

Клетка: координация молекулярных процессов деления

Ф.И.Атауллаханов, Е.Л.Грищук

Способность создавать себе подобных — важнейшее свойство живых организмов, без которого невозможна непрерывность жизни и ее разнообразие. Главный элемент живых существ, в полной мере обладающий таким свойством, — это клетка. Она умеет делать то, чего не может ни один человек. Пока даже не очень понятно, каковы принципы работы клетки и каковы механизмы этой работы. А простейшая клетка, у которой нет ни глаз, ни рук, ни мозга, легко и непрерывно копирует себя. Задача понять эти клеточные секреты кажется нам одной из наиболее «вызывающих» загадок современного естествознания. Сегодня нет сомнений, что ее решение невозможно без совместных усилий не только биологов, но также химиков, физиков и даже математиков. Нельзя не упомянуть и о медицинских аспектах проблемы: понимание механизмов деления клеток и причин нарушения этих устройств — вот тот ключ, который откроет пути к созданию эффективных методов лечения многих болезней, в первую очередь рака.

Может показаться странным наше утверждение, что в делении клетки есть какие-то загадки. В любом школьном учебнике довольно много места уделяется этому процессу, опубликованы

© Атауллаханов Ф.И., Грищук Е.Л., 2012



Фазил Иноятович Атауллаханов, доктор биологических наук, профессор МГУ им.М.В.Ломоносова, заведующий лабораторией физической биохимии Гематологического научного центра и лабораторией биофизики Детского центра гематологии, онкологии и иммунологии. Научные интересы связаны с клеточной биологией, нелинейной динамикой и самоорганизацией в биологических системах.



Екатерина Леонидовна Грищук, доктор философии, профессор Пенсильванского университета (США), возглавляет лабораторию биофизики клеточного деления. Область научных интересов включает клеточную биологию и биофизику митоза.

десятки, если не сотни тысяч научных статей. Что же тут может быть загадочного?

Действительно, сейчас известны много деталей клеточного деления, огромная масса безусловно важных событий. Однако непонятны его основные принципы. И поэтому зачастую нельзя оценить, как много еще предстоит выяснить. Последние два-три десятилетия принесли в области клеточного деления ряд выдающихся достижений, которые можно рассматривать как революцию в наших представлениях. Такой успех вселяет в нас оптимизм и надежду, что понимание молекулярных механизмов, принципиально определяющих клеточное деление, не за горами.

Мы покажем, как непросто получать ответы на «простые» вопросы и как эти ответы трансформируют «школьные» знания о клетке. Но сначала напомним вкратце основные сведения о делении клетки, т.е.

«Школьные» представления

Тот факт, что все организмы состоят из клеток, наверно, был установлен сразу же после того, как Левенгук в конце XVII в. создал удивительно качественные линзы, которые привлекли внимание биологов к микроскопическому устройству живых объектов. (Вопреки распространенному мнению, он не был изобретателем микроскопа, но умел делать отличные очень сильные линзы!) И к середине 19-го столетия, в 1855 г. (более 150 лет назад!), Рудольф Вирхов сформулировал свое знаменитое: «*Omnis cellula ex cellula*» (Каждая клетка — из клетки). Таким образом, жизненный цикл любой клетки — клеточный цикл — начинается с деления. Затем следуют рост и удвоение всего содержимого, и клетка готова опять поделиться, чтобы породить себе подобную. Микроскоп позволяет воочию увидеть одну из важнейших фаз этого процесса — митоз, процесс расхождения хромосом и деления клетки на две части.

Чтобы поделиться, все нужно удвоить. Это очевидно и не кажется очень уж сложной задачей. Если при делении какие-то клеточные органеллы разделились не точно поровну, клетка досинтезирует недостающее. У некоторых организмов, например у почкующихся дрожжей, деление всегда происходит очень неравномерно. Эти дрожжи не делятся пополам, а отделяют от себя почку. Образовавшаяся таким образом дочерняя клетка существенно меньше материнской, но потом она вырастет и будет способна сама создавать новую клетку. Утверждение, что все можно поделить примерно, справедливо по отношению ко многим компонентам клетки, но есть серьезное исключение, которое невероятно увеличивает сложность проблемы. Насколько эта сложность велика, стало понятно, когда была выяснена природа наследственности. Только во второй половине 20-го столетия, после революционных достижений генетики и молекулярной биологии, стало ясно, что информация о клетке закодирована в последовательности оснований ДНК. Длина этого «текста» — примерно миллиард букв, записанных в виде 46 длиннейших и тончайших нитей ДНК, т.е. 46 хромосом. Сегодня, когда в моде слово «нано», не грех взглянуть на цифры. Диаметр молекулы ДНК — 2 нм, длина — около $2 \cdot 10^8$ нм, при том что размер самой клетки в десятки тысяч раз меньше! Если увеличить молекулу ДНК до видимых размеров — до толщины, скажем, с волос (0.1 мм) — ее длина составит 10 км! Чтобы сделать новую клетку, необходимо точно скопировать все эти буквы (допускается всего несколько «опечаток»), создать точные копии всех 46 хромосом. При этом недопустимо сделать как меньше, так и больше копий — нужно ровно две. Любое отклонение приведет к гибели. Эту задачу решает целый ряд молекулярных систем, работающих в определенной фазе клеточного цикла — фазе синтеза ДНК,

или S-фазе. Легко увидеть минимум два простых вопроса в этой фазе клеточного цикла:

— как обеспечить такую фантастическую точность копирования;

— как сделать так, чтобы вся ДНК полностью и без пропусков была скопирована только один раз и не больше?

