

УДК 577.31 + 577.171.53

ХИМИКО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕХАНИЗМА СПЕЦИАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК

М. В. Фок

Показано, что при специализации клеток решающую роль играет не абсолютная величина активности фермента, а разность активностей двух ферментов, конкурирующих за общий субстрат. Рассмотрены цепочки обратных связей, поддерживающие специализацию, а также возможности регуляции деятельности клетки.

То, что специализированные клетки всех органов содержат одну и ту же информацию в своих генах, известно давно. Не менее давно известно и то, что клетки каждой ткани синтезируют некоторые вещества, свойственные только ткани данного вида. Однако биохимический механизм такой избирательности синтеза до сих пор остается неясным. Ясно лишь, что сведения о том, какое именно специфическое вещество должна синтезировать данная клетка, не могут быть заложены в геноме, ибо, как известно, информация сама себя не создает, а геном во всех клетках данного организма один и тот же. Но если эти сведения не в геноме, то где?

Первое, что бросается в глаза – это различие в величине трансмембранной разности электростатических потенциалов в разных клетках. Поскольку в цитоплазматических мембранах нет протонных насосов, а их проницаемость для протонов велика, эта разность потенциалов задает отношение концентраций водородных ионов по обе стороны мембраны, т.е. величину разности pH между межклеточной жидкостью и цитоплазмой (ΔpH). Самая большая трансмембранная разность потенциалов – у клеток печени (около 120 мВ), а самая малая – у деоксигенированных эритроцитов (8 мВ). Величины ΔpH равны соответственно 2 и 0.17. Но pH межклеточной жидкости, а также и плазмы крови, во всех органах приблизительно одинаковы, так что различаться должны pH цитоплазмы. Может показаться, что поскольку активность любого фермента зависит от pH , то каждый из них будет активен лишь при pH , характерном для цитоплазмы клеток только одного органа и неактивен в клетках всех других органов. Однако

в действительности эта зависимость не может сама по себе обеспечить наблюдаемую на опыте избирательность синтеза тех или иных молекул, ибо она недостаточна резкая. Даже в самом благоприятном случае, т.е. при наиболее резкой теоретически возможной зависимости активности фермента от pH , если максимум его активности приходится на середину физиологического диапазона pH , то на границах диапазона остается 24% активности (рис. 1). Это значит, что фермент работает во всем физиологическом диапазоне pH и соответствующее вещество синтезируется во всех клетках. Даже если максимум активности фермента лежит вне этого диапазона, а на его границу приходится наиболее крутой участок характеристики фермента, то на противоположном краю диапазона его активность будет всего в 50 раз меньше. В середине же диапазона его активность будет отличаться лишь в 7 раз от активности на краях (т.е. будет в 7 раз больше, чем на одном краю и в 7 раз меньше, чем на другом). Ясно, что это может, и то с натяжкой, обеспечить выбор только между двумя веществами, одно из которых интенсивно синтезируется при pH , соответствующем одному краю диапазона, а другое (другим ферментом) – при pH , соответствующем другому краю. В действительности же избирательность синтеза в сотни раз больше, ибо в организме имеется более двухсот разных специализированных клеток, отличающихся друг от друга, в частности, и тем, какие вещества в них синтезируются. В чем же дело? В более сложном молекулярном механизме влияния pH ? В каком-то другом механизме, не связанном с pH ? Или и в том и в другом одновременно?

Как будет видно из дальнейшего, справедливо последнее – весьма существенную роль играет зависимость активности ферментов от pH , но не менее важна и роль других факторов, например, соотношения концентраций разных молекул с макроэргическими связями (макроэргов).

