моноклональных антител, специфически узнающих ED-B домен, было показано, что в организме взрослого человека фибронектины, содержащие этот домен, удается обнаружить только в синовиальной выстилке вокруг некоторых сосудов и в интерстиции яичников, а также в миометрии [83]. Напротив, у плодов человека в возрасте 8–10 недель ED-B форма фибронектина была выявлена в интерстициальном матриксе коры головного мозга, желудка, тимуса, легких и кишечника [83]. В этой работе обнаружено, что ED-B домен присутствует в строме 62 из 165 опухолей различного гистогенеза, причем все 13 исследованных менингиом содержали этот эпитоп [83]. ED-B-фибронектин не был обнаружен в этой работе ни в од-

ном из случаев доброкачественных опухолей, участках хронического воспаления или рубцовых изменений соединительной ткани. Какие клетки в составе опухолевой ткани вырабатывают ED-B-изоформы фибронектина, достоверно неизвестно. Наиболее вероятно, что такими продуцентами являются мезенхимальные клетки стромы, стимулированные к выработке ED-B-фибронектина факторами роста, которые секретируют собственно опухолевые клетки. Молекулярные механизмы, регулирующие тканеспецифический сплайсинг ED-B–домена, однако, неизвестны. Ничего нельзя сказать ни о функциональной роли этого домена, ни о том, каков биологический смысл его тканеспецифической экспрессии.

Описаны моноклональные антитела, которые, по-видимому, различают специфические варианты гликозилирования фибронектина в эмбриональных тканях [416, 417].

Фибронектины, помимо млекопитающих и птиц, обнаружены у амфибий и рыб [4], а также у беспозвоночных: морского ежа [309] и дрозофилы [239]. Фибронектин дрозофилы имеет мол. массу субъединиц около 230 кД, связывается с желатиной и реагирует с антителами к фибронектину позвоночных. Количество фибронектина резко возрастает в момент гастрюляции зародышей мух и достигает постоянного уровня в межклеточном пространстве к периоду завершения органогенеза. Инъекция антител к фибронектину вызывает блок гастрюляции [239], тот же результат, что и инокуляция пептида Арг–Гли–Асп [441]. У дрозофилы идентифицирован также интегринный рецептор фибронектина [378], что говорит о том, что членистоногие используют, в принципе, те же молекулы для адгезии клеток к внеклеточному матриксу, что и позвоночные.

**Тенасцин.** Как и фибронектин, тенасцин является высокомолекулярным и полиморфным гликопротеином. Наиболее часто встречающаяся форма тенасцина у кур представляет собой гексамер с мол. массой более 1000 кД, субъединицы которого представлены полипептидами в 230, 200 и 190 кД и связаны между собой дисульфидными связями [589]. Тенасцин был практически одновременно описан в разных лабораториях и получил несколько имен: мышечно–сухожильный антиген [102], антиген глиомо–мезенхимального внеклеточного матрикса человека (GMEMm)(62) гексабрахион (182), антиген JI [347] и цитотактин [245]. Все 3 субъединицы тенасцина близкородственны, так как их одномерные пептидные карты практически совпадают [103], и все до сих пор описанные моноклональные антитела распознают все 3 полипептида [105,

485]. Относительное содержание этих 3 субъединиц варьирует в зависимости от ткани, типа культивированных клеток и условий их культивирования. Так фибробласты кожи куриных эмбрионов вырабатывают все 3 типа субъединиц, в то время как миоциты продуцируют в основном низкомолекулярную форму [103]. При эмбриональном развитии кишки мыши обнаружен сдвиг от полипептида с мол. массой 210 кД к полипептиду с мол. массой 260 кД [12]. Обнаружено, что первичный транскрипт с единственного гена тенасцина у кур и человека подвергается альтернативному сплайсингу [250, 314, 315], что объясняет описанную выше гетерогенность.

Под электронным микроскопом тенасцин выглядит "шестирукой" молекулой – гексабрахионом [182]. Структурные и биохимические данные говорят о том, что такая форма создается за счет ковалентного связывания двух триплетов с центральной глобулой. Иногда на электроннограммах видны трехрукие половинки молекулы [639d]. Каждые три "руки" тенасцина отходят от двух коротких стержней, расходящихся в противоположные стороны от центральной глобулы. Проксимальная треть каждой руки выглядит тоньше, чем ее дистальная часть и каждая рука заканчивается глобулярным доменом [639d].

Полная аминокислотная последовательность тенасцина кур содержит ведущий пептид (аминокислоты 1–22) и пролепид (остатки 23–33). Последовательность, начинающаяся с "зрелого" N-конца – глутаминовой кислоты в 34 положении и до 118 остатка, входит в состав центрального домена вместе с аналогичными последовательностями других субъединиц. Остатки со 119 по 147 образуют  $\alpha$ -спираль, которая закручивается в тройную спираль при участии двух других субъединиц триплета и стабилизируется межцепочечными дисульфидными связями. Далее с 176 по 590 остатки идут 13 с половиной цистеин-богатых повтора, подобных таковым в эпидермальном факторе роста (ЭФР-подобные повторы), которые составляют тонкую часть "руки" тенасцина, затем следуют 11 сегментов, сильно напоминающих друг друга, и фибронектиновые повторы III типа. На C-конце обнаружена 81-членная последовательность, сходная с фрагментом  $\beta$ - и  $\gamma$ -цепей фибриногена, которая образует глобулярный домен. Один из фибронектиновых повторов III типа содержит единственную последовательность RRGDME. Изоформа с мол. массой в 200 кД отличается от изоформы с

мол. массой 230 кД отсутствием 6-го и 7-го повторов III типа, а в изоформе с мол. массой 190 кД, кроме того, отсутствует и 8-й повтор. В молекуле имеется 17 потенциальных сайтов N-гликозилирования, 6 из которых расположены в 6-м и 7-м сплайсируемых повторах III типа. [314, 485, 589].

Тенасцин (цитотактин), экстрагированный из мозга куриных эмбрионов, отличается от тенасцина других тканей присутствием углеводного эпитома HNK-1. Кроме того, в мозге обнаружена форма тенасцина с мол. массой 250 кД, содержащая хондроитин-сульфат [273]. "Руки" тенасцина человека и крысы длиннее, чем у тенасцина кур, что соответственно отражается на мол. массе наибольшей субъединицы: для человека она составляет 320 кД, а для крысы – 280 кД [181]. Лигандами тенасцина во внеклеточном матриксе мозга является специфический хондроитинсульфатпротеогликан-несущий углеводный эпитоп HNK-1. Мол. масса белковой части этого протеогликана составляет 280 кД [275]. На поверхности мезенхимальных клеток идентифицирован тенасцин-связывающий протеогликан – синдикан [639a]. Вопреки сообщению о связывании тенасцина с фибронектином в ELISA-тесте [105], *in situ* эти 2 гликопротеина, скорее всего, не связываются друг с другом.

Закономерности экспрессии тенасцина крайне необычны. С одной стороны, его экспрессия во многих эмбриональных тканях весьма лабильна и подчиняется строгим ограничениям во времени и пространстве. С другой стороны, во взрослом организме тенасцин постоянно присутствует в таких стабильных образованиях, как сухожилия и надкостница [181].

Наиболее полное исследование распределения тенасцина (цитотактина) выполнено на зародышах кур [130]. Тенасцин впервые появляется во время гастрюляции. В районе мигрирующих клеток первичной полоски окрашивание антителами к тенасцину выглядит пунктирным, тогда как в той области, где гастрюляция уже завершена, антитела непрерывно окрашивают базальную мембрану, разделяющую хордо-мезодерму (будущую хорду) от эпителия будущей нейральной пластинки.

При дальнейшем развитии тенасцин обнаруживается вокруг нервной трубки и хорды, при этом он отчетливо выявляется в базальной мембране этих образований в переднем конце тела и в туловище, но полностью отсутствует в заднем конце тела, даже в тех районах, где хорда уже полностью сформирована, и окрашивание на фибронектин очерчивает как нервную



трубку, так и хорду [130]. По дорзо-вентральной оси нервной трубки тенасцин также распределен градиентно [68]. Сходная картина наблюдается в сомитах. Тенасцин окружает только уже полностью сформированные сомиты передней и средней части тела, тогда как фибронектин очерчивает и более каудально расположенные сомиты, находящиеся в стадии формирования. В тех сомитах, которые окружены тенасцином, окраска каудальной границы сомита много интенсивнее, чем роstralной. При реорганизации сомитов на склеротом и миотом тенасцин начинает экспрессироваться в роstralной части склеротома. Вскоре после этого именно в экспрессирующую тенасцин часть склеротома, а не в более каудальную его часть, мигрируют клетки нервного гребня [614].

Индукция экспрессии тенасцина в роstralной порции склеротома происходит несколько раньше, чем туда мигрируют клетки нервного гребня и независимо от их миграций. У зародышей, экспериментально лишенных клеток нервного гребня, сохраняется та же самая последовательность экспрессии тенасцина при образовании склеротома [614]. На этой, как, впрочем, и на последующих стадиях, зоны экспрессии тенасцина гораздо уже и специфичнее, чем районы экспрессии фибронектина.

Иммунорфологическое изучение экспрессии тенасцина на более ранних стадиях миграции клеток нервного гребня так же создает впечатление, что тенасцин участвует в контроле этого процесса. По данным M. Grouper-Fraser, (1988), на протяжении процесса миграции тенасцин колокализуется с клетками нервного гребня куриных эмбрионов, которые, по видимому, содержат его на своей поверхности. Аналогичные результаты получены и при исследовании миграции клеток нервного гребня у куропаток, крысы и амфибий [180, 402]. Введение антител к тенасцину латеральнее нервной трубки на уровне будущего среднего мозга приводит к эктопической агрегации клеток нервного гребня [68].

Очень динамична экспрессия тенасцина в развивающемся мозге. Тенасцин вырабатывается глиальными клетками и не синтезируется нейронами [245]. Особенно интенсивная экспрессия обнаруживается во внешнем зернистом и молекулярном слоях мозжечка и вдоль радиальных волокон бергмановской глии [130]. С созреванием мозга количество тенасцина снижается. Так этот гликопротеин транзиторно появляется в соматосенсорной коре мышей через 24-48 часов после

рождения, в то время, когда происходит иннервация сенсорных нейронов от вибрисс. Тенасцин появляется на границе будущих сенсорных полей на поверхности клеток глии и нейронов, а также на глиальных отростках, контактирующих с сосудами. После короткого периода экспрессии тенасцин быстро исчезает [595]. Это наблюдение представляет собой великолепный пример молекулярной детерминации определенных морфофункциональных зон.

В периферической нервной системе тенасцин идентифицирован в периневрии развивающихся нервов и вблизи узелка Ранвье [129, 189, 513], в формирующихся ганглиях задних корешков [129]. Изучение локализации тенасцина в развивающейся сетчатке показало, что его экспрессия на поверхности глиальных клеток коррелирует с районами миграции нервных клеток. После дифференцировки глаза из глазной чашки у зародышей кур антитела к тенасцину интенсивно окрашивают базальную мембрану, окружающую как хрусталик, так и главную чашу (будущая сетчатка). На 4-е сутки развития небольшое его количество можно обнаружить на слое волокон, где аксоны растут в направлении зрительного нерва. Когда начинается миграция нейритов в сетчатку, образующих ее сложную ламинарную структуру, здесь тоже становится заметным слабый радиальный рисунок при окрашивании на тенасцин. На 12-е сутки, когда миграция через внутренний слой останавливается, исчезает и радиальное окрашивание на тенасцин [130]. Роль тенасцина в миграции нейритов подтверждается опытами, в которых было показано, что антитела к этому гликопротеиду блокируют миграцию при инкубации с ними срезов мозга [109].

Тенасцин экспрессируется в эмбриональных и взрослых мышцах кур [130]. Из восьми изученных в работе [405] молекул внеклеточного матрикса (коллагены I, IV, V, VI, ламинин, гепарансульфат, фибронектин, тенасцин) тенасцин имел наиболее ограниченную локализацию в мышечных волокнах цыплят: он был обнаружен только в оболочках сосудов и нервов, ассоциированных с внешней капсулой волокон. В мышцах взрослых крыс тенасцин не обнаруживается, однако может быть индуцирован денервацией [541], причем тенасцин в этом случае появляется во внеклеточном матриксе, окружающем двигательную концевую пластинку [541]. Тенасцин индуцируется и в тех случаях, когда денервация выполнена не механическими вмешательствами, а специфическим химическим воздействием — локальным применением тетрадокина. При реиннервации тенасцин исчезает. Источником тенасцина, накапли-

вающегося вокруг синапса денервированной мышцы, являются избирательно пролиферирующие в этом месте фибробласты [213].

Местами наиболее обильной экспрессии тенасцина являются участки образующегося хряща. Этот гликопротеин присутствует в районе конденсирующейся мезехимы зачатка хряща у мышей, отличая ее от окружающей нехондрогенной мезенхимы. В полностью дифференцированном хряще тенасцин обнаруживается только в перихондрии, который остается источником дифференцировки в хондробласты при регенерации [401]. В костях, образующихся за счет эндохондриальной оссификации, тенасцин появляется вновь вокруг остеогенных клеток, инвазирующих хрящ. Тенасцин присутствует также в конденсирующейся мезенхиме зачатков тех костей, которые образуются независимо от хряща, а позднее присутствует вокруг спикул развивающихся костей этого типа [624]. В зрелом костном матриксе тенасцин отсутствует и может быть обнаружен только в периостии и эндоостии [401]. Тенасцин, вероятно, играет активную роль в хондрогенезе, так как в культурах клеток зачатков крыльев кур, растущих на субстрате, покрытом тенасцином, образуется много больше очагов хондрогенеза, чем в контроле [401].

Сходная картина экспрессии тенасцина наблюдается в процессе развития зубов. Этот белок вырабатывается клетками зубных сосочков в раннем периоде, но после их дифференцировки в одонтобласты, продуцирующие дентин, тенасцин отсюда исчезает, сохраняясь только в зубной пульпе, которая обладает потенциалом к образованию твердой ткани [625].

Интенсивные отложения тенасцина происходят в зонах образования плотной соединительной ткани, сухожилий и связок. Причем в районе соединения сухожилий с мышцами тенасцин сохраняется и во взрослом организме [103]. Локальные и упорядоченные отложения тенасцина обнаружены при образовании сосочков склеры у куриных эмбрионов [209].