Молекулы ДНК нужно упаковать. Представьте себе замкнутое помещение, в котором находится 46 отдельных ниток, каждая из которых в 10 тыс. раз длиннее самого большого его измерения. Понятно, что без специальных ухищрений невозможно манипулировать нитями без того, чтобы они не превратились в безнадежно запутанный клубок. Так было бы и с молекулами ДНК, а ведь манипулировать ими необходимо. Нужно считывать информацию с генов, синтезировать новые копии нитей ДНК. Похоже, что единственный способ избежать хаоса — упаковка. Проще всего — намотать все на одну катушку — неприемлем. Он делает невозможным быстрый доступ к любым частям нити. Действительно, в клетке они компактно упакованы, что особенно важно перед ее делением. Размер упакованной формы ДНК (она и называется хромосомой) в 10–100 тыс. раз меньше, чем длина ДНК. Отсюда вытекает еще один простой вопрос, в решении которого огромный прогресс произошел в последние годы: как упакована ДНК?

Хромосомы нужно разнести в разные концы клетки, не перепутав. После синтеза молекулы ДНК существуют в виде двух идентичных копий. Их-то и нужно разнести в разные концы клетки, да так, чтобы в каждый набор вошла только одна копия и в нем содержались все молекулы ДНК, скажем, для клеток человека — ровно 46 штук. Ничего нельзя перепутать. Получить два одинаковых тома этой энциклопедии. И ни одной копии другого — для клетки это так же смертельно, как недополучить одну из копий. Разносит молекулы ДНК специальный аппарат, называемый веретеном деления. Оно хорошо видно в микроскоп. Это фаза деления клетки, отчетливо опознанная еще первыми микроскопистами, — митоз. Замечательные рисунки У.Флеминга (рис.1) и его современников поражают точностью и детальностью изображения этой структуры. Вот вытекающие из этого простые вопросы, с которых в значительной степени удалось сбросить завесу загадочности в последние годы:

— как клетка распознает сестринские хромосомы;

— какие силы двигают их в нужном направлении и в нужное место;

— как клетка контролирует точность выполнения задачи?

Фазы клеточного цикла. Упомянутые фаза S и митоз (M) — наиболее ярко выраженные антиподы. Процессы, идущие в одной из них, чаще всего подавлены в другой. Полный клеточный цикл не определяется только суммой времен этих двух фаз.

Большинство клеток нуждается в гораздо большем времени для того, чтобы удвоить основную массу своих белков и органелл. Поэтому подавляющее число клеток имеет еще две фазы: G1 (временной промежуток между митозом и S-фазой) и G2 (время между S-фазой и митозом). Вот почему традиционно клеточный цикл ядерных клеток (эукариот) принято делить на четыре последовательно сменяющие друг друга фазы — G1, S, G2 и M (рис.2).

В типичных клетках человека, размножающихся в пробирке, клеточный цикл продолжается около 24 ч, тогда как длительность митоза — около часа. Рост клетки происходит во время всех фаз, исключая митоз. G1 и G2 — не просто временная задержка, позволяющая синтезировать необходимые вещества. Эти фазы обеспечивают возможность клетке проконтролировать состояние окружающей среды и внутриклеточных систем, чтобы понять, насколько все готово для такой глобальной перестройки, как деление. Особенно важна в этом отношении фаза G1. Ее длительность может меняться очень сильно в зависимости от внешних условий и сигналов, поступающих от других клеток. Если внеклеточные условия неблагоприятны, клетка задерживается в фазе G1 и даже может перейти в специальную фазу ожидания — G0, в которой способна оставаться многие дни и даже годы, прежде чем возобновятся клеточные деления. Многие клетки в нашем организме постоянно пребывают в фазе G0 до своей смерти или даже смерти организма. Если внеклеточные условия становятся благоприятными для деления или в начале G1 приходят специальные сигналы, предписывающие его возобновление, клетка проходит всю эту фазу, в конце которой предстоит выбор между остановкой и переходом в фазу S. Этот момент принято называть стартом. После него клетка начинает удвоение ДНК, даже если в окружающей среде уже нет специальных сигналов. Так что деление, в которое вовлечены тысячи разных процессов, должно быть строго организовано и во времени, и в пространстве.

Как же координируются клеточные процессы? Этот вопрос занимал биологов не менее сотни лет. Только в последние два десятилетия были сделаны открытия, благодаря которым пришло понимание механизмов этой координации.