Начнем с зависимости от pH . Рассмотрим следующий пример. Допустим, что в цитоплазме имеется два фермента Φ_A и Φ_B , максимумы активности которых расположены приблизительно симметрично относительно физиологического диапазона pH , причем они "питаются" одним и тем же субстратом, но фермент Φ_A обеспечивает синтез вещества A , а фермент Φ_B – вещества B . Допустим также, что молекулы A и B химически активны и образуют прочное соединение AB . Очевидно, что при таком условии в том интервале pH , где преобладает синтез молекул A , концентрация свободных молекул B будет близка к нулю, ибо они почти тотчас после возникновения соединяются с A . В другой половине диапазона pH малой будет концентрация A . В середине же, при том pH , при котором активности обоих ферментов одинаковы, в цитоплазме будет очень

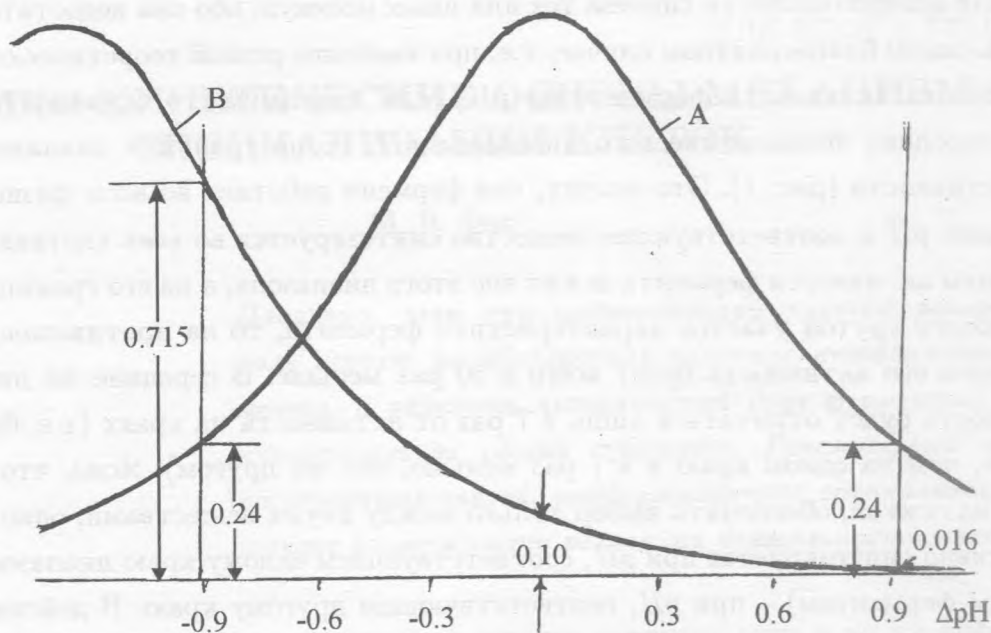


Рис. 1. Возможное изменение активности фермента в пределах физиологического диапазона pH (границы диапазона отмечены вертикальными линиями). A — максимум активности в середине диапазона, B — максимум вне физиологического диапазона; на краю диапазона — максимум крутизны изменения активности. Числа между стрелками — относительная величина активности (максимальная активность принята за 1).

мало как A, так и B, но зато будут в наибольшем количестве молекулы AB (рис. 2а).

Если в цитоплазме есть еще две пары ферментов, причем A служит общим субстратом для одной пары, а B — для другой, то ситуация, подобная описанной, возможна в каждой половине диапазона pH (т. е. при тех pH, когда в цитоплазме есть A, но почти нет B, или есть B, но почти нет A. Тогда физиологический диапазон pH разделится на 4 интервала, для каждого из которых характерно присутствие в цитоплазме некоторых определенных молекул, практически отсутствующих в ней, если pH лежит вне этого интервала (рис. 2б). Причем это получается несмотря на то, что набор ферментов во всех клетках один и тот же.

Заметим еще, что эти специфические вещества могут влиять на считывание информации с ДНК, а значит, и на синтез белков в рибосомах. В частности, они могут усиливать синтез тех самых ферментов, которые ответственны за появление в цитоплазме их самих. Так замыкается цепочка положительной обратной связи, обеспечивающая

преимущественный синтез тех ферментов, которые отличают клетки данной "специальности" от клеток других "специальностей".