Тенасцин обнаружен в некоторых строго ограниченных участках эмбриональной мезенхимы, часто в связи с почкующимся эктодермальным эпителием. Так, локальную экспрессию тенасцина наблюдали вокруг зачатков молочной железы вибрисс [107]. При изучении развития молочных желез мышей было обнаружено, что экспрессия тенасцина в строме, помимо первичных почек, тяготеет только к точкам ветвления молочного дерева [295a], то есть белок не накаплива-

ется вдоль удлиняющихся неветвящихся протоков. В этой же работе было показано, что эмбриональные клетки эпителия молочной железы, эксплантированные на культуру эмбриональной стромы молочной железы, индуцируют в последней выработку тенасцина. Индуцировать тенасцин в строме оказались способными и клетки опухолей молочной железы [295a]. При развитии эпителия почек мышей тенасцин не обнаруживается в нефрогенной мезехиме до тех пор, пока из нее не конденсируются зачатки метанефрических канальцев. На самых ранних стадиях эпителизации тенасцин уже окружает так называемые S-образные тельца, но только с того момента, когда в них появляются признаки "истинного" эпителия — кератиновые филаменты [12]. Тот же процесс можно наблюдать в органной культуре. При этом блокирование индукции канальцеобразования предотвращает экспрессию тенасцина в строме [12], что подтверждает роль индуктивного влияния эпителия на экспрессию тенасцина в мезенхиме. Во время постнатального развития содержание тенасцина в почках падает. Во взрослых почках мышей тенасцин не выявляется в кортикальной зоне, хотя в мозговой части можно выявить слабое окрашивание стромы [12].

Асимметричное отложение тенасцина в строме обнаружено при развитии уrogenитального синуса и его производных у мышей [611]. У самцов тенасцин локализовался только в вогнутой вентральной части уrogenитального синуса в месте впадения в него половых протоков. У самок массивные отложения тенасцина наблюдали лишь вокруг образующейся матки [611].

Интересные результаты получены при изучении индукции экспрессии тенасцина в развитии амфибий [518]. Эктодерма, изолированная на стадии ранней гаструлы, развивается в эпидермальные пузырьки, лишенные тенасцина. Если же эктодерму индуцировать к развитию в нервную трубку, либо с помощью ее физической ассоциации с губой бластопора, либо, искусственно, обработкой конканавалином А, то мезенхима, окружающая образовавшуюся нервную трубку, обнаруживает присутствие больших количеств тенасцина [518].

Активация экспрессии тенасцина обнаружена в процессе заживления ран. Во взрослой покоящейся коже крыс и человека тенасцин выявляется в небольшом количестве в районе дермо-эпидермального соединения и отсутствует в более глубоких слоях дермы [383, 400].

В ране наблюдали резкое усиление экспрессии тенасцина, особенно на границе раневой поверхности, причем отложения тенасцина спускались глубоко в дерму [403]. Интенсивную ок-

раску на тенаascin наблюдали под кератиноцитами, мигрирующими на раневую поверхность. Тенаascin присутствовал во всем объеме грануляционной ткани, но не в рубце после натяжения и заживления раны. Распределение тенаасцина резко отличалось от распределения других гликопротеинов матрикса — фибронектина и ламинина. При этом тенаascin был первым белком, который появлялся в участках, подстилающих мигрирующий эпидермис [403]. Локальная и транзитная экспрессия тенаасцина обнаружена так же при регенерации рогаковицы [622].

Тенаascin реэкспрессируется в мезенхимных опухолях и строме карцином, включая глиомы, фибросаркомы, остеосаркомы, меланомы, опухоли Вильямса, карциномы молочной железы, легкого и плоскоклеточные карциномы [62, 107, 399, 422]. В глиомах, меланомах, карциномах тенаascin экспрессирован в 90–100% случаев, причем интенсивность экспрессии, как правило, возрастает с падением уровня дифференцировки и увеличением злокачественности опухоли [181]. Тем не менее, в опухолях некоторых локализаций (тимус, печень, яичники), а также в мезенхимных опухолях мягких тканей тенаascin экспрессирован менее чем в 10% случаев. Кроме того, этот гликопротеин обнаруживается не только в злокачественных, но и в доброкачественных опухолях, хотя его экспрессия в этом случае, как правило, менее интенсивна [442].

Морфологические исследования закономерностей экспрессии тенаасцина показывают, что локализация этого гликопротеина и временные интервалы его экспрессии регулируются много строже, чем для других известных компонентов интерстициального внеклеточного матрикса. Таким образом, возникает естественный вопрос о механизмах регуляции экспрессии тенаасцина.

Распределение тенаасцина на срезах тканей, а также опыты с культивируемыми клетками показывают, что этот гликопротеин синтезируется преимущественно, а может быть, и исключительно, глиальными клетками в нервной системе и мезенхимальными клетками в остальных тканях организма [101, 181, 540]. Многие из морфологических наблюдений, приведенных выше, а также опыты по рекомбинации стромы с эмбриональным и опухолевым эпителием [295a] говорят о том, что роль индуктора синтеза тенаасцина мезенхимной играет эпителий, который, правда, должен обладать для этого некими специфическими свойствами. Из существующих

наблюдений ясно, что состояние пролиферации само по себе недостаточно для того, чтобы эпителий был способен обеспечивать индукцию тенаасцина. Это очевидно хотя бы из того, что пролиферирующие и удлиняющиеся протоки молочной железы не индуцируют вокруг себя тенаасцина ни в эмбриональном периоде, ни при беременности [295a]. Тенаascin отсутствует вокруг огромного числа пролиферирующих и развивающихся эпителиальных структур зародыша [102, 130]. Далее, хотя экспрессия тенаасцина, как правило, падает или вовсе исчезает во взрослом организме, описана и противоположная ситуация: тенаascin появляется в дермо-эпидермальном соединении только у взрослых кур [130].

Индукторами тенаасцина могут быть факторы роста, секретруемые не всеми, а лишь некоторыми пролиферирующими эпителиями. К таким факторам относится  $\beta$ -ТФР. Показано, что  $\beta$ -ТФР вчетверо увеличивает синтез и секрецию тенаасцина культивируемыми фибробластами цыплят [485]. Культивирование эмбриональных куриных фибробластов в среде, кондиционированной клетками карциномы молочной железы линии MCF-7, приводит к накоплению мРНК тенаасцина в клетках и увеличению его секреции в 3 раза по сравнению с контролем. Вся индукционная активность кондиционированной среды принадлежит  $\beta$ -ТФР, так как ее удается полностью нейтрализовать соответствующими антителами [106]. Эти опыты, однако, не объясняют специфичности индукции именно тенаасцина в определенных локализациях *in vivo*, так как  $\beta$ -ТФР в той же степени индуцировал и синтез фибронектина. Эмбриональная сыворотка является более сильным индуктором тенаасцина, чем  $\beta$ -ТФР [106, 485], однако и этот агент вместе с тенаасцином индуцирует и фибронектин.

Уникальная локализация тенаасцина при морфообразовательных процессах теоретически могла бы быть объяснена его избирательным накоплением в местах локализации компонентов внеклеточного матрикса, специфически связывающих этот гликопротеин. Однако известные на сегодня лиганды тенаасцина, хондроитинсульфатпротеогликан нервной ткани и синдекан, не полностью сораспределяются с тенаасцином в тканях эмбрионов [273].

Таким образом, механизмы, обеспечивающие регуляцию локализации тенаасцина в развивающихся тканях, остаются неизвестными.

Характер распределения тенаасцина в тканях зародышей и взрослых организмов трудно совместить с какой-либо единой

функцией этого белка. Сегодня можно предположить, что тенаascin участвует, по крайней мере, в двух совершенно различных морфогенетических процессах. Один такой процесс — прикрепление и движение клеток, другой — создание поверхностей и трехмерных структур повышенной жесткости.

Тенаascin в меньшей степени способствует прикреплению и распластыванию клеток, чем фибронектин [105, 107, 393, 485]. К субстрату, покрытому тенаascinом, прикрепляется значительно меньше клеток, чем к фибронектиновому субстрату, а только что прикрепившиеся клетки легче оторвать от тенаascinового субстрата при центрифугировании [393]. После 15-минутной инкубации клеток, прикрепившихся к фибронектину при 37°C, сила, требующаяся для отрыва их от субстрата, возрастает не меньше, чем на порядок. Такая же инкубация клеток на тенаascinе вовсе не увеличивает прочности прикрепления к субстрату. Резкое увеличение прочности прикрепления к фибронектину после инкубации происходит за счет перестроек цитоскелета и организации фокальных контактов, что ведет к распластыванию клеток. Действительно, площадь клеток на фибронектине увеличивается за 15 мин приблизительно в 125 раз, в то время как на тенаascinе форма клеток остается практически без изменений [393].

Добавление тенаасцина в культуральную среду в момент инициации культуры на фибронектиновой подложке или приготовление подложки, покрытой смесью фибронектина и тенаасцина, подавляет как прикрепление, так и распластывание клеток [105, 252, 393, 614]. Варьируя соотношения фибронектина и тенаасцина, можно варьировать степень распластывания клеток на субстрате. Этот эффект обусловлен не "разбавлением" фибронектина, а "вмешательством" тенаасцина в действие фибронектина [105]. Тенаascin способен интерферировать с прикреплением клеток к GRGDS — пептиду, с еще большей интенсивностью, чем с прикреплением клеток к фибронектину [105]. По данным [105], ни RRDMS — пептид тенаасцина, ни GRGDS — пептид фибронектина не препятствуют адгезии клеток к тенаасцину, следовательно, интерференция не связана с конкуренцией RGD — последовательностей в тенаascinе и фибронектине за интегринавый клеточный рецептор, а обусловлена каким-то непрямым действием тенаасцина на этот рецептор. Этот вывод подтверждается результатами работы [589], в которой изучали, в частности, влияние рекомбинантных фрагментов субъединицы тенаасцина на прикрепление

клеток. Сравнивали поведение клеток на субстрате, часть которого была покрыта тестируемым белком, а другая бычьим сывороточным альбумином для контроля. Большинство клеток немедленно прикрепились к поверхности, покрытой фибронектином, и полностью распластывались в течение 90 минут. На интактном тенаascinе можно было обнаружить только небольшое количество клеток через 10 минут после их добавления. Через 90 минут можно было видеть, что немалая часть клеток оказывается прикрепленной к субстрату, покрытому альбумином, избегая тенаascinовый субстрат. На субстрате, покрытом коротким рекомбинантным фрагментом тенаасцина ( $\lambda_c T_n A1$ ), захватывающим только 104 аминокислотных остатка в пределах 10 и 11 повторов III типа, количество прикрепившихся клеток было не меньшим, чем на фибронектиновом субстрате. Эти клетки, однако, оставались практически не распластанными. Моноклональные антитела T<sub>n</sub>-68, подавляющие связывание клеток с тенаascinом, реагируют с фрагментом  $\chi_c T_n A1$ . Все другие фрагменты тенаасцина, не содержащие последовательности  $\chi_c T_n A1$ , способствовали прикреплению клеток не в большей степени, чем контрольный альбумин. Неожиданный результат был получен при использовании N-концевого фрагмента тенаасцина, содержащего цистеин-богатые повторы. Этот фрагмент оказывал такое же действие, как интактный тенаascin — при продолжительной инкубации клетки "предпочитали" прикрепляться к альбумину, но не к этому фрагменту [589]. Результаты этой работы картируют участок тенаасцина, ответственный за связывание с клеткой и позволяют предположить, что "антиадгезивный сигнал" локализован в районе цистеин-богатых повторов. Авторы, правда, не проверяли способен ли этот антиадгезивный сигнал интерферировать с прикреплением и распластыванием клеток на фибронектине. Важно, однако, что ни цистеин-богатые повторы, ни участок, обуславливающий адгезию клеток к тенаасцину, не содержат RGD-последовательности, что согласуется с точкой зрения о неконкурентной природе подавления связывания клеток с фибронектином под влиянием тенаасцина. Можно предположить, что на поверхности клеток существует специальный рецептор для антиадгезивного сигнала тенаасцина, взаимодействие с которым через какие-либо вторичные посредники блокирует функцию интегринавых рецепторов.

Антиадгезивные свойства обнаружены недавно у другого гликопротеина внеклеточного матрикса — тромбоспондина [354], который как и тенаascin, имеет в своей молекуле цистеин-богатые повторы [361].

Существование специфических антиадгезивных молекулярных сигналов – это новый аспект в представлениях о механизмах взаимодействия клеток с подложкой.

Нельзя не упомянуть о том, что другие авторы, использовавшие тенасцин из нервной ткани и других линий клеток, сообщают об участии RGD-элемента тенасцина в связывании этого белка с клеточной поверхностью [61, 204]. Причина расхождения данных [105, 589] и [61, 204] пока не установлена. Возможно, что на результаты некоторых опытов могут влиять незначительные загрязнения препаратов тенасцина фибронектином. Однако результаты работы [61] не позволяют сомневаться в том, что клетки глиомы способны связываться с RGD-последовательностью в тенасцине посредством рецептора семейства интегринов.  $\beta$ -цепь этого рецептора и  $\beta$ -цепь рецептора фибронектина, скорее всего, идентичны, тогда как  $\alpha$ -цепи различаются [61].

Все исследователи сходятся на том, что последствия связывания клетки с тенасцином резко отличаются от эффекта связывания с подложкой из фибронектина: распластывание на тенасцине минимально или даже отсутствует. Пока неизвестно, индуцирует ли связывание клетки с тем или иным сайтом молекулы тенасцина на субстрате перестройку цитоскелета, необходимую хотя бы для минимального распластывания и передвижения или же тенасцин только препятствует этим процессам. В связи с этим интересны опыты, в которых показано, что субстрат, покрытый чистым тенасцином, обеспечивает более высокую скорость миграции клеток нервного гребня, по сравнению с субстратами из фибронектина или из естественной базальной мембраны сетчатки эмбрионов [252]. Миграция невозможна без образования псевдоподий и соответствующей организации актинового цитоскелета. Таким образом, приходится думать, что тенасцин на субстрате способен к индукции динамичных изменений актинового цитоскелета, которые выражаются в миграции с высокой скоростью. Интересно, что растворимый тенасцин, добавленный в культуральную среду к клеткам нервного гребня или меланомы, наоборот, снижал скорости их миграции по фибронектину или базальной мембране и уменьшал их распластывание [252]. Авторы объясняют эти результаты тем, что тенасцин, добавленный в среду, не связывается с подложкой, но взаимодействует только со свободной поверхностью клеток. Кажется, однако, что однозначная интерпретация этих

опытов пока невозможна. Тем не менее, они показывают, что тенасцин сам по себе и во взаимодействии с другими молекулами внеклеточного матрикса может регулировать форму клеток, степень их распластности на субстрате и характер их передвижения. Избирательная локализация тенасцина в морфогенетически активных районах при эмбриогенезе, регенерации и опухолевом росте хорошо согласуется с этими фактами.

Как уже было отмечено, функции тенасцина трудно ограничить только его ролью в регуляции поведения клеток.

Обильные отложения тенасцина часто можно видеть в различных вариантах соединительной ткани, содержащих совсем незначительное число клеток. Таким образом, подавляющее большинство молекул тенасцина находится вдалеке от клеточных мембран. Это очевидно для таких структур, как связи, сухожилия, нахрящница и другие типы плотной соединительной ткани. Однако и в рыхлой соединительной ткани тенасцин не контактирует с клетками, что иллюстрируется работой [383]. Иммуноэлектронно-микроскопическое изучение распределения тенасцина в дерме показало, что молекулы этого белка, собранные в аморфные агрегаты, равномерно распределены между коллагеновыми фибриллами. В базальной мембране тенасцин не был обнаружен. Не выявлено также ассоциации тенасцина ни с какими-либо клеточными структурами, ни с коллагеновыми или эластиновыми фибриллами. Хотя в эмбриональной и опухолевой ткани тенасцин на уровне световой микроскопии кажется ассоциированным с базальной мембраной и, возможно, имеет контакт с клетками, для подтверждения этого требуются ультраструктурные исследования, которые до сих пор не проведены.