Мы очень поверхностно прошли по событиям, связанным с делением клетки. Собранную коллекцию вопросов способен задать любой школьник, а ответить не могла вся наука более столетия. И сегодня, когда знания в этой области фантастически умножились, на эти вопросы все еще не так легко ответить. Чтобы осветить каждый из них, необходимо довольно развернуто изложить представления о множестве молекулярных процессов. Но и тогда это будет поверхностное знание того, как клетка решает свои проблемы. Конечно, на все заданные вопросы невозможно ответить в одной популярной статье. Поэтому мы ограничимся рассмотрением только одного:

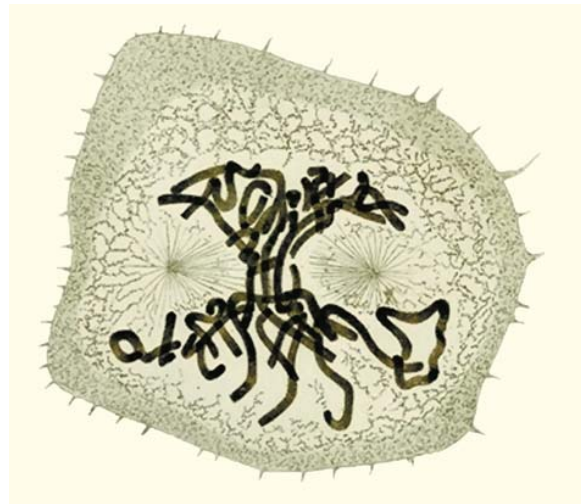


Рис.1. Клетка в процессе митотического деления, какой ее увидел и зарисовал У.Флеминг. Отчетливо видны два центра, образованные пучками тонких линий, между которыми находятся толстые червеобразные образования, позже названные хромосомами.

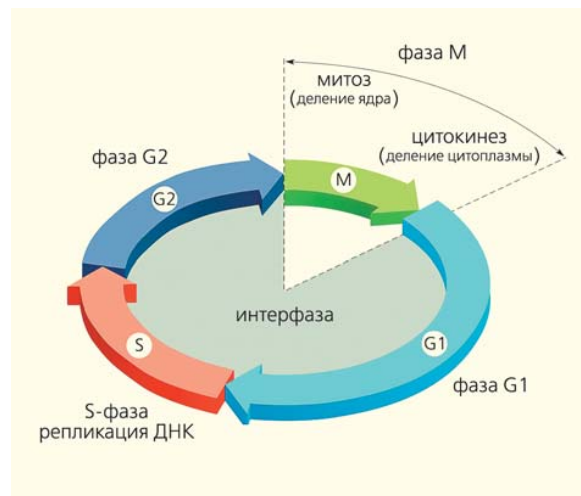


Рис.2. Фазы клеточного цикла.

Как координируются клеточные процессы?

Каковы механизмы, контролирующие и регулирующие многообразие процессов, происходящих в ходе деления клетки? Это занимает умы ученых с тех пор, как они обнаружили, что клетки умеют делиться. Очень давно, более 150 лет назад, возникли две умозрительные гипотезы регуляции клеточного цикла — «домино» и «часов».

По первой гипотезе клеточный цикл представляет собой последовательность процессов, каждый из которых по завершении запускает следующий, тот — следующий и т.д., пока весь цикл не завершится (рис.3). Так ведут себя костяшки домино,

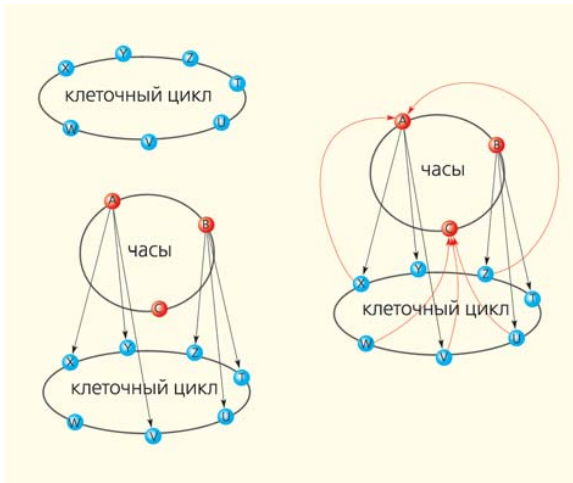


Рис.3. Схематическое изображение смысла гипотезы «домино» (вверху слева) и гипотезы «часов». По гипотезе «домино» фазы клеточного цикла — это череда последовательных событий (обозначены латинскими буквами), где каждое предыдущее событие запускает следующее, и для их управления, как предполагалось, не нужны никакие специальные процессы. В гипотезе «часов» помимо фаз самого цикла происходят некоторые реакции, протекающие циклически, как часы. Они идут автономно и в определенные моменты выдают сигналы, запускающие те или иные процессы в клетке: здесь сигналы от А запускают реакции V, X и Y, а от В — T, U и Z. В действительности оказалось, что «часы» есть, но ход их относительно автономен (правый рис.). События клеточного цикла могут притормаживать ход «часов» (красные стрелки), если какой-то процесс не успел закончиться вовремя.