Казалось бы, подобное деление пополам интервалов pH может быть повторено в организме любое число раз и каждый раз количество интервалов pH будет удваиваться. Если бы таких ступеней увеличения избирательности синтеза было 8, то отдельных интервалов pH хватило бы на все виды специализированных клеток. Однако pH цитоплазмы стабилизируется не так строго. Абсолютно строгой стабилизации вообще не бывает, а клетки, к тому же, могут изменять свое физиологическое состояние, что отнюдь не способствует стабилизации pH . В то же время, выход pH цитоплазмы из допустимого для данной клетки интервала грозит ей деспециализацией. В организме она, конечно, надежно защищена от этого бедствия. Очевидно, что для этого необходимо, чтобы допустимый интервал pH был заметно шире того интервала, в котором в норме колеблется величина pH данной клетки. Опыт показывает, что в норме pH цитоплазмы в каждой клетке отклоняется от своего среднего значения не более, чем на ± 0.1 . Это видно, например, из того, что при уменьшении pH крови на 0.2 человек погибает через несколько часов, если не принять срочных мер по защелачиванию крови, а при стойком уменьшении на 0.1 он может жить сравнительно долго, хотя и в этом случае защелачивать кровь необходимо. Поэтому можно думать, что в организме минимальная величина допустимого интервала pH равна $0.1 \times 2 = 0.2$. Отсюда следует, что возможны лишь три ступени дискриминации по pH , обеспечивающие повышение избирательности синтеза. Уже на третьей ступени допустимый интервал становится меньше 0.3 (рис. 2в).

Три ступени дискриминации по pH могут обеспечить не более $2^3 = 8$ "специальностей" клеток. В действительности же их во много раз больше. Это значит, что существуют и другие пути повышения избирательности. В частности, возможна дискриминация не только по pH , но и по соотношению концентраций разных молекул с макроэргическими связями (макроэргов). Например, если превращение A в C катализирует фермент, использующий ATP , а превращение A в D — фермент, использующий $NAD-H$, то в зависимости от того, каких молекул, ATP или $NAD-H$ будет в цитоплазме больше, в ней будет преобладать синтез молекул C или D . А дальше все пойдет по уже описанной схеме — молекулы C и D будут соединяться друг с другом, образуя прочное соединение CD , и в цитоплазме останутся либо молекулы C либо D . Такой механизм мало зависит от pH . Поэтому соотношение концентраций ATP и $NAD-H$ может сыграть аналогичную роль в любом интервале pH , так что дискриминация по макроэргам может

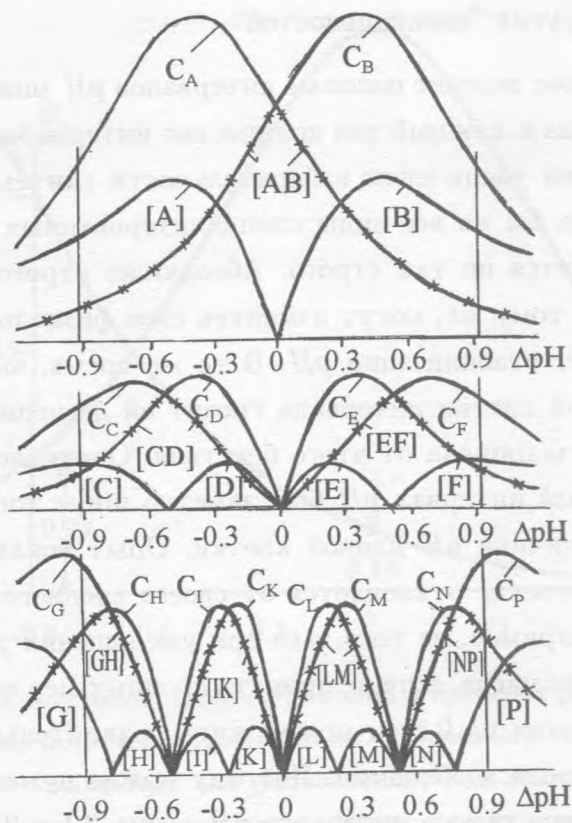


Рис. 2. Три последовательные ступени разностного повышения избирательности синтеза при дискриминации по рН. C_A, C_B, \dots, C_P – зависимости от рН скорости синтеза молекул A, B, \dots, P ; $[A], [B], \dots, [P]$ – концентрации этих молекул; $[AB], [CD], \dots, [NP]$ – зависимости от рН концентраций сложных молекул, AB, CD, \dots, NP . Вертикальными линиями отмечены границы физиологического диапазона. На нижнем графике масштаб по оси ординат увеличен в три раза по сравнению с двумя верхними.