Следует предположить, что в различных тканях тенасцин выполняет совершенно различные функции. Например, в мозге – функцию управления перемещения клеток и их отростков, а в соединительной ткани – функцию локального изменения структуры внеклеточного матрикса. Каковы молекулярные механизмы, обеспечивающие гипотетическую структурную роль тенасцина – неизвестно.

### 2.2.1.1.3. Протеогликаны

К протеогликанам относят белки, несущие ковалентно присоединенные к ним сульфатированные углеводные компоненты – гликозаминогликаны. Хотя структура белковой части молекул протеогликанов весьма разнообразна, гликозаминогликановый компонент придает им сходные свойства: они охотно связыва-

ются с другими макромолекулами посредством электростатических взаимодействий и имеют большой гидродинамический объем [531]. Протеогликианы – это многочисленное семейство, причем, вероятно, далеко не все его члены известны, и лишь немногие хорошо охарактеризованы.

Некоторые, обычно низкомолекулярные, протеогликианы содержатся в секреторных гранулах специализированных клеток, например, лейкоцитах, и высвобождаются при соответствующей стимуляции [597]. Секретируемые протеогликианы лимфоцитов, вероятно, являются молекулами-переносчиками протеаз [571].

Другая группа протеогликанов, ассоциированных с поверхностью клеток, имеет структурные особенности, позволяющие им закориваться в мембране. Так, белковая часть гепарин (хондроитин)-сульфатпротеогликана эпителиальных клеток молочной железы [507] и сходных с ним протеогликанов других эпителиальных клеток и фибробластов [138, 307, 392] содержит трансмембранный домен. Один из гепарансульфатпротеогликанов гепатоцитов закорен в мембране через фосфоинозитол [306]. Описаны поверхностные протеогликианы экспрессирующиеся только на очень ограниченных популяциях клеток. Так известен хондроитинсульфатпротеогликан, специфичный для клеток меланомы [77] и другой – для нейронов и глиальных клеток [590].

Протеогликианы внеклеточного матрикса представляют собой весьма гетерогенную группу. Обычно хондроитин-(дерматансульфат)-протеогликианы входят в состав интерстициального матрикса, а гепарансульфатпротеогликианы – в состав базальных мембран [530].

Для выработки окончательной классификации протеогликанов требуется информация о первичной структуре их белковой части, которая известна лишь для немногих из них. Наиболее хорошо изученными протеогликианами интерстициального матрикса являются хондроитинсульфатпротеогликианы хряща [151, 572], хондроитинсульфатпротеогликан фибробластов – версикан [348, 682], а также низкомолекулярный протеогликан фибробластов – декорин [349, 558].

В полной аминокислотной последовательности версикана [682], на N-конце содержится последовательность, связывающая гиалуроновую кислоту, по существу идентичная последовательности глиального гиалуронат-связывающего белка [488]. В середине молекулы многочисленные места прикрепления гликозаминогликановых цепей. С-концевая часть мо-

лекулы содержит 2 цистеин-богатых ЭФР-подобных повтора, лектин-подобную последовательность, способную связывать углеводы и домен, сходный с теми, что были обнаружены ранее в комплемент-регулирующем белковом факторе H [346], в белке, связывающем C4 [114] и в факторе В комплемента [427]. Считается, что последний, структурный элемент опосредует белок-белковые взаимодействия [434]. Интересно, что те же самые структурные мотивы, что и на С-конце версикана: ЭФР-подобные повторы, лектин-подобный домен и домен, подобный белкам-регуляторам системы комплемента, обнаружены, хотя и в другом порядке, в молекулах адгезии и хонинга лимфоцитов: ELAM-1 [42] и MEL-14 [359, 574].

Разнообразные функциональные домены, обнаруженные в молекуле версикана, позволяют предполагать, что этот протеогликан участвует во многих типах взаимодействий между клеткой и другими компонентами внеклеточного матрикса. Одной из таких реакций может быть создание "покрывала" из гиалуроновой кислоты вокруг клеточной мембраны [682]. Слой гиалуроновой кислоты, обнаруживаемый вокруг многих типов клеток, резко изменяет их адгезивные и локомоторные свойства [358].

Протеогликан, сходный с версиканом, PG-M, выделен из развивающихся почек конечностей дыплат [328]. Экспрессия PG-M строго коррелирует с конденсацией мезенхимы. Показано, также, что PG-M связывается с коллагеном I и с фибронектином [667]. Возможно, что версикан так же связывает эти лиганды.

Для аминокислотной последовательности декорина характерно многократное повторение 23-25-членного мотива, в котором остатки лейцина занимают определенные места: L-L-L-N-I/L-V [349]. Сходные мотивы обнаружены в гликопротеине тромбоцитов I b [391] и продукте гена Toll [260] – ключевом звене детерминации дорзо-вентральной полярности у дрозофилы. 24-членный повтор декорина, возможно, участвует в связывании его белковой части с коллагеном и фибронектином [380, 558].

Сайты связывания декорина на коллагене обладают специфичностью, поскольку этот протеогликан выявляется на коллагеновых фибриллах в виде полос, разделенных интервалом в 67 нм [349]. По крайней мере, еще один протеогликан, не идентичный декорину и содержащий кератансульфат, сходным образом связывается с фибриллами коллагена, так же образуя

полосы с 67 нм-периодичностью [567]. Молекулярная структура этого кератансульфатпротеогликана неизвестна.

Связывание протеогликанов с коллагенами регулирует толщину коллагеновых волокон матрикса. Показано, что в присутствии декорина образование фибрилл замедляется и образующиеся в конце процесса фибриллы оказываются тоньше, чем в контроле [639к]. Присутствие протеогликанов изменяет и механические свойства коллагеновых гелей, их сократимость под действием напряжений, создаваемых клетками [248].

Предполагают также, что протеогликаны играют ведущую роль в организации инфраструктуры внеклеточного матрикса, соединяя и удерживая вместе все остальные его компоненты [533].

Хондроитинсульфат – дерматансульфатпротеогликан в растворе или в составе внеклеточного матрикса обычно подавляют адгезию клеток к субстрату [66, 558] и миграцию клеток [208, 491].

Протеогликаны, способствующие прикреплению клеток, как правило, содержат гепарансульфат [549]. Взаимодействие гепарин-связывающего домена фибронектина с соответствующим лигандом необходимо для стабилизации пучков активных филаментов и фокальных контактов, обеспечивающих полное распластывание фибробластов на подложке [660].

Протеогликаны, несомненно, играют большую роль в организации клеточной поверхности и внеклеточного матрикса, однако молекулярная биология этих компонентов развита пока плохо.

#### 2.2.1.2. Базальные мембраны

Базальные мембраны обнаружены у всех многоклеточных животных, исключая губок, и являются первой формой внеклеточного матрикса, возникающей в онтогенезе [412]. Базальные мембраны отделяют эпителий, мышечную и нервную ткань от соединительной ткани и, несомненно, играют важную роль в становлении и поддержании их тканевой структуры во взрослом организме. Базальные мембраны и составляющие их макромолекулы участвуют в управлении образовании сосудов, миграции и инвазии клеток в ткани [387, 480]. Хотя при электронной микроскопии базальная мембрана выглядит как две аморфные зоны (*lamina lucida*, *lamina densa*) в сумме шириной 20–200 нм, эта структура, несомненно, имеет упорядоченную супрамолекулярную органи-

зацию. Среди макромолекулярных компонентов есть такие, которые входят в состав любых базальных мембран, составляют основу ее структурной организации и обеспечивают главные функции (коллаген IV, ламинин, энтактин, гепарансульфат-протеогликан). Многие, если не все базальные мембраны, содержат также тканеспецифические молекулы.

#### 2.2.1.2.1. Коллаген IV типа

Трехмерная сеть из коллагена типа IV составляет структурную основу базальных мембран. Тройная спираль коллагена IV типа состоит из двух  $\alpha 1$ - и одной  $\alpha 2$ -цепи, переплетенных вокруг друг друга, и представляет собой стержень длиной 390 нм, имеющий на С-конце глобулярный домен NC1. N-концевой сегмент длиной в 30 нм, играющий уникальную роль в образовании олигомеров, называют 7S-доменом [632].

Как в  $\alpha 1$ -, так и  $\alpha 2$ -цепях коллагена содержится более 20 нарушений в "коллагеновых" триплеттах Гли-Х-У, что обеспечивает большую гибкость тройных спиралей коллагена типа по сравнению с коллагенами, образующими фибриллы [272], и делает спираль доступной для протеолиза. Так, тройная спираль (олигомер) типа IV содержит 4 сайта расщепления пепсином [64]. Другой уникальной чертой трехспирального домена коллагена IV является присутствие 7 или 8 остатков цистеина, которые локализованы в местах нарушений "коллагеновых" триплетов  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -цепей и в N-концевом телопептиде. Внутримолекулярные дисульфидные связи образуются в центральной части и расположены близко от сайта расщепления коллагеназами, специфичными к коллагену IV типа [186]. Имеются также межцепочечные  $\alpha 2$ - $\alpha 1$  и межмолекулярные дисульфидные связи. Сегменты  $\alpha 1$ - и  $\alpha 2$ -цепей, образующие С-концевой глобулярный домен NC1, имеют высокомолекулярный внутренний повтор, содержащий 6 цистеинов, находящихся в неизменном положении. Каждый набор цистеинов образует 3-дисульфидные связи, благодаря которым возникают симметричные изгибы, разделяющие 2 субдомена внутри NC1 сегмента [573]. Межвидовая гомология от человека до дрозофилы особенно велика в NC1 сегменте.

Димеры коллагена IV *in vitro* образуются за счет взаимодействий NC1-доменов, а тетрамеры – при латеральных взаимодействиях 7S-сегментов, которые укладываются попеременно в антипараллельной ориентации. Структура олигомеров, образовавшихся за счет нековалентных взаимодействий, ста-

близуруется затем межмолекулярными дисульфидными сшивками. Последовательность образования двух вариантов олигомеров в процессе самосборки сети коллагена IV *in vivo* неизвестна. Однако из ткани удается экстрагировать димеры, способные к образованию нерегулярной полигональной сети посредством латеральных взаимодействий своих 7S-доменов [674]. Доказательства существования нерегулярной сети коллагеновых молекул *in situ* были получены при электронно-микроскопическом исследовании препаратов частично экстрагированной базальной мембраны [675]. Электронная микроскопия выявляет сложную трехмерную сеть ветвящихся филаментов с характерным расположением NC1-глобул в среднем через каждые 220 нм. Обнаружено, кроме того, что латерально ассоциированные молекулы коллагена IV образуют сверхскрученные спирали, что объяснимо на основании относительно высокой гибкости "несовершенных" трехспиральных доменов коллагена IV. Связывание коллагена IV с клеткой опосредуется двумя участками последовательности, расположенными в C-концевом и N-концевом районах тройной спирали. NC1 и 7S-домены не взаимодействуют с клеточной поверхностью [632]. Хотя тройная спираль содержит много RGD-элементов, эти элементы не участвуют в клеточной адгезии [634].

Роль недавно обнаруженных минорных компонентов коллагена IV  $\alpha 3$ - и  $\alpha 4$ -цепей [81, 551] не известна. Гены L1 и  $\alpha 2$ -цепей коллагена IV кодируются противоположными цепями ДНК на одной хромосоме и имеют общий промоторный район длиной в 120 п.н. [243, 501], что указывает на необычные механизмы регуляции транскрипции обоих генов. Промотор сам по себе не обладает достаточной активностью и зависит от энхансера (и возможно, сайленсера), локализованных в первом большом интроне гена  $\alpha 1$ -цепи [327]. У дрозофилы имеется только  $\alpha 1$ -цепь коллагена IV, которая несколько длиннее  $\alpha 1(IV)$  цепи млекопитающих. В доменах 7S и NG1 обнаружена очень высокая гомология с соответствующими участками молекул мыши, но положение "несовершенных" последовательностей и цистеиновых остатков сильно отличается [48, 396]. Вследствие этих структурных особенностей молекулы коллагена IV дрозофилы способны не т...

генам коллагенов далеких эволюционных предков, у которых еще не произошло разделения на коллагены, образующие фибриллы и коллагены, полимеризующиеся в сеть.

Помимо того, что коллаген IV образует механический каркас базальной мембраны, он обеспечивает укладку в этот каркас других специфических для этого образования макромолекул: ламинина, протеогликана и энтактина. Эти взаимодействия описаны ниже.

#### 2.2.1.2.2. Ламинин

Ламинин является одним из мажорных компонентов базальных мембран всех типов у позвоночных [632] и обнаружен у некоторых беспозвоночных животных [104, 185, 421]. Ламинин, по-видимому, является наиболее рано экспрессируемым компонентом внеклеточного матрикса, так как может быть обнаружен уже на двухклеточной стадии [165].

Молекула ламинина мышей имеет мол. массу около 900 кД и состоит из трех различных полипептидных цепей, связанных дисульфидными связями. Цепи  $\beta 1$  и  $\beta 2$  имеют мол. массу около 220 кД каждая, а мол. масса цепи  $\alpha$  составляет 400 кД [632]. Молекула имеет форму креста, в котором три коротких сегмента представляют собой N-концевые фрагменты  $\beta 1$ ,  $\alpha$ - и  $\beta 2$ -цепей. C-концевые участки этих цепей, расположенные параллельно друг другу, образуют четвертый длинный сегмент этой структуры, причем большой глобулярный домен, которым заканчивается длинный сегмент, сформирован исключительно за счет C-концевого фрагмента  $\alpha$ -цепи. N-концевые последовательности всех трех цепей ламинина, образующие короткие сегменты креста, очень сходны. На их N-концах расположены так называемые глобулярные структуры VI, а несколько ближе к месту "пересечения" в структуре креста-глобулярные домены IV, которых в  $\alpha$ -цепи — два, а в  $\beta 1$ - и  $\beta 2$ -цепях — по одному. Кроме того, в этих сегментах креста локализируются симметричные участки, содержащие цистеин-богатые ЭФР-подобные повторы — домены III, которые уже не раз упоминались в этом тексте в связи с обсуждением структуры других белков. Однако, в отличие от многих других белков, ЭФР-подобные повторы ламинина (протеолитический фрагмент 1-го домена сегменты "креста" без концевых гло-



его рецептор. Стимуляция пролиферации, полученная в опытах с фрагментами ламинина, не зависит от эффекта ламинина на прикрепление и распластывание клеток, поскольку фрагмент-1, который не имеет сайтов адгезии для клеток линий BalB/c 3T3 и PAM 212, тем не менее оказался для них митогенным. Пептид YIGSR, являющийся частью ЭФР-подобных повторов и обладающий адгезивными свойствами для клеток, не индуцировал пролиферации [471]. Молекулярный внутриклеточный механизм митогенного эффекта ламинина не известен. Обращает внимание то, что реагировать на ламинин и его фрагменты оказались способными только клетки, несущие рецептор ЭФР. Кроме того, было обнаружено, что инкубация клеток с фрагментом-1 ламинина вызывает фосфорилирование внутриклеточного домена этого рецептора уже через несколько минут. Поскольку прямой конкуренции между ламинином и ЭФР за рецептор не обнаружено, можно предположить, что ламинин и ЭФР связываются с различными сайтами одного и того же рецептора [471].