поставленные на попа в ряд: падение одной приводит к последовательному падению всего ряда.

По второй гипотезе в клетке существует некая биохимическая колебательная система реакций — «часы». Эти реакции протекают довольно автономно, отсчитывая «время». Они запускают в нужные моменты разные процессы, обеспечивая их правильную очередность (см. рис.3).

Основное различие между этими гипотезами в том, что в «домино» почти все события клеточного цикла вовлечены в формирование его периодичности, а в «часах» есть специальные реакции, предназначенные для генерации колебаний. Многие годы экспериментаторы безуспешно пытались найти биохимические реакции, выполняющие роль «часов». Теоретики же анализировали умозрительные схемы и существующие в клетке системы реакций, пытаясь понять, не служит ли какая-нибудь из них теми самыми «часами». Но чем больше узнавали о разных стадиях и процессах клеточного цикла, тем больше обнаруживалось связей между процессами. Разумно было рассматривать эти данные, как подтверждение гипотезы «домино». Но...

Открытие циклинов. Оно было сделано в начале 70-х годов и стало сильным аргументом в пользу гипотезы «часов». Начался новый этап в исследовании механизмов, управляющих клеточным циклом. При исследовании процессов созревания икринок шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) был обнаружен фактор, контролирующий начало митоза и прохождение через мейоз (деление ядра эукариотической клетки с уменьшением числа хромосом в два раза). Надо сказать, созревание, а потом и первые 10–12 делений икринки — очень удобный объект для исследования клеточного цикла вообще.

Поскольку первые деления идут синхронно, «как часы», можно работать с зародышем как с одной клеткой. В ходе этих делений многие процессы, обычные для клеточного цикла, не идут — клетки синтезируют только тот минимум, который нужен для удвоения хромосом и создания перегородки. Практически клеточный цикл редуцирован до митоза и S-фазы. Деления идут автономно, поскольку все необходимое в них есть. Икринка делится, не меняя своего объема. Просто ее содержимое разделяется перегородками, сначала на две клетки, потом каждая из половин — еще на две и т.д.

Икринки — это очень большие клетки, достигающие 1 мм в диаметре, и потому уникально удобные для биологических исследований и манипуляций. Вот на такой модели в опытах по переносу цитоплазмы из одной икринки в другую, находящуюся на иной стадии развития, было обнаружено, что цитоплазма зрелой икринки — ооцита — способна стимулировать созревание незрелых клеток. Фактор, ответственный за стимуляцию, назвали maturation promoting factor (MPF) — фактор, стимулирующий созревание. Позже выяснилось, что он определяет и начало митоза, фазы, в которой происходит разделение хромосом, причем не только в ооцитах, но и в других клетках.

Активность MPF в ходе первых синхронных делений икринки непостоянна, она колеблется с периодом, равным периоду делений (рис.4). Из этого еще не следует, что именно MPF определяет цикличность процесса. Многие параметры клетки, например количество ДНК, тоже колеблются, и тоже с тем же периодом. Однако оказалось, что можно заблокировать синтез ДНК, а колебания активности MPF будут продолжаться. Блокировка образования митотического веретена и разделения хромосом также не влияют на способность цитоплазмы стимулировать другие клетки к митозу (активность MPF будет продолжать колебаться с теми же периодом и амплитудой). Так был открыт процесс, который, как сейчас ясно, играет роль «клеточных часов» — «отсчитывает время» и запускает те или иные процессы клеточного цикла в «нужный» момент. Гипотеза «клеточных часов» получила мощное подтверждение.

В начале 80-х годов произошло еще одно важное открытие, сильно повлиявшее на понимание

механизма работы «часов». Т.Хант предложил группе студентов учебную задачу: исследовать, как меняется содержание разных белков в ходе развития зародышей морского ежа (они очень похожи на развивающиеся икринки лягушки). Студенты обнаружили, что содержание почти всех белков медленно растет. Но в одной из фракций концентрация белка резко падала во время митоза, а потом линейно росла до исходного уровня в течение всего клеточного цикла (см. рис.4). Естественно, что такой белок получил название циклин. Позже выяснили, что он входит в состав MPF.

В те же 70–80-е годы две группы генетиков — Р.Нерса и Л.Хартвелла — активно исследовали мутанты дрожжей *Saccharomyces pombe*, у которых был затруднен митоз. Эти исследования привели к открытию большинства белков, в том числе MPF, определяющих работу «клеточных часов». Один из этих белков оказался протеинкиназой — ферментом CDK2 (cyclin dependent kinase — зависящая от циклина киназа), который вместе с циклином образует MPF. Выяснилось, что практически все белки (циклины) этой важной клеточной системы очень консервативны — они взаимозаменяемы у эволюционно далеко отстоящих друг от друга видов, таких как человек и дрожжи. В 2001 г. Л.Хартвелл, Т.Хант и Р.Нерс были удостоены Нобелевской премии «за открытие ключевых регуляторов клеточного цикла».

Как устроены «клеточные часы». В центре образующего их процесса находится комплекс двух белков — фермента протеинкиназы CDK2 и циклина. Это и есть MPF — фактор, управляющий клеточным циклом. Протеинкиназы осуществляют химическую модификацию — ковалентно присоединяют фосфатную группу к определенным белкам. (Это один из самых распространенных способов управления активностью белков, он лежит в основе регуляции многих внутриклеточных процессов.) Второй белок комплекса MPF — циклин — служит регуляторной субъединицей.

Сначала синтезируется циклин — примерно с постоянной скоростью. Затем он соединяется с белком CDK2 (сам по себе он нефункционален и всегда присутствует в клетке), и образуется комплекс MPF, сначала тоже неактивный. Для обретения активности он должен быть профосфорилирован. Происходит это за счет автокатализа, осуществляемого самой CDK2, у которой после связывания с циклином меняется конформация и появляется киназная активность. CDK2 может фосфорилироваться в нескольких местах, но только модификация одной аминокислоты — треонина (Т) — приводит к активации MPF (рис.5). Существуют еще две реакции, которые фосфорилируют-дефосфорилируют возникший комплекс. Протеинкиназа WEE1 тоже переносит фосфатную группу на CDK2, но в другом месте — Y, и тогда MPF становится неактивным независимо от того, фосфорилирован или нет участок Т. Этот блокирую-

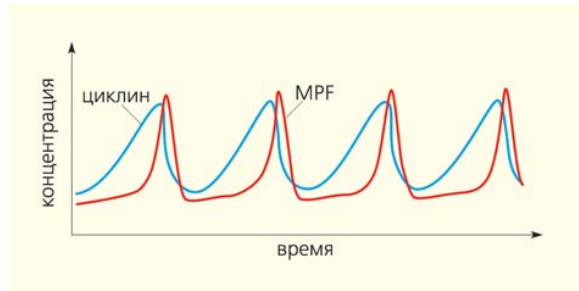


Рис.4. Колебания концентраций циклина и MPF во времени. По завершении предыдущего цикла концентрация циклина нарастает примерно с постоянной скоростью (левая часть кривой). Концентрация MPF довольно долго увеличивается незначительно (почти весь образующийся комплекс «уходит» в неактивную форму из-за фосфорилирования киназой WEE1), а потом быстро нарастает. Когда начинается митоз, концентрации циклина, и MPF быстро падают.

щий эффект снимается другим ферментом — фосфатазой CDC25, которая специфически отщепляет фосфат от участка Y. Сначала активный MPF образуется очень медленно, но при этом сильно стимулирует собственную активацию (см. рис.5). Какой из этих двух процессов будет преобладать, сказать трудно, в разных организмах это бывает по-разному. Важно, что MPF способен ускорять

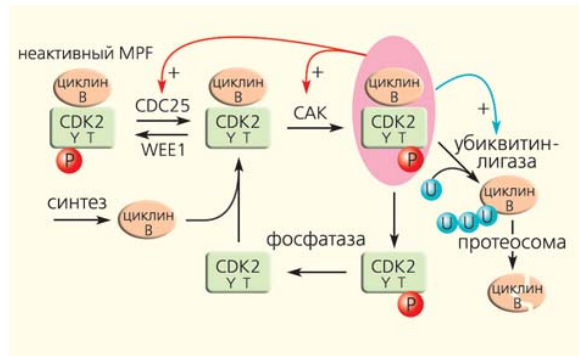


Рис.5. Устройство «клеточных часов». Каждый цикл начинается с синтеза нового циклина В, который связывается с киназой CDK2, после чего она может быть фосфорилирована в двух местах (Т и Y), каждое своей киназой. Результат их работы прямо противоположен: киназа WEE1 делает комплекс MPF неактивным, а киназа CAK активирует его, и комплекс фосфорилирует многие белки клеточного цикла. Это приводит к началу митоза. Неактивную киназу CDK2, фосфорилированную по участку Y, «спасает» фосфатаза CDC25, отщепляя фосфат. Когда концентрация MPF становится высокой, фермент убиквитин-лигаза присоединяет к циклину цепочку из нескольких молекул белка убиквитина (U). Эта «черная метка» служит сигналом для протеасомы — она разрушает циклин. Его концентрация, а вместе с ним и MPF, падает до нуля. От CDK2 отщепляются все фосфаты, и «часы» завершают полный цикл.

собственную активацию — одно из главных условий биологического или химического генератора. Итак, функциональный МРФ образовался, после чего его активность нарастает нелинейно, ускоряясь со временем.