В связи с локализацией митогенных сайтов во фрагменте-1 ламинина важно знать, что этот домен локализован внутри базальных мембран роговицы [557] взрослой мыши вследствие ориентированного расположения молекул ламинина в составе базальных мембран. Следовательно, митогенные сайты молекулы ламинина могут быть доступны клеткам только либо на ранних стадиях развития, когда базальная мембрана еще не сформирована или имеет другую структуру, либо после повреждения или перестройки базальной мембраны во взрослом организме [471]. Таким образом, митогенные свойства ламинина могут очень локально контролироваться во время развития, морфогенеза, регенерации и при опухолевом росте.

Последовательность С-концевых фрагментов В1-и В2-цепей и последовательность центрального района А-цепи предсказывает  $\alpha$ -спиральную структуру длинного сегмента креста с закручиванием трех спиралей вокруг друг друга (coiled-coil-конформация). Кроме того, в В1 цепи имеется цистеин-богатый домен  $\alpha$ . С-концевой фрагмент А-цепи (1000 остатков) образует большой глобулярный G-домен, имеющий 5 внутренних повторов с 25% идентичности [632].

Мышинный ламинин содержит 13% углеводов, причем все они, по-видимому, являются N-связанными конъюгатами. Большая часть гликозилирования приходится на длинный сегмент креста, что может быть существенным для защиты это-

го участка молекулы от протеолитической активности [547]. Гены, кодирующие В1-, В2-и А-цепи ламинина, расположены на различных хромосомах [418, 495, 632]. В клетках тератокарциномы F9 транскрипция всех трех генов регулируется координированно [339]. Столь жесткий контроль не был обнаружен во многих других случаях. Часто, например, синтез А-цепи происходит на относительно низком уровне [57], что делает возможным существование изоформы ламинина, состоящей из димеров В1-и В2-цепей. Ламинин, секретируемый шванновскими клетками мышей, лишен некоторых "обычных" эпитопов, имеет Y-образную, а не крестообразную форму и, возможно, содержит вариантную форму А-цепи [174]. В процессе морфогенеза метанефроса *in vitro* нефрогенная мезенхима экспрессирует В1-и В2-цепи ламинина, но не имеет А-цепи, которая индуцируется с образованием канальцев. Интересно, что антисыворотка против С-концевого глобулярного домена А-цепи ламинина подавляет морфологическую поляризацию образующегося эпителия канальцев, но не само их образование или ветвление мочеточника. С-концевой домен А-цепи обладает сайтом связывания гепарина, поэтому возможно, что эффект, обнаруженный в этой работе, обусловлен нарушением в сборке базальной мембраны, а не подавлением связывания клеток с ламинином [335]. Ламинин из плаценты содержит дополнительную М-цепь [460].

При нагревании, подобно коллагену IV, ламинин способен полимеризоваться с образованием геля. Полимеризация требует ионов кальция и концентрации белка не ниже 0,1 мг в мл. Олигомеры ламинина образуются за счет взаимодействия концевых глобулярных доменов [676]. Играет ли такая полимеризация какую-либо роль при образовании базальной мембраны *in situ* неизвестно. Поскольку применение хелирующих агентов резко увеличивает растворимость ламинина при его экстракции из базальной мембраны [482], то взаимодействие молекул ламинина друг с другом, возможно, вносит вклад в супрамолекулярную организацию базальной мембраны.

Хотя ламинин и комплекс ламинина с энтактином, несомненно, связывается с молекулами коллагена IV, молекулярная природа этих взаимодействий остается неизвестной. Ни один из выделенных к настоящему времени доменов ламинина не имеет родства к коллагену IV. Тем не менее, комплексы между нативным ламинином и коллагеном IV в ра-

створе были обнаружены при помощи электронной микроскопии [360]. В этой работе было выявлено три сайта связывания ламинина в тройной спирали молекулы коллагена IV, находящиеся на расстоянии 80 нм, 140 нм и 220 нм от С-концевого NC1-домена. По данным электронной микроскопии, участки ламинина, взаимодействующие с коллагеном, лежат внутри коротких сегментов креста и в глобулярном домене на конце длинного сегмента [91, 360].

Большинство клеток охотно использует подложки из ламинина для своего прикрепления и распластывания [632]. Высокоаффинные сайты связывания ламинина с клетками находятся в так называемом протеолитическом фрагменте-1, составляющем три коротких сегмента "креста" без концевых глобул и фрагменте-8 (С-концевая область "ручки креста") [17].

В домене III В1-субъединицы (фрагмент-1) был идентифицирован сайт Тир-Исл-Гли-Сер-Арг-NH<sub>2</sub> (YIGSR)-NH<sub>2</sub>, который способен обеспечивать адгезию и миграцию клеток [234, 235], подавлять колонизацию легких клетками меланомы [308], а также препятствовать миграции клеток нервного гребня [44]. Замена остатков Тир или Арг на другие аминокислоты приводит к утрате активности. Этот пептид, однако, не обладает другими активностями, которые свойственны ламинину: стимулировать размножение клеток и вызывать отрастание нейритов у нервных клеток.

Другой сайт (F9), обнаруженный недалеко от N-конца цепи В1 [91], также способствует прикреплению клеток и связывает гепарин.

RGD-последовательность, расположенная в домене IV на А-цепи (фрагмент-1), может участвовать в связывании с интегринами клеточной поверхности [321].

Четвертый активный сайт, состоящий из 19 аминокислотных остатков (РА22-2), расположен на С-конце А-субъединицы перед началом концевой глобулярной домена и обеспечивает как адгезию, распластывание и миграцию, так и отрастание нейритов [570, 618]. Для биологической активности оказалось достаточно пептида Исл-Лиз-Вал-Ала-Вал, входящего в обнаруженную 19-членную последовательность. Замена изолейцина на глицин делает пептид неактивным.

Пептид РА22-2, введенный внутривенно или внутривентально, увеличивает метастазирование клеток меланомы в легкие мыши, а также стимулирует клетки к секреции коллагеназы IV в той же степени, как и нативный ламинин [321].

Описана интересная кооперация между двумя сайтами связывания ламинина с клеткой [238], ведущая к возникновению капилляроподобных структур из клеток эндотелия в культуре. Показано, что как декапептид РА 21, содержащий RDG-последовательность ламинина, так и пептид YIGSR способны опосредовать прикрепление клеток эндотелия к субстрату и в растворимом виде уменьшать адгезию этих клеток к подложке из ламинина. При этом адгезия на пептиде РА 21 происходит быстрее и эффективнее, чем на пептиде YIGSR. На подложке, содержащей пептид РА 21, эндотелиоциты образовывали обычную монослойную культуру, тогда как на пептиде YIGSR они вели себя совсем по-другому. Клетки выбрасывали отростки, которые изгибались по направлению друг к другу и, соединяясь концами, образовывали "двумерные" кольца. Клетки, выращиваемые на так называемом матригеле - геле из компонентов базальной мембраны, включающих ламинин, очень быстро вытягиваются и образуют полые трубкообразные структуры, напоминающие капилляры. Добавление того или иного пептида в момент рассеивания клеток предотвращает образование трубкообразных структур, причем добавление пептида РА 21 вызывает, кроме того, существенное уменьшение числа прикрепленных клеток. Однако через 15 минут после прикрепления клеток к матригелю в отсутствие пептидов, эндотелиоциты теряют чувствительность к пептиду РА 21: его добавление уже не препятствует образованию капилляроподобных структур. Пептид YIGSR подавляет этот тип морфогенеза, даже если он добавлен спустя 1 час после прикрепления клеток. Таким образом, RDG-содержащий сайт ламинина обеспечивает в этой системе эффективную адгезию, а другой - YIGSR, каким-то неизвестным образом ингибирует межклеточные взаимодействия, ведущие к образованию капилляроподобных структур. Клеточные рецепторы двух этих сайтов различны, так как взаимодействие клеток с пептидом РА 21 возможно блокировать антителами к фибронектиновому интегрину, а взаимодействие с YIGSR-пептидом - антителами к ламинин-связывающему белку 32/67 кД [238].

Помимо пептидных сайтов взаимодействия ламинина с клеткой, в этих взаимодействиях принимают участие углеводные остатки на молекуле ламинина. Клеточными рецепторами этого типа связывания являются поверхностные галактозилтрансферазы [33, 529]. Экспериментальные воз-

действия, блокирующие связывание галактозилтрансфераз с углеводами ламинина, не препятствует адгезии клеток меланомы В16, но предотвращают их распластывание на субстрате [529]. Показано, что галактозилтрансфераза локализуется на поверхности ламеллоподий мигрирующих клеток [166]. Сходные результаты получены при исследовании поведения клеток феохромоцитомы РС12 на подложке из ламинина: инициация образования нейритов и их удлинение зависело от взаимодействия галактозилтрансферазы с N-связанными олигосахаридами ламинина. Иммуноцитохимически фермент был локализован на конусе роста нейритов.

#### 2.2.1.2.3. Энтактин

Энтактин представляет собой сульфатированный полипептид с мол. массой 148 кД, связывающийся с ламинином [632]. Молекула содержит 1217 аминокислотных остатков, 5% N- и O-связанных углеводов и выглядит при электронной микроскопии как 2 глобулярных домена различной величины, связанные гибким стержнем длиной 17 нм [406]. Маленькая глобула принадлежит C-, а большая N-концу молекулы [408]. Стержневой домен состоит из пяти ЭФР-подобных повторов, содержащих по 6 цистеинов на повтор, а также содержит триплет Арг-Гли-Асп, и несколько перестановок из тех же аминокислот. Кроме того, в молекуле имеются сайты связывания кальция. Показано, что последовательность Арг-Гли-Асп энтактина участвует в связывании с интегриновыми рецепторами. Последовательности, включающие консенсусы для сульфатирования по тирозину, локализованы исключительно в N-концевом глобулярном домене [406]. Глобулярные домены, особенно N-концевой, содержат несколько сайтов, легко гидролизующихся эндогенными и экзогенными протеазами. Высокая чувствительность энтактина к протеолизу, вероятно, существенна для процессов перестройки базальных мембран [155].

Ламинин и энтактин образуют эквимольный комплекс с Kd-1-10 нмоль, связывание которого с матриксом базальной мембраны зависит от кальция [104]. Разрушение комплекса ламинин-энтактин требует применения денатурирующих агентов. По данным электронной микроскопии, подтвержденными исследованиями по связыванию меченых фрагментов, в образовании комплекса участвуют C-концевой глобулярный фрагмент энтактина и домен III В1-цепи ламини-

на [408, 632]. Комплексообразование увеличивает устойчивость энтактина к протеазам [155].

Энтактин, кроме ламинина, связывается еще и с коллагеном IV, причем сайт связывания с коллагеном также локализован в C-концевом глобулярном домене. Аффинность энтактина к коллагену слабее, чем к ламинину. Энтактин и комплекс энтактин-ламинин связываются с участками тройной спирали коллагена IV, отстоящими на 80 и 18 нм от C-конца молекулы коллагена. По всей вероятности, главная функция энтактина состоит в опосредовании связывания ламинина с молекулой коллагена IV [632].

#### 2.2.1.2.4. Гепарансульфатпротеогликианы

Главным протеогликаном всех базальных мембран является высокомолекулярный гепарансульфатпротеогликан низкой плавучей плотности [632]. Сердцевинный белок этого протеогликана имеет мол. массу около 500 кД. К одному из концов этого стержневого мультидоменного белка длиной около 80 нм присоединены 3 цепи гепарансульфата, увеличивающие мол. массу молекулы до 620-720 кД. Сердцевинный белок, по-видимому, состоит из 6 глобулярных доменов, разделенных короткими промежутками [363]. Анализ последовательности имеющихся к настоящему времени кДНК-выклонов (составляющих около 40% от общей длины молекулы) выявил существование двух различных типов структур [449]. Структура первого типа представлена глобулярными доменами, соединенными ЭФР-подобными повторами, подобными таковым же повторам ламинина. Другая структура - это ряд из восьми петель, стабилизированных одной дисульфидной связью на петлю-домен, характерный для членов суперсемейства иммуноглобулинов. Белок гепарансульфатпротеогликана чувствителен к эндогенному протеолизу [334].

Из базальных мембран различного происхождения был выделен также низкомолекулярный гепарансульфатпротеогликан (130 кД) с высокой плавучей плотностью [632]. Поскольку этот компонент имеет общие антигенные детерминанты с высокомолекулярным протеогликаном, предположили, что первый является продуктом деградации последнего [364]. Однако различия в пептидных картах и способах присоединения цепей гепарансульфата говорят в пользу того, что высоко- и низкомолекулярные протеогликианы базальной мембраны являются продуктами различных генов [632]. В базальных мембранах

найденны и хондроитинсульфат/(дерматансульфатные) цепи. К каким сердцевинным белкам присоединены эти углеводы — неизвестно [322].

Закрепление протеогликана в структуре базальной мембраны осуществляется главным образом за счет сердцевинного белка, поскольку молекула не экстрагируется из базальной мембраны при высокой концентрации солей, предотвращающей электростатическое взаимодействие цепей гепарансульфата. По крайней мере, отчасти, это может быть обусловлено самополимеризацией протеогликана, которую наблюдали при нагревании очищенного материала при 37°C [677]. Ассоциация молекул высокомолекулярного протеогликана в димеры и более сложные звездчатые структуры происходит при участии наиболее удаленных от места присоединения углеводных цепей доменов сердцевинного белка. Протеолитическое отщепление этих доменов приводит к утрате способности к олигомеризации [632]. Электронно-микроскопически было обнаружено связывание протеогликана с концом длинного сегмента ламинина и с двумя сайтами трехспирального участка молекулы коллагена IV, отстоящими от C-концевого NC1-домена на 210 нм и 80 нм. Неизвестно однако, осуществляются ли это связывание за счет белок-белковых или углеводов-белковых взаимодействий [360].