Следующий ход «часов» связан с работой протеосомы — специализированной внутриклеточной «гильотины» — «машинки», которая избирательно разрушает внутриклеточные белки. Специальные ферменты распознают циклин в комплексе МРФ и присоединяют к нему убиквитин, небольшой белок, исполняющий роль метки на «жертве». Помеченный циклин разрушается протеосомой (см. рис.5). Происходит это только при достижении довольно высокой активности МРФ в клетке, причем процесс «ликвидации» циклина усиливается самим этим комплексом и идет быстро. В результате количество циклина резко уменьшается, а с ним падает и активность МРФ (см. рис.4). Освободившаяся CDK2 дефосфорилируется и возвращается в исходное состояние. Все начинается снова. В действительности в этом циклически работающем механизме нельзя выделить начало или конец. Процесс идет периодически, и одна фаза сменяет другую.

Особенности колебаний в биологии и химии. В этом отступлении, написанном для любителей физики, мы проанализируем сходство и различие «часов», точнее, колебательных процессов разной природы: механических, химических, биологических. Главку можно читать автономно или не читать совсем — это не помешает восприятию последующего материала.

Когда речь заходит о колебательных процессах, видимо, почти у каждого человека возникает образ маятника. И в самом деле, это простое устройство сыграло огромную роль в науке. Идеальный маятник, или, как говорят физики, гармонический осциллятор, до сих пор служит одной из основных моделей, лежащих в основе физической науки. Многие попытки понять природу колебательных процессов в биологии были связаны с поисками тех элементарных, простейших, «маятников», которые работают в живом мире. Попытки эти продолжаются до сих пор. Но в 1960—1970-х годах произошло осознание того, что в основе колебаний, наблюдаемых в биологических и химических системах, лежат осцилляторы, мало похожие на маятник. Прежде чем представить основные свойства таких осцилляторов, попытаемся понять, почему идеальный маятник оказывается столь притягательным при описании колебаний. Чтобы они продолжались долго, нужно тратить на их поддержание энергию. А она должна поступать определенным образом, циклически. Маятник достаточно подталкивать один раз за период в конкретной фазе, чтобы колебания не затухали. Именно так раскачивают качели. Очень нехитрое устройство, называемое анкерным механизмом, делает это же с маятником в механических часах.

Реальные физические маятники обычно работают в воздухе — среде достаточно разреженной. Что произойдет, если такой маятник поместить в воду? (Заметим: все биологические процессы протекают в жидкой среде — цитоплазме.) Его колебания будут затухать очень быстро, а чаще всего маятник не сможет сделать и одного колебания. Такие системы называют релаксационными, а не колебательными. Они очень быстро рассеивают энергию. Этот грубый образ очень сходно передает то, что повсеместно наблюдается в биологии и химии: подавляющее большинство процессов в них — релаксационные. Можно ли сделать часы без колебательных элементов, используя только релаксационные? Да, можно. Примеры тому есть в технике. Например, водяные часы, конструкция которых восходит к древним грекам. В сосуд медленно течет вода, пока он не заполнится. Затем он быстро опорожняется, например через сифон, и процесс начинается снова. В релаксационных часах придется тратить больше энергии на поддержание колебаний, чем в гармоническом осцилляторе.

В 1960—1970-х годах были детально изучены первые химические и биологические колебательные системы и выяснены механизмы колебаний. Стали ясны закономерности, лежащие в основе работы этих систем. Практически во всех хорошо изученных на сегодня колебательных процессах, протекающих в таких конденсированных средах, как вода, можно обнаружить два главных признака:

- положительную обратную связь (как минимум одну);
- торможение.

В химических процессах можно обеспечить положительную обратную связь простейшим способом — за счет автокаталитической стадии. Торможение же создается наличием в системе ингибитора — вещества, останавливающего процесс, которое должно производиться в его ходе.

Установление этих простых на первый взгляд правил заняло более полувека и составляет одну из наиболее драматических страниц науки XX в. Первые химические колебательные системы открыты на рубеже 19-го и 20-го столетий, но тогдашней теоретической физикой были объявлены вне закона, поскольку якобы противоречили термодинамике. И только в 1960-х годах это заблуждение рассеялось — в немалой степени благодаря работам русских ученых: Б.П.Белоусова, А.М.Жаботинского и А.Н.Заикина.

Первая биологическая модель простейшей колебательной системы придумана и исследована уже более 100 лет назад. И называется она моделью Лотки (по имени автора) или моделью «хищник—жертва». Пример тому, скажем, — система зайцы—волки в одном изолированном ареале. Для популяции зайцев количество корма здесь ограничено. Вероятность их размножения пропорциональна численности, что и приносит в систе-

му нужную положительную обратную связь. Количество волков, которые питаются зайцами, пропорционально численности последних. Это и есть тормозящий фактор. В такой модели число зайцев и волков будет постоянно и сильно колебаться во времени.

Особенность релаксационных колебаний в том, что их форма нередко мало похожа на синусоиду. Кривая колебаний в некоторых местах претерпевает излом, как будто один процесс сменяется другим. И действительно, смена активации на торможение часто происходит довольно резко.