Углеводные цепи гепарансульфата способны связываться с широким спектром лигандов, однако эти связи слабы и чувствительны уже к умеренным концентрациям солей. Такого рода связывание с константой диссоциации порядка 1 мкмоль происходит между гепарансульфатом и ламинином и гепарансульфатом и NC1-доменом коллагена IV. Специфичность связывания невысока, так как декстран сульфат и, в меньшей степени, хондроитин сульфат способны вытеснять цепи гепарансульфата из комплексов с ламинином и коллагеном IV. Сила таких взаимодействий зависит от степени сульфатирования цепей гепарансульфата. Так, только высокосульфатированный гепарансульфат из мембраны Райхерта, но не гепарансульфат из опухоли EHS, способен связывать эндогенный ингибитор сериновых протеаз, антитромбин. Высказано предположение, что некоторые гепарансульфаты могут играть важную роль в регуляции протеолитической активности при перестройках базальной мембраны в морфологических процессах [487].

Доказано, что цепи гепарансульфата связывают факторы роста, относящиеся к семейству щелочного ФРФ. Накопление

или высвобождение этих ростовых факторов из базальной мембраны играет ключевую роль в таком морфогенетическом процессе, как неоваскуляризация [196].

#### 2.2.1.2.5. Кальций-связывающий белок VM-40

Этот белок с мол.массой около 40 кД, экстрагированный из материала базальных мембран [164], идентичен ранее описанному остеонектину [51] и белку SPARC [415].

Судя по аминокислотной последовательности [357], белок состоит из четырех доменов (I-IV), из которых 2 концевых обладают сайтами связывания кальция. Домен I содержит 16 остатков глутамина, немодифицированных  $\gamma$ -карбоксилированием, как это наблюдается в других Ca-связывающих белках. N-концевой домен имеет типичную структуру Ca-связывающего домена (EF-hand), стабилизированную дисульфидной связью. Домен II богат дисульфидными связями, сходен со структурой ингибиторов протеаз типа овокюида и содержит фосфосерин [51, 183]. Удаление кальция вызывает конформационные превращения в молекуле VM-40, в частности, уменьшение числа  $\alpha$ -спиралей, локализованных в III-домене. Показано, что молекула способна к кооперативному связыванию 7 ионов Ca, что хорошо согласуется с наличием 9 сайтов связывания, предсказанных структурой [183]. Использование антител и нуклеотидных зондов показало, что VM-40 присутствует во внеклеточном матриксе кости и большинстве базальных мембран [277, 286]. Кроме того, было обнаружено, что VM-40 содержится во внутриклеточных гранулах тромбоцитов [596].

В базальных мембранах опухоли EHS белок VM-40 и ламинин находятся в стехиометрических соотношениях [407]. Константы диссоциации ионов кальция, связанных с молекулами ламинина и VM-40, лежат в интервале 1-100 мкмоль. Эти концентрации существенно выше нормального цитоплазматического уровня кальция, но ниже его внеклеточных концентраций. Следовательно, в результате секреции эти белки переходят из состояния, в котором они свободны от кальция, к состоянию полного насыщения всех Ca-связывающих сайтов [481]. Реальная концентрация кальция в базальной мембране неизвестна, но, вследствие большой плотности полианионных группировок, она может быть ниже, чем в собственно внеклеточном пространстве, где она равна приблизительно 1 ммоль. Следовательно, уровень кальция в

базальной мембране должен находиться внутри интервала Kd для ламинина и BM-40. Это означает, что даже незначительные изменения в концентрации кальция во внеклеточном матриксе могут приводить к существенным сдвигам в связывании  $\text{Ca}^{+2}$  с ламинином и белком BM-40 и, таким образом, возможно, регулировать структуру базальной мембраны. В молекуле ламинина обнаружены, но пока еще не локализованы 1 или 2 высокоаффинных ( $\text{Kd} = 7$  мкмоль) сайта связывания кальция, от которых зависит полимеризация этого белка [481]. Зависит ли конформация ламинина от связывания кальция — неизвестно, однако такое связывание стабилизирует структуру коротких сегментов ламининового "креста", защищая их от протеолиза [484].

#### 2.2.1.2.6. Тканеспецифические компоненты базальных мембран

Описано немало компонентов базальной мембраны и молекул, ассоциированных с этой структурой, которые обладают тканевой специфичностью или присутствуют только в базальных мембранах определенных локализаций. К сожалению, большинство этих описаний основано исключительно на применении иммунологических и иммуноморфологических способов исследования и поэтому не дают информации о структуре соответствующих компонентов. Особенно широк спектр антигенов, обнаруженных в зоне дермо-эпидермального соединения [191]. К сравнительно хорошо охарактеризованным компонентам дермо-эпидермальной зоны относятся коллаген VII и так называемый антиген буллезного пемфигоида (BPA).

**Коллаген VII.** Предшественник  $\alpha$ -цепи коллагена VII содержит последовательность, образующую N-концевой глобулярный домен (NC-2) с мол. массой около 30 кД, C-концевой глобулярный домен (NC1) с мол. массой 150 кД и последовательность в 170 кД, образующую тройную  $\alpha$ -спираль совместно с двумя другими  $\alpha$ -цепями [78]. C-концевой NC1 домен выглядит единой глобулой диаметром 50 нм с тремя отходящими от нее небольшими "шипами", а N-концевой NC2 домен как маленькая сфера [398].

Три такие  $\alpha$ -цепи объединены в молекулу коллагена VII, которая имеет мол. массу около 1050 кД и тройная спираль которой (без концевых глобулярных доменов) имеет длину 424 нм.

Из культур клеток коллаген VII экстрагируется, главным образом, в виде димера. Димер образован антипараллельной ассоциацией двух молекул в районе N-конца с перекрытием в 6 нм и стабилизирован межмолекулярными дисульфидными связями. Считают, что после дисульфидной стабилизации димера, происходит протеолитическое отщепление NC2-доменов и в такой форме молекула встраивается во внеклеточный матрикс [397].

К коллагену VII было получено несколько моноклональных антител, узнающих эпитопы в NC1-домене [372, 397, 537]. Иммуноморфологические исследования показали, что соответствующий антиген присутствует в зоне дермо-эпидермального соединения, а также на эпителиально-мезенхимальной границе слизистой рта, влагалища, языка, роговицы, склеры и амниона. Не было обнаружено окрашивания базальных мембран многих других тканей: печени, почек, кишечника, эндотелия и мышц [72, 537].

Иммуноэлектронно-микроскопические исследования выявили детерминанты коллагена VII в так называемых заякоривающих фибриллах [537]. Заякоривающие фибриллы представляют собой ультраструктурно-идентифицируемые волокна, расположенные под базальной мембраной некоторых тканей. Иногда эти фибриллы имеют подковообразную форму и расположены так, что концы "подковы" погружены в lamina densa базальной мембраны, а выступающая в пространство, занятое рыхлой соединительной тканью, "петля" окружает пучки исчерченных коллагеновых фибрилл.

В интерстициальном матриксе, примыкающем к lamina densa, обнаружены аморфные электронно-плотные образования, содержащие коллаген IV, и по структуре, вероятно, сходны с lamina densa, так называемые якорные бляшки. Наиболее обычная картина, видимая на электроннограммах, состоит в том, что заякоривающие фибриллы соединяют между собой базальную мембрану и якорные бляшки, а также якорные бляшки между собой [325]. Сеть заякоривающих фибрилл и якорных бляшек погружена в интерстициальный матрикс на глубину до 2 мкм. Наиболее вероятная интерпретация иммуноультраструктурных данных заключается в том, что заякоривающие фибриллы состоят в основном, а может быть, и исключительно, из коллагена VII, NC1-фрагменты которого погружены в lamina densa базальной мембраны и якорные бляшки.

Считается, что сеть заякоривающих фибрилл – якорных бляшек – стабилизирует связи между базальной мембраной и интерстициальным внеклеточным матриксом [78]. У больных с наследственным синдромом *epidermolysis bullosa dystrophica-recessive*, страдающих от обширных волдырей на коже и слизистых, наблюдается отслоение эпидермиса от дермы, отсутствие заякоривающих фибрилл и коллагена VII [266].

Антиген буллезного пемфигоида (АБП). Этот антиген был обнаружен с помощью аутоантител в сыворотке больных буллезным пемфигоидом [191]. Сыворотки больных выявляют этот антиген в зоне дермо-эпидермального соединения, а так же в аналогичных зонах слизистых, но не в других базальных мембранах. Сообщалось, что АБП является компонентом гемидесмосом базальных кератиноцитов [437, 648].

Антитела реагируют с несколькими полипептидами различной мол. массы, однако основным компонентом, по-видимому, является полипептид с мол. массой 230 кД [433]. Аминокислотная последовательность, определенная для фрагмента АБП (76 кД), не имеет гомологий с известными последовательностями [593].

Описано несколько других антигенов, по-видимому, специфичных для дермо-эпидермального соединения, которые, однако, плохо охарактеризованы: антиген рубцового пемфигоида [193], антиген KF-1 [39], антиген приобретенного буллезного эпидермолиза [469], антигены AF-1 и AF-2 [230] LN7:2 [373] и AA3 [465], антиген DA-1 [192].

S-Ламинин. Недавно описан новый белок базальной мембраны, названный S-ламинином [292]. S-ламинин имеет предсказанную по последовательности мол. массу 196,5 кД и необыкновенно высоко гомологичен B1 субъединице ламинина [292]. S-ламинин обладает всеми семью (I-VI, a) доменами, обнаруженными в 3 цепях ламинина, за исключением G-глобулярного домена A-цепи. S-ламинин обнаружен лишь в некоторых базальных мембранах: он сконцентрирован в базальной мембране нервно-мышечной синаптической щели, содержится в базальных мембранах периферических нервов и почечных гломерул [292].

Последовательность YIGSR в домене III B1-цепи ламинина, опосредующая связывание ламинина с клеткой, заменена последовательностью YTGLR в соответствующей позиции у S-ламинина. Двадцатичленная последовательность из домена IV ламинина, которая ответственна за связыва-

ние гепарина и адгезию некоторых клеток, идентична гомологичной последовательности в S-ламинином в 11 из 20 остатков [292]. Показано, что аксоны моторных нейронов способны прикрепляться к S-ламининому и некоторым его фрагментам. Хотя сродство аксонов к S-ламининому в опытах *in vitro*, не выше, чем к ламинину, на основании того, что S-ламинин сконцентрирован в синаптической щели, считают, что этот белок при реиннервации обеспечивает образование новых нервно-мышечных контактов точно в тех участках, где располагались "старые" синапсы [292]. Надежность попадания аксона в зону предсуществующего ранее синапса – около 95%, поистине удивительна, если учесть, что площадь синаптической поверхности составляет около 0,1% поверхности мышечного волокна [552].

Мерозин. Специфический белок базальной мембраны мерозин с мол. массой около 80 кД, обнаружен в базальных мембранах трофобласта. Позднее этот компонент появляется в базальных мембранах периферических нервов и поперечно-полосатых мышц [374].

Фактор фон Виллебранда. Этот высокомолекулярный мультидоменный белок, процессированная молекула которого имеет мол. массу 250 кД, секретируется эндотелиоцитами и мегакариоцитами [633]. Длинные нитеобразные полимеры белка образуются за счет межмолекулярных дисульфидных связей между концевыми доменами молекул. Эти полимеры могут откладываться в базальных мембранах сосудов и капилляров. Большая часть белка хранится в специализированных внутриклеточных гранулах и его главная функция, по-видимому, состоит в обеспечении адгезии тромбоцитов к внеклеточному матриксу, сосудов при повреждении эндотелия сосудистой стенки [633].

Другие компоненты. В базальных мембранах эмбриональных тканей некоторых локализаций содержится фибронектин и тенасцин. В некоторых базальных мембранах обнаруживаются белки амилоида-P и компоненты комплемента [632], ацетилхолинэстеразу и белок агрин, который, вероятно, способствует агрегации ацетилхолинэстеразы в участках нерво-мышечного соединения [229]. Уже упоминались факторы роста из семейства щелочного ФРФ, накапливающиеся в базальной мембране в связанном с гепарансульфатпротеогликаном виде. Обнаружено связывание с базальной мембраной коллагеназы, специфичной в отношении протеолиза коллагена IV [538]. Электрофоретический анализ экстрактов

базальных мембран [336, 480, 483] показывает, что в этом материале содержится большое число еще неидентифицированных компонентов.

### 2.2.2. Клеточные рецепторы

Из материала предыдущей главы можно сделать вывод, что молекулярные детерминанты компонентов внеклеточного матрикса, ответственные за взаимодействие с клеточной поверхностью, весьма разнообразны по своей природе. Это разнообразие предполагает существование более одного класса соответствующих рецепторов. Однако на сегодняшний день почти все, что известно в этой области, относится к взаимодействиям RDG –последовательностей белков внеклеточного матрикса с рецепторами семейства интегринов.

#### 2.2.2.1. Интегрины

##### 2.2.2.1.1. Структура, лиганды, специфичность

Интегрины составляют многочисленное семейство трансмембранных белков, состоящих из двух субъединиц:  $\alpha$  и  $\beta$ . Первичная структура большинства известных интегринов предсказана на основе последовательностей соответствующих кДНК [76, 294, 530, 533]. Обе субъединицы имеют крупный внеклеточный домен, трансмембранный домен и короткий цитоплазматический домен. К характерным чертам внеклеточного домена  $\alpha$ -субъединиц относятся: несколько сайтов связывания кальция, по структуре напоминающих Са-связывающие участки кальмодулина, сайт протеолитической деградации, расположенный у С-конца внеклеточного домена [533] и 180-членная последовательность коллаген-связывающего домена [505].  $\beta$ -субъединица во внеклеточном домене содержит участок, богатый цистеином и внутриклеточными дисульфидными связями, функция которого неизвестна, а в цитоплазматическом домене последовательность фосфорилирования по тирозину [294].  $\alpha$ -и  $\beta$ -субъединицы нековалентно связаны между собой, причем двухвалентные ионы благоприятствуют этой ассоциации [228]. Транспорт вновь синтезированных цепей рецептора на клеточную поверхность происходит только после того, как они объединяются [100]. Опыты с использованием шивок близлежащих группировок [544] и анализ специфичности индивидуальных интегринов

показывает, что активный центр, связывающий эти лиганды, образуется при участии определенных последовательностей обеих субъединиц [76, 533].

Цитоплазматические домены интегринов взаимодействуют с белками системы цитоскелета, и эти взаимодействия являются пусковым механизмом в перестройках цитоскелета, ведущих к расплыванию и (или) миграции клеток [294]. Белками цитоскелета, непосредственно взаимодействующими с цитоплазматическим доменом интегринов, являются, вероятно, талин [279] и (или) фибулин [14].

К настоящему времени [532] идентифицировано 11 различных  $\alpha$ -субъединиц интегринов и 7  $\beta$ -субъединиц, которые могут комбинироваться по определенным законам. Например,  $\beta_1$ -субъединица может быть ассоциирована с  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_5, \alpha_6$  и  $\alpha_v$ -субъединицами, в то время как субъединицы  $\beta_4, \beta_p, \beta_x$  и  $\beta_s$  своими партнерами имеют только одну определенную  $\alpha$ -субъединицу:  $\alpha_6, \alpha_4, \alpha_v$  и  $\alpha_v$ , соответственно.  $\beta_3$  субъединица может ассоциироваться либо с  $\alpha_{IIb}$ , либо с  $\alpha_v$ , в то время как  $\beta_2$  субъединица интегринов имеет свой индивидуальный набор партнеров:  $\alpha_L, L^\mu$  и  $L_x$ -субъединицы [99, 203, 269, 280, 320, 532].