Можно ли применить требования, предъявляемые к колебательным процессам в конденсированных средах, к «клеточным часам»? Способность комплекса MPF сильно активировать собственное производство — это типичная положительная обратная связь, настоящая автокатализ с химической точки зрения. Однако торможение, т.е. образование ингибитора, не просматривается так прямо. Циклин инактивируется протеосомой, но она не возникает в процессе работы «часов». Однако синтез белков убиквитинов, которыми метятся циклины, стимулируется комплексом MPF. Таким образом активный фактор «клеточных часов» включает сам себя. Следовательно, выполняется и второе требование. Выходит, «клеточные часы» — типичный химический осциллятор.

Интересная особенность «часов» с точки зрения теории динамических систем — существование упомянутого уже специального места фосфорилирования (позиция Y) каталитической субъединицы CDK2 (см. рис.5). Даже если она фосфорилирована по аминокислоте T, при переносе фосфата еще и на тирозин (Y) комплекс MPF теряет активность. Два фермента — WEE1 и CDC25 — контролируют, какая часть комплекса уходит в неактивное состояние. Зачем это нужно? В 1960—1970-х годах, задолго до открытия циклинов и CDK2, Е.Е.Сельков теоретически изучал возможные принципы устройства биохимических колебательных систем. Он задался вопросом: как управлять периодом системы, в которой реакции идут попеременно, циклически сменяя друг друга? Селькову удалось показать, что, меняя соотношение активной и неактивной форм веществ, участвующих в колебаниях, можно легко изменять период колебаний. Ферменты WEE1 и CDC25 как раз и создают такую пару форм. Следовательно, «клеточные часы» устроены в строгом соответствии с простейшими требованиями к колебательным химическим реакциям. Интересно, что ученые, открывшие циклины и CDK2 и расшифровавшие механизм «клеточных часов», ничего не знали о перипетиях теоретических представлений о колебательных процессах в химии и биологии.

Взаимодействие «клеточных часов» с другими процессами клеточного цикла. Вопрос о взаимоотношениях очень интересен. «Часы» должны запускать определенные процессы в конкретные

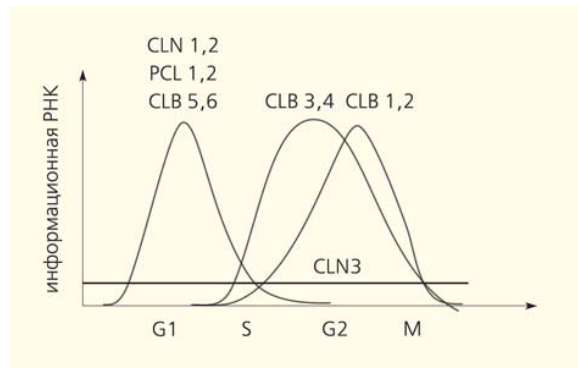


Рис.6. График, отображающий изменение концентрации информационных РНК, кодирующих разные циклины в разные фазы клеточного цикла в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. По сути этот график отражает содержание циклинов. Концентрация только одного из них — CLN3 — постоянна, но в зависимости от фазы клеточного цикла сильно меняется скорость его деградации, что и делает этот белок циклином.

моменты времени. MPF, как упоминалось, фосфорилирует разные белки в клетке, запуская тем самым разные процессы. Приведем пример. Для начала митоза нужно, чтобы распалась оболочка клеточного ядра, чему и способствует MPF. Он фосфорилирует один из белков ядерной мембраны — ламинин В, — молекулы которого перестают связываться друг с другом, и оболочка распадается. Это, может быть, самый простой пример того, как клеточный «осциллятор» запускает другие процессы. Но механизмы его действия еще очень мало изучены, более того, пока даже неясно, все ли процессы в клеточном цикле запускаются рассмотренным «осциллятором».

Может быть, в клетке существует несколько «осцилляторов» («клеточных часов») и каждый управляет своей фазой клеточного цикла? Для положительного ответа, казалось бы, есть основания. Сегодня уже известно множество разных циклинов — регуляторных субъединиц в комплексе MPF. В дрожжевой клетке *Saccharomyces cerevisiae* их 22 и пять различающихся между собой CDK, активность которых обусловлена этими циклинами. Концентрации многих из них сильно меняются во времени, описывая периодические колебания, и достигают максимума в разные фазы клеточного цикла (рис.6). Может, в дрожжевой клетке существует пять несходных «часов»? Это не так. «Часов» не должно быть много — из-за проблем с синхронизацией их работы. Если разные часы запускают разные фазы цикла и идут с несколько отличающейся скоростью (далее будет видно, что биологические «часы» не очень стремятся точно мерить время), правильное следование фаз быстро нарушится. Концентрации многих циклинов не могут колебаться автономно, так как зависят от MPF или других киназ. Возможно, некоторые циклины иг-

рают роль фазосогласующих устройств или вызывают «временные задержки», обеспечивая наступление разных событий, каждое в свое время.