В большинстве естественных белковых лигандов интегринов ядром сайта узнавания является последовательность RGD (Арг-Гли-Асп) [533]. Будучи адсорбированными на подложке, пептиды, содержащие эту последовательность, вызывают прикрепление клеток, тогда как находясь в культуральной среде, они ингибируют прикрепление клеток к естественным белкам внеклеточного матрикса, содержащим эту же последовательность. Поведение клеток, прикрепленных к таким пептидам, часто отличается от поведения на естественных субстратах что, обусловлено существованием нескольких разных сайтов адгезии у одного и того же белка. Кроме того, аффинность интегринов к коротким RDG-пептидам часто гораздо ниже, чем к RDG-последовательности в соответствующем белке. Так, аффинность рецептора фибронектина к "фибронектиновому" пептиду GRGDSP в 10-1000 раз ниже, чем к фибронектину, а для рецептора к витронектину аналогичная разница составляет лишь один порядок величин. Такие изменения в последовательности, как замена глицина на аланин или аспарагиновой кислоты – на глутаминовую кислоту то есть добавление одной метильной или одной метиленовой группы в RGD –последовательность, приводит к полной утрате биологической активности [493].

RGD –последовательность встречается сотни раз в тех белках, которые секвенированы к настоящему времени, однако в большинстве случаев эти последовательности не распознаются интегринами, вероятно, в силу стерических и конформационных причин.

В тех белках, в которых RGD–последовательность функционирует как ядро сайта распознавания интегринами, ее конформация также различна [533]. Этим объясняется то, что интегрин проявляет специфичность по отношению к своим природным лигандам. Так, например, интегрин  $\alpha_5\beta_1$  (VLA-5),  $\alpha_6\beta_1$  (VLA-6) и  $\alpha_6\beta_4$  взаимодействуют только с одним лигандом каждый: фибронектином или ламинином (два последних) [532]. В пределах индивидуального белка RGD–последовательности могут иметь различную конформацию или различаться по доступности для взаимодействия с одним и тем же интегрином. Так, эндотелиальный интегрин  $\alpha_V\beta_3$  распознает RGD –последовательность в  $\alpha$ -цепи фибриногена, расположенную около C-конца (572–574 остатки), но не взаимодействует с RGD –последовательностью на N-конце (95–97 остатки): [532]. Избирательность других интегринов не так высока: интегрин  $\alpha_1\beta_1$  (VLA-1) и  $\alpha_2\beta_1$  (VLA-2) взаимодействуют с коллагенами IV, I и с ламинином, а так называемый рецептор витронектина ( $\alpha_V\beta_3$ ) реагирует, кроме витронектина, с фибриногеном и костным сиалопротеидом-1 (532).

Кроме белков внеклеточного матрикса, некоторые интегрин взаимодействуют со специфическими белками клеточной поверхности. Так, интегрин лейкоцитов  $\alpha_4\beta_2$  (LFA-1) связывается поверхностными белками ICAM-1 и ICAM-2 [594], другой лейкоцитарный интегрин  $\alpha_4\beta_1$  (VLA-4) реагирует со специфическим для поверхности эндотелия белком VCAM-1 [177]. Несколько необычный случай представляет собой интегрин тромбоцитов  $\text{gpIIb/IIIa}$ , поскольку он опосредует агрегацию тромбоцитов благодаря связыванию с растворимым поливалентным молекулам, главным образом, фибриногеном [264]. Еще один лейкоцитарный интегрин  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1), помимо фибриногена, взаимодействует с компонентом комплемента  $\text{C}_3\text{b}$  и фактором свертываемости крови X [664].

Не все лиганды интегринов содержат последовательность RGD. Например, упомянутые выше молекулы ICAM человека ее не имеют [594], хотя в ICAM-1 мыши такая последовательность недавно обнаружена [19]. Не содержится RGD-

последовательности в сегмент V25 изоформы фибронектина, образующейся при альтернативном сплайсинге, который специфически, в отличие от всех других молекул фибронектина, узнается интегрином  $\alpha_4\beta_1$  [247]. В некоторых случаях последовательность, узнаваемая интегрином и отличная от RGD, по-видимому, имеет пространственную конфигурацию, близкую к конформации RGD. Это следует из того, что последовательность KQAGD в  $\gamma$ -субъединице фибриногена и RGD с приблизительно равной аффинностью взаимодействует с интегрином тромбоцитов  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  [264].

Набор интегринов, экспрессируемых различными клетками в культуре варьирует. Большинство клеточных линий имеет от 2 до 5 индивидуальных интегринов на своей поверхности. Особенно часто культивируемые клетки синтезируют рецепторы фибронектина ( $\alpha_5\beta_1$ ) и витронектина ( $\alpha_V\beta_3$ ), что может, по крайней мере, частично, быть объяснено адаптацией к обычным условиям культивирования, в которых очень высока концентрация фибронектина и витронектина сыворотки.

Некоторые интегрин высоко специфичны по отношению к типу клеток, который их экспрессирует. Крайний пример – $\text{gpIIb/IIIa}$ , который имеется исключительно у тромбоцитов и их предков–мегакариоцитов [288], а также лейкоцитарные интегрин: LFA-1, Mac-1,  $\text{p150/95}$  [532]. Интегрин  $\alpha_6\beta_4$ , по-видимому, специфичен для эпителиальных клеток и соответствующих опухолей [320].

Работ, в которых изучали бы модуляцию интегринов в связи с морфологическими процессами и процессом дифференцировки, пока очень мало. Было показано, что число рецепторов к фибронектину на поверхности клеток нервного гребня резко возрастает в фазе активной миграции этих клеток [158]. В процессе дифференцировки эритроидных предшественников уменьшается содержание фибронектинового рецептора на их поверхности [225, 376]. Один из наиболее известных “растворимых” морфогенов –  $\beta$  трансформирующий фактор роста вызывает резкое увеличение экспрессии интегринов в культивируемых клетках [267], чем, по крайней мере, частично, можно объяснить его влияние на форму клеток и отложение внеклеточного матрикса в культуре.

Экспрессия интегринов качественно и количественно изменяется при неопластической трансформации клеток [496]. При анализе набора интегринов в трех парах нормальных и трансформированных клеток, включая клеточную линию, ко-



торая была температурочувствительна к трансформации, было установлено, что трансформация сильно уменьшает уровень экспрессии  $\alpha_5\beta_1$ -рецептора фибронектина, но увеличивает содержание  $\alpha_3\beta_1$ -рецептора. В этой же работе обнаружено уменьшение содержания и двух других субъединиц интегринов, одна из которых была предположительно,  $\alpha_1$ -субъединица, а вторая не была точно идентифицирована [496]. Интегрин  $\alpha_3\beta_1$  отличается от  $\alpha_5\beta_1$  тем, что не связывается ни с интактным фибронектином, ни с его RGD-фрагментом при физиологических концентрациях солей [496, 610], но способен на это в других условиях [219]. Антигены к рецептору  $\alpha_3\beta_1$  препятствуют адгезии некоторых клеток к фибронектину, что означает, что этот интегрин все-таки в состоянии играть роль фибронектинового рецептора [611]. По-видимому, аффинность рецептора  $\alpha_3\beta_1$  к фибронектину много ниже, чем аффинность рецептора  $\alpha_5\beta_1$ . Различия свойств  $\alpha_3\beta_1$ - и  $\alpha_5\beta_1$ -интегринов могут быть одной из причин некоторых фенотипических изменений трансформированных клеток в культуре. Это, в первую очередь, относится к сильно уменьшенной способности трансформированных клеток накапливать фибриллы внеклеточного матрикса. Известно, что большинство неопластических клеток не способны вызывать образование густой сети фибрилл, состоящих из фибронектина и других матриксных белков [533], хотя такие клетки секретируют вполне нормальный фибронектин и способны использовать его как адгезивный субстрат. Сборка фибрилл матрикса, так же как и адгезия, инициируется взаимодействием молекул фибронектина с интегрином [394, 519]. Можно предположить, что при неопластической трансформации происходит замена интегринов, способных опосредовать как адгезию, так и сборку фибрилл, на такие (например,  $\alpha_3\beta_1$ ), которые поддерживают только адгезию [532]. Изменение спектра экспрессируемых интегринов, вероятно, не единственная причина нарушений сборки матрикса в опухолевых клетках. В процессе сборки важную роль играет центростремительное движение комплексов интегрин-фибронектин, зависящее от функционирования системы цитоскелета и, в первую очередь, пучков актиновых фибрилл [394], в то же время нарушения структурной организации и функционирования актиновых микрофиламентов — одно из центральных звеньев фенотипического выражения неопластической трансформации [639r].

Значительное изменение спектра экспрессируемых интегринов и параллельное изменение поведения клеток обнаружено при супертрансформации клеток остеосаркомы человека линии HOS [139]. В основе механизма трансформации клеток HOS лежат изменения гена *met* [474]. Трансформация сопровождается усилением экспрессии интегринов  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$  и  $\alpha_1\beta_1$ , которые функционируют как рецепторы ламинина, коллагенов и коллаген IV и ламинина, соответственно. Уровень экспрессии рецепторов фибронектина  $\alpha_5\beta_1$  и  $\alpha_3\beta_1$  не изменяется, а количество витронектинового рецептора  $\alpha_v\beta_3$  — резко снижалось. В соответствии с этими изменениями трансформированные клетки в 3–5 раз лучше прикреплялись к подложке из ламинина и коллагена и не могли эффективно использовать витронектиновые подложки [139]. Кроме того, трансформанты значительно лучше исходных клеток проникали через мембраны из матригеля — искусственного аналога базальных мембран. Для подавления "инвазии" трансформированных клеток в матригель требовался 5-тикратный избыток антител к интегрину  $\alpha_6\beta_1$  [139].

Аффинность интегриновых рецепторов к внеклеточным лигандам каким-то образом регулируется клеткой. Об этом говорит тот факт, что  $\alpha_2\beta_1$ -интегрин в эндотелиальных клетках проявляет свойства рецептора коллагена, ламинина и фибронектина [332, 356], тогда как в тромбоцитах этот же интегрин способен взаимодействовать только с коллагеном [176, 545, 611]. Одним из механизмов модуляции функции интегринов может быть фосфорилирование тирозина в цитоплазматическом домене этих белков. Показано, что такое фосфорилирование происходит, например, в трансформированных клетках, что отражается как на аффинности рецептора фибронектина, так и на его взаимодействии с цитоскелетным белком таллином [616].

#### 2.2.2.1.2. Интегрины и фокальные контакты

Взаимодействие цитоплазматического домена интегринов с цитоскелетом не менее важно для адгезии клеток к субстрату, чем связывание его внеклеточного домена с компонентами внеклеточного матрикса. Прочное прикрепление клеток возможно только при образовании адгезионных структур-фокальных контактов, и связывание интегрин с внеклеточным лигандом представляет собой лишь сигнал для органи-

зации таких структур. Одним из наиболее ранних этапов процесса организации фокальных контактов является, по-видимому, образование агрегатов интегринов на поверхности клеток, обращенной к подложке, покрытой внеклеточным матриксом [140]. В то же самое время или несколько позже на внутренней цитоплазматической стороне мембраны ведущего края клетки появляются структурные предшественники фокальных контактов в виде коротких радиально ориентированных актиновых филаментов [142]. Еще позднее в этом районе начинает локализоваться таллин, а затем — еще один компонент фокальных контактов — винкулин [310]. В сформированных фокальных контактах интегриновые рецепторы сконцентрированы на внешней поверхности мембраны этих структур, а таллин, винкулин,  $\alpha$ -актин и другие белковые компоненты бляшки фокального контакта образуют комплекс на внутренней поверхности этих участков мембран [80, 140, 637].

Пептид GRGDS, добавленный в культуральную среду стационарных фибробластов, вызывает быструю диссоциацию винкулина и  $\alpha$ -актинина из структур фокальных контактов, что показывает необходимость постоянства связи интегрин с внеклеточным иммобилизованным лигандом для сохранения комплекса белков внутриклеточной структуры фокального контакта [603]. В окончательном созревании фокальных контактов и в увеличении их площади принимают участие присоединяющиеся к ним толстые пучки актиновых филаментов, ответственные за тангенциальные механические напряжения в клетке [40]. Дополнительная стабилизация фокальных контактов, вероятно, достигается при ассоциации некоторых фокальных контактов с микротрубочками [517] и промежуточными филаментами [41, 240].

При обсуждении множественности адгезионных сигналов на молекуле фибронектина уже говорилось, что распознавания одной RGD-последовательности недостаточно для образования полноценных фокальных контактов и расплывания большинства клеток. Для этого требуется дополнительное взаимодействие клеток с гепаринсвязывающим доменом фибронектина, по-видимому, через гепаринсульфатпротеогликан клеточной поверхности. Механизмы участия протеогликана в образовании фокальных контактов неизвестны. В течение первых 6 часов после посадки клеток гепарансульфатпротеогликан отсутствует в фокальных контактах, но обнаруживается там через 24 часа [579].

Интересно, что интегрины, по крайней мере, фибронектиновый рецептор  $\alpha_5\beta_1$ , в некоторых условиях образует связь со своим лигандом без образования структур типа фокальных контактов. Так, по наблюдениям [579], с накоплением фибронектиновых фибрилл внеклеточного матрикса к 24 часам культивирования фибробластов, рецептор фибронектина перестает обнаруживаться в фокальных контактах, где он был до этого локализован, и перераспределяется в участки контактов фибронектиновых фибрилл с мембраной. В тех же условиях другой интегрин витронектиновый рецептор  $\alpha_v\beta_3$  остается в фокальных контактах и не ассоциируется с фибриллами [579]. Было обнаружено также сораспределение фибронектиновых фибрилл и актиновых пучков под поверхностью мембраны фибробластов грануляционной ткани *in vivo* [578, 647] и в культуре [661]. На основании этих данных можно думать, что по крайней мере, в некоторых условиях существует опосредуемая интегринными трансмембранная связь между сетью фибрилл внеклеточного матрикса и кортикальным актином. Динамика сборки внеклеточного матрикса, образования пучков актина и перераспределения рецептора фибронектина позволила [647] предположить, что эта система играет роль в механизмах сокращения раневой поверхности при заживлении ран.

Взаимодействие внеклеточного матрикса с клеткой через интегрины и фокальные контакты принципиально отличается от других типов взаимодействия клетки с внешней средой. Своеобразие взаимодействия этого типа определяется тем, что один компонент системы — актиновые фибриллы способны создавать механическое напряжение, а другой компонент — внеклеточный матрикс в силу структурированности и "нерастворимости" способен оказывать механическое сопротивление этим напряжениям.

Равновесие в этой системе может регулироваться изменением в любом из ее компонентов: цитоскелете, структуре фокального контакта и внеклеточном матриксе. Конечным результатом равновесия, установившегося на определенном уровне, будет определенная форма клетки.