Далеко не всегда условия, в которых находятся клетки, позволяют им вести себя так, как это происходит на ранних стадиях развития зародыша. Клетки должны реагировать на многие события в окружающей их среде и в самой клетке. Это могут быть разнообразные повреждающие воздействия, нехватка питательных веществ и т.д., и т.д. В результате какие-то внутриклеточные процессы пойдут медленнее или быстрее, нарушится их синхронизация и клетка погибнет. Например, при повреждении ДНК клетка не должна начинать деление до тех пор, пока дефект не будет устранен, иначе дочерние клетки не получат полноценных хромосом и погибнут. Или другой пример: если в среде обитания, скажем, дрожжей, кончились питательные вещества, клетки не просто останавливают деление, они создают споры, которые могут храниться длительное время. Значит, не всегда клетки порождают себе подобные. Наиболее впечатляющий пример — возникновение многоклеточного организма из единственной зародышевой клетки. И, наконец, даже в самых прекрасных условиях клетка многоклеточного организма должна уметь остановиться и прекратить деления навсегда. Когда такой контроль за клеточными делениями утрачивается, возникает рак — некоторые клетки начинают бесконтрольно размножаться, приводя в конце концов весь организм к гибели.

Управление работой часов — контрольные точки. Как осуществляется контроль над выполнением приказов, поступающих от «часов» к исполнительным механизмам? Очевидно, что в клетке должны быть обратные связи от этих механизмов к «часам», способные влиять на их работу. Такие связи есть, и их множество. Действие их на «часы» приурочено к определенным фазам клеточного цикла. В каких-то из них клетка ждет поступления сигналов об успешном завершении предыдущих стадий, прежде чем начать следующую фазу. Обычно сигнал приходит раньше, так что в нормально протекающем клеточном цикле ничего ждать не приходится. Все идет «по часам». Но если какой-то процесс оказался сильно заторможен, «часы» остановятся. Это может произойти в контрольных точках (checkpoints). Отметим некоторые из них, наиболее важные.

Старт — момент в клеточном цикле перед началом синтеза новой ДНК. В это время проверяется, например, выросла ли клетка до нужного размера и начинать ли ей новый цикл или остановиться. Тогда же действуют и многие внешние сигналы, например ростовые факторы, гормоны.

Сложный и очень важный этап деления клетки — митоз: нужно точно разделить удвоенные хромосомы. Многие процессы, ответственные за разделение, могут задержать начало митоза или его протекание. Считается, что существуют веще-

ства, появление (или исчезновение) которых служит сигналом для задержки митоза. Такие сигналы вырабатывает, например, система репарации ДНК. Перед тем как начать митоз, клетка проверяет, все ли для этого готово. Есть контрольные точки и в середине митоза. Благодаря им «часы» могут идти не очень точно. Клетке не так уж важно астрономическое время. Гораздо важнее выполнить все максимально качественно, если даже на это уйдет несколько больше времени. Сигналы, связанные с контрольными точками, не абсолютные. Клетка ждет какое-то время (примерно длительность одного клеточного цикла), а потом все же начинает двигаться дальше по клеточному циклу, хотя часто при этом гибнет.

Каковы молекулярные механизмы, обеспечивающие контроль работы «часов»? Они очень похожи на тот, что работает в самих часах. Как уже сказано, активность CDK2 регулируется фосфорилированием и дефосфорилированием определенных мест в этом ферменте. Совершенно так же другие ферменты, участвующие в работе «часов», — WEE1-киназа и CDC25-фосфатаза — выполняют свои функции, каждая на своем месте. Именно так реализуется петля положительной обратной связи от MPF к CDC25. Активность обоих этих ферментов тоже могут менять другие киназы. Так, если «выключить» CDC25, клеточный цикл затормозится, ибо не будет образовываться функциональный MPF. Все внутриклеточные процессы буквально пронизаны цепями и каскадами фосфорилирования и дефосфорилирования, благодаря чему действуют «информационные» сети управления в клетке. (Внутриклеточная сигнализация — сама по себе интереснейшая тема для обсуждения, но в отдельной статье.) Клетка использует для управления не только реакции фосфорилирования и дефосфорилирования. Например, еще существуют специальные белки-ингибиторы, которые регулируют клеточный цикл, прямо связываясь с циклинами или другими белками управляющей системы.

* * *

Какая же гипотеза правильна — «часов» или «домино»? Строго говоря, ни та, ни другая. «Часы» безусловно есть. Но наличие обратных связей (см. рис.3) сильно меняет дело — «часы» становятся «умными», но при этом перестают быть часами в полном смысле этого слова. Они могут «замедлить» ход времени, если клетка не успевает что-то сделать. Их можно вообще остановить, выведя клетку из череды бесконечных делений, а потом, когда нужно, включить. Похоже, это самый простой и действенный способ остановить клеточный цикл, не вызвав необратимых нарушений и гибели клетки.

Сейчас очень много известно о клеточном цикле. Но исследователям еще есть над чем работать, ведь в него вовлечены тысячи молекулярных процессов. ■