Морфогенетическая роль внеклеточного матрикса в этой системе имеет несколько компонентов. Во-первых, именно матрикс несет сигнал, инициирующий сборку структур фокальных контактов и, следовательно, создание всей трансмембранной цепи. Во-вторых, этот сигнал обладает специфичностью и определяет выбор из спектра интегринов, эк-

спрессуемых клеткой, той молекулы, которая будет "работать" в этой системе. В-третьих, связывание молекулы внеклеточного матрикса с мембранным рецептором способно вызывать внутри клетки каскад реакций, влияющих на структуру, сборку и формирование цитоскелета. Показано, что взаимодействие клеток ВНК с фибронектином активирует фосфатидилинозитольный цикл [67] и внутриклеточное защелачивание у фибробластов [564]. Известно также, что связывание интегрин тромбоцитов со своими лигандами регулирует  $Na^+/H^+$  обмен [26] и фосфорилирование тирозина в белках [184]. Биохимические изменения такого рода, вполне вероятно, могут модулировать структуру цитоскелета. Показано, например, что фосфоинозиты подавляют активность гель-золина, контролирующего длину актиновых филаментов [312].

Наконец, морфогенетическая активность молекул внеклеточного матрикса зависит от их механических свойств, а скорее всего, от механических свойств их комплексов, степени локальной жесткости или гибкости. Этими свойствами определяется сопротивление, которое будет оказано механическим напряжениям, создаваемым актиновыми филаментами, и таким образом определяется форма клетки. Значение механических свойств подложки хорошо иллюстрируют опыты, в которых клетки выращивают на коллагене, нанесенном на жесткую поверхность коллагеновых гелей, прикрепленных к чашке или на "плотиках" коллагенового геля. Форма клеток, прикрепленных к таким химически неотличимым друг от друга субстратам, резко отличается [365, 643, 669].

Форма отдельной клетки часто определяет по существу все остальные черты ее фенотипа, а кроме того, контролирует процесс морфогенеза в клеточном коллективе.

Для тех клеток, которые еще сохранили возможность выбора между размножением и терминальной дифференцировкой, например, для базальных кератиноцитов, форма клетки может явиться решающим обстоятельством в осуществлении этого выбора [644]. Для уже дифференцированных клеток их форма определяет многие стороны биохимической активности, специфический дифференцировочный фенотип [37, 228а, 365]. Для клеточных коллективов, потенциально способных к морфогенезу, например, для эндотелиальных клеток в культуре, форма отдельной клетки является первым звеном цепи морфогенетических реакций, контролирующей инициацию всего процесса [302]. Капиллярно-подобные структуры в культурах эндотелия не образуются, если клетки слишком уплощен-

ны на подложке и морфогенез иницируется частичным "округлением" клеток. По-видимому, это можно объяснить простыми "геометрическими" соображениями: для образования трехмерных структур — капилляров, клетки должны иметь возможность "выйти" из плоскости жесткой подложки, с которой они связаны. Следующие этапы морфогенеза осуществляются на основе взаимодействия трансмембранных молекул друг с другом и с внеклеточными молекулами.

Система "внеклеточный матрикс-интегрины-цитоскелет" выполняет, вероятно, еще одну морфогенетическую функцию. Механическое напряжение в этой системе, генерируемое актиновыми филаментами, передается на внеклеточные фибриллы и, следовательно, может играть роль в морфологической организации самого внеклеточного матрикса, например, ориентируя его фибриллы. Роль интегрин в организации внеклеточного матрикса может быть иллюстрирована фенотипом мутантов *mus* дрозофилы, при которых происходит инактивация гена, кодирующего белок, гомологичный  $\beta$ -субъединицам интегрин позвоночных [404]. Одним из наиболее рано обнаруживаемых у мутантов дефектов является задержка в образовании и накоплении внеклеточного матрикса вокруг будущего места соединения связок с мышцами.

Еще один аспект морфогенетического действия системы внеклеточный матрикс-актиновый цитоскелет представляет взаимодействие мезенхимальных клеток с развивающимся эпителием желез. Геометрические параметры ветвления эпителия зависят от возраста зачатка, причем возрастные различия, а именно, кривизна образующихся почек, локально контролируется местной мезенхимой [448]. Можно предположить, что в основе этого контроля лежит градация механических напряжений в системе внеклеточный матрикс-актиновый цитоскелет.

Передвижения клетки по подложке так же требуют связывания интегрин с молекулами внеклеточного матрикса и приложения механического напряжения к точке связывания для "подтягивания" тела клетки к этой точке прикрепления. Участие связывающего центра интегрин в этом процессе доказано подавлением движения клеток под влиянием пептидных лигандов и антител к интегрин [4, 218]. Очевидно, что для того, чтобы клетка передвигалась необходимо, чтобы ее контакты с молекулами матрикса были в определенной степени лабильны. Механизмы, контро-

лирующие динамику образования и разрушения контактов, обеспечивающих перемещение клетки, изучены плохо. Известно, однако, что регуляция этого процесса может осуществляться как со стороны внеклеточного матрикса, так и со стороны самой движущейся клетки.

Различные адгезивные детерминанты молекул внеклеточного матрикса сильно различаются по способности поддерживать перемещение клеток, что выражается как в изменении скорости миграции, так и в постоянстве "выбранного" направления передвижения [4]. Индивидуальный адгезионный домен на молекуле матрикса образует связь с индивидуальными рецепторами поверхности. Можно предположить, что специфичность этого взаимодействия определяет и специфичность взаимодействия рецептор-цитоскелет, от которой и зависит эффективность использования образовавшейся механической системы, либо для передвижения клетки, либо для ее фиксации в данной точке подложки. Молекулярные механизмы, обеспечивающие индивидуальность взаимодействий рецептор-цитоскелет, однако, не известны.

Подвижность клетки зависит не только от свойств подложки, но и от свойств самой клетки. Культивируемые клетки различных линий часто проявляют склонность либо к передвижению, либо к стационарному состоянию. Переход от одного фенотипа к другому, вероятно, регулируется в эмбриональном развитии, например, у клеток нервного гребня [158]. Стационарные клетки образуют большое число стабильных фокальных контактов с прикрепленными к ним мощными пучками актиновых филаментов и склонны накапливать развитую сеть внеклеточного матрикса на своей поверхности. Напротив, клетки, склонные к миграции, обычно обладают небольшим числом фокальных контактов, их актиновые фибриллы собраны в более тонкие пучки, они, как правило, не способны удерживать на своей поверхности фибриллы матрикса [94, 342]. Мигрирующие клетки, в отличие от стационарных, не способны генерировать механические напряжения, достаточно сильные для того, чтобы деформировать эластическую подложку [638].

Фенотип мигрирующих клеток отчасти может быть обусловлен набором экспрессируемых интегринов. Так, гиперэкспрессия интегрин  $\alpha_5\beta_1$  в клетках, трансформированных соответствующим геном, приводит к снижению миграции [532]. Помимо качественных различий в спектре интегринов и плотности этих молекул на единицу площади поверхности,

мигрирующие клетки отличаются по величине фракции молекул интегринов, которые имеют высокую латеральную подвижность в плазматической мембране [158, 453]. В клетках нервного гребня с фенотипом мигрирующих клеток доля молекул рецептора фибронектина, имеющих высокую латеральную подвижность, составляет  $66 \pm 19\%$ , в то время как в клетках нервного гребня со стационарным фенотипом эта фракция составляет только  $16 \pm 8\%$ . Эти различия непосредственно связаны с тем, что в мигрирующих клетках рецептор диффузно распределен в мембране, тогда как в стационарных преимущественно локализован в мембране фокальных контактов, в составе которых он, вероятно, полностью неподвижен [158]. Поскольку коэффициент латеральной диффузии рецептора в обоих типах клеток одинаков, то различия в величине мобильных фракций, скорее всего, определяются различиями в склонности к образованию микроскопически идентифицируемых фокальных контактов или скоростью разрушения этих структур.

Механизмы, контролирующие разрушение фокальных контактов, неизвестны. Возможно, что эти механизмы включают ограниченный протеолиз, так как снаружи в мембране фокальных контактов обнаружен ингибитор активатора плазминогена урокиназного типа [497], в цитоплазматической бляшке  $\text{Ca}^{+2}$  зависимая протеаза кальпаин II [30], один из субстратов которого может быть таллин [31].

В клетках, трансформированных вирусом саркомы Рауса, вместо нормальных фокальных контактов были обнаружены кластеры мелких контактов — "розетки", которые чаще, в отличие от фокальных контактов, локализовались под эндоплазмой, а не на периферии ламеллоплазмы. С цитоплазматической стороны в этих местах были обнаружены агрегаты актина [санков, ил. 1979] своих размеров и локализации, розеточные контакты отличаются от фокальных тем, что клеточная мембрана в этом месте образует "ножку", отчего такие структуры называют еще подосомами [617]. В подосомах обнаружено большинство из тех белков, которые имеются в бляшке фокального контакта, однако способ их организации отличен. Каждая подосома или адгезионная розетка содержит сердцевину, состоящую из актиновых филаментов в комплексе с  $\alpha$ -актинином и фибрином. Эта сердцевина окружена кольцом из винкулина и таллина [411]. Прикрепление клеток, имеющих подосомы, менее чувствительно к присутствию эндогенного внеклеточного матрикса

[95]. По сравнению с фокальными контактами, подосомы являются более динамичными структурами: обновление 50% молекул  $\alpha$ -актинина в подосомах происходит за несколько секунд, тогда как в фокальных контактах для этого требуется более 5 минут [602]. Предполагают, что в подосомах локально повышено содержание специфических мембраносвязанных протеаз [93]. Подосомы обнаружены во многих неопластически трансформированных клетках, но особенно выражены в клетках, трансформированных вирусами, онкогенами которых кодируют тирозинкиназы. При этом в подосомах обнаружены продукты этих онкогенов (*src*, *abl*, *yes*) [80]. Сходные, а возможно, идентичные подосомам структуры обнаружены в некоторых нормальных клетках, имеющих "инвазивный" фенотип, таких, как моноциты, макрофаги и остеокласты [237a]. В мембране подосом обнаружена избирательная локализация рецепторов внеклеточного матрикса: интегрин, содержащий  $\beta_3$ -субъединицу (рецептор витронектина), сконцентрирован в подосомах, в то время как  $\alpha\beta_1$ -интегрин равномерно распределен по клеточной поверхности [679].

Возможно, подосомы представляют собой вариант контактных структур, обеспечивающих эффективную миграцию клеток и их проникновение через базальные мембраны. Набор молекулярных компонентов подосом сходен с набором компонентов фокальных контактов, однако принципы их сборки и функционирования неизвестны.

### 2.2.2.1.3. Интегрины беспозвоночных

Показано, что позиция-специфические антигены дрозофилы (PS-антигены) являются гомологами интегринов позвоночных [50, 377]. Известно два типа PS-антигенов: PS1 и PS2, которые имеют общую  $\beta$ -субъединицу, но различные  $\alpha$ -субъединицы [651]. Как PS1, так и PS2 начинают экспрессироваться еще в раннем эмбриогенезе, но по распределению в организме зародыша различаются. Интегрин PS2 обнаруживают в производных мезодермы [50], тогда как PS1 экспрессируется в основном в эктодермальных и эндодермальных производных, где его распределение имеет очень избирательный характер и изменяется в процессе развития [70, 652]. Мутации в генах интегринов дрозофилы приводят к многочисленным морфогенетическим дефектам: соматические мышцы у мутантных эмбрионов конденсированы в сфероиды и не прикреплены к стенке тела, структура вис-

церальной мезодермы и эпителия кишки искажена, дорзальное смыкание не завершено [446].

### 2.2.2.2. Неинтегриновые рецепторы внеклеточного матрикса

Афинная хроматография экстрактов многих тканей на ламинин-сэфарозе выявляет ламинин-связывающий белок с мол. массой 67-69 кД [639-6]. Моноклональные антитела к этому белку, хотя и с низкой эффективностью, подавляют связывание клеток с ламинином и окрашивают поверхность клеток, а также внутриклеточные структуры, по-видимому, какие-то элементы цитоскелета [385, 670]. В ламинине белок распознает последовательность YI GSR в B1-субъединице [235]. Описано также прямое связывание этого белка с актиновыми филаментами [71]. Клонирование и секвенирование кДНК, соответствующей ламинин-связывающему белку, показывает, что его последовательность состоит из 295 остатков (~32 кД), лишена сигнального пептида, но содержит типичный гидрофобный трансмембранный домен [673]. Некоторые из антител к рекомбинантному белку 32 кД реагируют не только с ним, но и с белком 67 кД, выделенным афинной хроматографией. Взаимоотношения между двумя этими молекулами, так же как и их функциональная роль, пока невыяснены.

Описан еще один ламинин-связывающий белок с мол. массой 56-66 кД, обнаруживаемый только в мышцах и сердце и отличающийся от упоминаемого выше компонента с мол. массой 67 кД [253]. Молекула этого белка состоит из 406 аминокислотных остатков, содержит сигнальный пептид, необычную последовательность, состоящую из поли-аспарагиновой кислоты на С-конце и не имеет трансмембранного домена [112]. Неизвестно, является ли эта молекула периферическим мембранным белком или же новым компонентом внеклеточного матрикса.

Несколько обнаруженных ламинин-связывающих белков, имеющих мол. массу 120 и 180 кД, пока еще плохо охарактеризованы [153, 337, 582].

Отдельный класс молекул поверхности клетки, взаимодействующих с ламинином, составляют галактозилтрансферазы, переносящие остаток галактозы с УДФ-галактозы на N-ацетилглюкозаминный остаток углеводной цепи гликопротеинов и гликолипидов [563]. Показано, что агенты, на-

рушающие функционирование галактозилтрансферазы: специфические антитела и  $\alpha$ -лактальбумин, а также блокирование или удаление углеводных группировок ламинина, распознаваемых ферментом приводит к подавлению распластывания клеток меланомы на подложке из ламинина [529], предотвращает образование и удлинение нейритов у клеток феохромоцитомы [33], подавляет миграцию клеток нервного гребня [528] и компактизацию морулы [28]. Специфичность этих взаимодействий подчеркивается наблюдениями, по которым галактозилтрансферазы не влияют на первоначальное прикрепление клеток, но участвуют в таких процессах, как распластывание и миграция [529]; при этом галактозилтрансферазы концентрируются на ламеллоподиях клеток, мигрирующих на ламинине, но не на фибронектине [166]. Углеводные остатки, ответственные за взаимодействие с галактозилтрансферазами, по-видимому, локализованы в L2/НК1-эпитопе ламинина [352].

Роль ганглиозидов как рецепторов белков внеклеточного матрикса, в частности, фибронектина, обсуждается в литературе с конца 70-х годов [340, 666]. Эти дебаты были основаны первоначально на опытах, в которых добавление ганглиозидов в культуру клеток вызывало их округление и открепление от фибронектинового субстрата [340, 489]. В дальнейшем было показано также, что включение ганглиозидов в мембрану клеток, исходно лишенных этих компонентов, позволяет клеткам приобрести способность к связыванию фибронектина [587a], а также, что антитела к углеводным детерминантам ганглиозидов GD2 и GD3 предотвращают прикрепление клеток меланомы к белкам внеклеточного матрикса [97, 647a]. Антитела к ганглиозиду GD3 нарушают морфогенетические процессы в эмбриогенезе, препятствуя конденсации мезенхимы при эпителиально-мезенхимальных взаимодействиях [546]. Не приходится сомневаться, что ганглиозиды участвуют во взаимодействиях клетки с фибронектином, однако какова природа этих взаимодействий, остается неясным. Возможно, что отрицательные заряды остатков сиаловых кислот ганглиозидов GD2 и GD3 взаимодействуют с группой положительно заряженных остатков, имеющих в повторах III типа фибронектина и, таким образом, опосредуют "рецепторную" функцию ганглиозидов. Более вероятно, однако, что роль ганглиозидов в клеточной адгезии состоит в создании электростатического окружения, благоприятствующего взаимодействию интегринов с фибронектином [79, 96, 97].

Еще одним клеточным рецептором белков внеклеточного матрикса является мембраносвязанный гепарансульфатпротеогликан [412, 659, 660]. Этот протеогликан взаимодействует с гепарин-связывающим сайтом фибронектина [660] и с ламинином [632], следствием чего является стабилизация связывания этих белков с интегринными, стабилизация фокальных контактов и улучшение распластывания клеток на подложке. Во взаимодействии участвуют углеводные цепи протеогликана, так как неполное процессирование этих цепей у мутантных клеток ВНК делает клетки неспособными образовывать фокальные контакты [124].

### 3. МЕЗЕНХИМАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД

Эпителий и мезенхима – понятия, отражающие главную альтернативу в организации большинства тканей. Термин "эпителий", в широком смысле слова, обозначает слитный пласт клеток, обладающий морфологической поляризацией, направленной по нормали к его поверхности и способный перемещаться как единое целое. Альтернативная, мезенхимальная организация подразумевает сообщество клеток, способных к независимому перемещению и поляризованных по касательной к поверхности подложки.

Различные варианты эпителиев обладают, в отличие от мезенхимы набором межклеточных контактных структур, таких, как плотные контакты, адгезионные контакты и десмосомальные контакты. Конкретный морфологический вариант эпителиа может "использовать" лишь часть структур из этого набора, варьируя их пространственную упорядоченность. Эпителий отличается также от мезенхимы по организации и молекулярному составу цитоскелета, набору экспрессируемых интегринов и других мембранных белков.

Во взрослом организме эпителиальный и мезенхимальный фенотипы очень стабильны, и перехода от одного из этих типов организации к другому практически не происходит. Исключение, по-видимому, составляет мезотелий, клетки которого в покоем состоянии образуют пласт, обладающий базолатеральной поляризованностью, а в условиях регенерации ведут себя как независимые, мигрирующие клетки [52].

По крайней мере, в некоторых инвазивных и метастазирующих опухолях, происходящих из эпителиа, клетки приобретают резко повышенную вероятность покинуть эпителиальный пласт и приобрести фенотип активно-мигрирующих оди-

ночных клеток. Такие клетки чаще всего сохраняют часть биохимических признаков, позволяющих определить их эпителиальное происхождение и, кроме того, не всегда утрачивают способность к потенциальному образованию эпителиальных структур в подходящих для этого условиях окружающей среды. Однако в фазе свободной миграции по многим признакам они более сходны с мезенхимой, чем с эпителием [371, 606].

Сходный феномен можно наблюдать при неопластической трансформации эпителия в культуре ткани. Некоторые трансформированные линии отличаются от своих "нормальных" эпителиальных предшественников тем, что неспособны организоваться в слитый пласт и приобретают фибробластоподобную форму, которой соответствует измененный характер организации актинового цитоскелета и внеклеточного матрикса [22]. Следовательно, и этот случай, со всеми оговорками, можно рассматривать как пример эпителиально-мезенхимального перехода.

Трансформация эпителия в мезенхиму и обратный переход неоднократно происходит при эмбриональном развитии: образование первичной мезенхимы при гастрюляции, образование сомитов, их дезэпителизация, образование клеток нервного гребня, формирование метанефрических канальцев. Таким образом, эпителиально-мезенхимальное превращение представляет собой широко распространенный естественный процесс перехода от одного принципа морфологической организации к альтернативному. В последние годы появились обнадеживающие подходы к пониманию молекулярных механизмов этого важнейшего морфогенетического процесса. Найдены культуральные модели, в которых клетки меняют эпителиальный фенотип на мезенхимальный в ответ на изменение условий культивирования: свойства подложки или набор гуморальных факторов среды [63, 241].

Так при культивировании фолликулов, выделенных из шитовидной железы, на пластиковой подложке или подложке, покрытой коллагеновым гелем, они сохраняют эпителиальную структуру, специализированные межклеточные контакты и эпителиальный тип промежуточных филаментов, состоящих из кератинов [241]. При погружении выделенных фолликулов в трехмерный коллагеновый гель, происходит разрушение межклеточных контактов, появление псевдоподиальной активности на базальной поверхности клеточной мембраны, кератиновые промежуточные филаменты заменяются виментиновыми, и часть клеток, приобретая форму фибробластов, мигрируют

из эпителиальной структуры в коллагеновый гель [241].

Другой пример эпителиально-мезенхимального перехода в культуре — клетки карциномы мочевого пузыря крысы линии NBI-II. При культивировании этих клеток на пластиковой подложке в стационарных условиях они образуют эпителиальный пласт. При использовании в качестве подложки коллагена или при замене стандартной сывороточной среды на среду, содержащую замещающий сывороточной среды факторов ultroser G, происходит превращение эпителия в мезенхиму [63]. Показано, что морфологическая трансформация сопровождается соответствующими биохимическими изменениями. Происходит перераспределение белков, входящих в структуродесмосом: десмоплакинов, десмоглеина и плакоглобина [428], появление виментиновых филаментов, реорганизация кератиновых филаментов и системы актин-фодрин. Эти изменения обратимы, и смена условий культивирования возвращает клетки NBI-II в эпителиальное состояние [63].

Эти культуральные системы, безусловно, перспективны для изучения механизмов эпителиально-мезенхимальных переходов, но пока практически ничего не говорят о последовательности молекулярных взаимодействий, лежащих в основе этих превращений.

В последние годы открыты гуморальные факторы, вызывающие эпителиально-мезенхимальную трансформацию некоторых типов клеток в культуре ткани. Одна из таких молекул — разъединяющий фактор (scatter factor) — секретируется фибробластоподобными клетками, в основном эмбрионального происхождения, а также их неопластически трансформированными потомками, и способна морфологически трансформировать различные культивируемые эпителии в мезенхимоподобные клетки [224, 605]. Сходный или идентичный фактор вырабатывается гладкомышечными клетками артерий [522]. Примечательно, что разъединяющий фактор индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход в культуре истинно эпителиальных дифференцированных клеток, включая эпителий молочной железы и кератиноциты, и при этом не оказывает никакого влияния на размножение этих клеток [605]. В присутствии разъединяющего фактора соединения между эпителиальными клетками разрушаются, клетки сильнее распластаются на подложке, на их свободных краях возникают псевдоподии, и они передвигаются хаотически в случайном направлении. Поскольку такие клетки направленно

мигрируют по градиенту концентрации разъединяющего фактора, ясно, что миграция не является побочным эффектом, но этот фактор способен непосредственно увеличивать подвижность клеток [604]. Фибробласты, независимо от того, вырабатывают ли они разъединяющий фактор, не чувствительны к его действию.

Независимо от разъединяющего фактора выделены еще два белка, обладающие сходной биохимической активностью, но действующие как аутокринные стимуляторы. Это — фактор, стимулирующий миграцию (MSF) и аутокринный фактор подвижности (AMF). Фактор MSF вырабатывается фибробластами плодов человека, но не фибробластами взрослых индивидов [555] и заставляет клетки-продуценты много быстрее мигрировать в трехмерный коллагеновый гель. Интересно, что этот же фактор вырабатывают фибробласты из стромы эпителиальных опухолей, фибробласты 90% больных семейным раком молочной железы и даже фибробласты 50% прямых родственников таких больных [242]. Фактор AMF первоначально был очищен из культуральной среды конденционированной клетками меланомы человека [386], а затем из клеток карциномы молочной железы человека [15]. AMF вызывает увеличение подвижности некоторых линий фибробластных клеток, в том числе и по аутокринному механизму. Показано, что AMF резко усиливает процесс образования псевдоподий и что на мембране этих псевдоподий концентрируются рецепторы к фибронектину и ламинину [249]. Все три выделенных фактора являются белками с мол. массой 62,70 и 55 кД для разъединяющего фактора, MSF и AMF, соответственно. Пока эти белки недостаточно охарактеризованы для того, чтобы сказать, представляют ли они одно семейство белков или не имеют структурного сходства, проявляя лишь сходную биологическую активность. Молекулярные механизмы действия этих факторов неизвестны.

По имеющимся сегодня данным, в некоторых случаях пусковым звеном в эпителиально-мезенхимальных превращениях может быть экспрессия молекул межклеточной адгезии. В разделе, посвященном этим молекулам, мы уже обсуждали опыты, в которых было показано, что экспрессия определенных MMA на мезенхимальных клетках приводит к их морфологической эпителизации, появлению между ними контактных структур адгезионного типа и реорганизации актинового скелета по эпителиальному типу [423, 439].

Подавление межклеточной адгезии под действием антител к одной из MMA L-CAM, приводит к "деэпителизации" и увеличению инвазивных свойств опухолевых клеток [35]. Показано, что специфичность цитоплазматического домена MMA, ответственного за взаимодействие с цитоскелетом, играет ключевую роль в индукции организации эпителиального пласта [440]. По всей вероятности, межклеточная адгезия посредством MMA обеспечивает возможность возникновения между клетками контактных структур адгезионного типа.

Межклеточные контактные структуры адгезионного типа являются аналогами фокальных контактов между клеткой и внеклеточным матриксом [637]: белковый состав цитоплазматической бляшки обеих структур очень сходен, а главное, и та и другая структура служат периферическими центрами организации актиновых филаментов. Отличаются эти структуры тем, что в качестве внеклеточного связывающего центра содержит либо внеклеточный домен интегрин, либо внеклеточный домен MMA. В эпителиальном пласте, объединенном адгезионными контактами, актин собран в подмембранные пучки, особенно мощные в зонах концентрации контактных структур, в мезенхимальных клетках — мощные пучки актиновых фибрилл, так называемые стресс-фибриллы, соединяют периферические фокальные контакты с актиновым кортексом центральной части тела клеток. Можно предположить, что между этими системами существует конкуренция: сильно развитая система межклеточных адгезионных контактов не совместима с развитой системой фокальных контактов и, наоборот, "растягивание" клетки на подложке посредством стресс-фибрилл и фокальных контактов препятствует образованию сети межклеточных адгезионных контактов. Если это предположение соответствует истине, то "простейший" механизм эпителиально-мезенхимальной трансформации состоит в переходе от одной из упомянутых систем контактов к другой.

Вероятно, некоторые культивируемые клетки готовы к реализации любой из этих систем контактов и поэтому легко могут быть переведены из "эпителиального" в "мезенхимальное" состояния и обратно путем изменения соотношений уровня экспрессии интегринов и MMA, предотвращая нормальное функционирование этих рецепторов при добавлении антител или RGD-пептидов, либо при изменении адгезивных свойств подложки. При "естественных" эпителиально-мезенхимальных переходах в эмбриогенезе модуляции экспрес-



сии ММА, интегрин и компонентов внеклеточного матрикса происходят в результате координированного изменения активности соответствующих генов, примеры чего можно найти в предыдущих разделах этого текста.

У высокодифференцированных эпителиальных и мезенхимальных клеток характер реакции на подложку и мембрану соседних клеток определяется более сложными программами. Эти программы включают создание десмосомальных и плотных контактов, изменения молекулярного состава промежуточных филаментов и другие высокоспециализированные изменения. Поэтому эпителиально-мезенхимальный переход в клетках такого типа требует серьезных перестроек в активности многих генов, наблюдается крайне редко и происходит в усеченном виде при прогрессии некоторых злокачественных опухолей.

## СПИСОК

### использованных источников информации

1. Abrahamson D.R., Irvin H.H., St. John P.H. et al.//FASEB J. - 1988. - 2, P. 629.
2. Akam M.E.//Development. - 1987. - 101, - P. 1-22.
3. Akam M.E.//Cell. - 1989. - 57, - P. 347-349.
4. Akiyama S.K., Yamada S.S., Chen W.-T. et al.//J. Cell Biol. - 1989. - 109, - P. 863-875.
5. Anderson D.T.//Developmental Systems: Vol. 1 Insects. - London: Academic, 1972. - P. 47-60.
6. Anderson H.//Experimentia. - 1990. - 46, - P. 2-13.
7. Anderson K.V.//Trends Genet. - 1987. - 3, - P. 91-97.
8. Anderson K.V., Bokla L., Nüsslein-Volhard C.//Cell. - 1985, - 42, - P. 791-798.
9. Anderson K.V., Jürgens G., Nüsslein-Volhard C.//Ibid. - P. 779-789.
10. Anderson K.V., Nüsslein-Volhard C.//Nature. - 1984, - 311, - P. 223-227.
11. Anderson K.V., Nüsslein-Volhard C.//Gametogenesis and the Early Embryo/Ed. Gall J. - N.-Y.: Mc. Millan, 1986, - P. 177-194.
12. Anfderheide E., Chiquet-Ehrismann R., Ekblom P.//J. Cell Biol. - 1987. - 105, - P. 599-608.
13. Anfderheide E., Ekblom P.//Ibid. - 1988. - 107, - P. 2341-2349.
14. Argaves W.S., Dickerson K., Burgess W.H., et al.//Cell. - 1989. - 58, - P. 623-629.
15. Atnip K.D., Haney L., Nicolson G.L. et al.//Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1987. - 146, - P. 996-1002.
16. Aumailley M., Mann K., von der Mark H. et al.//Exp. Cell Res. - 1989. - 181, - P. 463-474.
17. Aumailley M., Nurcombe V., Edgar D. et al.//J. Biol. Chem. - 1987. - 262, - P. 11532-11538.
18. Baker N.E.//EMBO J. - 1987. - 6, - P. 1765-1773.
19. Ballantyne C.M., O'Brien W.E., Beauder A.L.//Nucl. Acid. Res. - 1978, - 17, - P. 5853.
20. Balling R., Deutsch V., Grüss P.//Cell. - 1988. - 55, - P. 531-535.
21. Balling R., Mutter G., Grüss P. et al. - Ibid. - 1989. - 58, - P. 337-347.
22. Bannikov G.A., Guelstein V.I., Montesano R. et al.//J. Cell Sci. - 1982. - 54, - P. 47-67.