включаться между двумя ступенями дискриминации по рН при любом значении рН. Здесь возможно множество вариантов. Кроме упомянутых макроэргов ту же роль могут играть и другие. В общей сложности таких независимых пар макроэргов может быть 6. Каждая пара обеспечивает одну ступень повышения избирательности (т. е. удвоение числа видов специализированных клеток). Дискриминация по макроэргам может происходить между первой и второй ступенями дискриминации по рН, между второй и третьей или между ними обеими, а также и после третьей ступени. Она может быть во всем физиологическом диапазоне рН или только в какой-то его части. Возможна также дискриминация по соотношению концентраций еще каких-нибудь веществ. Главное

здесь не то, какие именно вещества используются в том или ином случае, а сам разностный принцип дискриминации – два вида молекул синтезируются одновременно, но в цитоплазме остаются лишь те молекулы, которых синтезируется больше. Это обеспечивает строгую специализацию клеток и одновременно большое их разнообразие. Даже совокупность дискриминации по pH и по макроэргам дает столько комбинаций, что может с большим запасом обеспечить избирательность синтеза в специализированных клетках всех известных видов при одном и том же наборе ферментов. Достаточно лишь задать интервалы значений pH и отношений концентраций макроэргов в каждой паре.

Цепочка обратных связей, обеспечивающая стабилизацию pH , довольно сложна. Она включает работу ионных насосов, которая направлена на повышение трансмембранной разности потенциалов, т.е. на понижение pH , и окислительные процессы, которые, с одной стороны, поставляют в цитоплазму макроэрги, необходимые, в том числе для работы ионных насосов, а с другой – приводят к появлению в цитоплазме дополнительных ионов водорода, что тоже понижает pH . Отрицательная обратная связь здесь возможна, если снижение pH уменьшает скорость синтеза тех макроэргов, которые нужны для работы ионных насосов. Ей помогает диффузия ионов водорода наружу, как только их концентрация превысит равновесную, соответствующую имеющейся в данный момент трансмембранной разности потенциалов.

Как работает эта цепочка в каждом конкретном случае, мы рассматривать не будем, прежде всего, из-за недостатка соответствующих экспериментальных данных. Мы примем просто, что, как показывает опыт, в клетках застабилизированы как pH , так и концентрации макроэргов.

О положительной обратной связи, поддерживающей высокую концентрацию нужных для специализированной клетки ферментов, мы уже говорили. Заметим еще, что ферменты, "безработные" из-за отсутствия субстратов, специфичных для клеток других "специальностей", не имеют такой цепочки обратных связей, поддерживающей их высокую концентрацию. Это биологически целесообразно – незачем тратить макроэрги на синтез ненужных клетке молекул.

Следует также иметь в виду, что в каждой клетке, помимо специфичного для нее вещества, имеются и те, которые синтезируются при тех же условиях из его предшественников. Например, как видно из рис. 2, в клетке, у которой $-0.3 < pH < 0$, помимо молекул K , есть еще и IK , D , CD , A , и AB , причем, в концентрациях, сравнимых с концентрацией K . Кроме того, есть, но в значительно меньшей концентрации, и молекулы I , которые синтезируются почти с такой же скоростью, что и K , но быстро

исчезают, соединившись с K . Остальные вещества, если и присутствуют, то в очень малых концентрациях, но многие из них тоже нужны клетке. Например, молекулы актина и миозина есть не только в мышечных, но и в других клетках. Их там на несколько порядков меньше, но они необходимы, ибо образуют в них цитоскелет. Вот еще пример: в каждом эритроците имеется всего около 150 молекул KNa -АТФазы (ионных насосов, создающих трансмембранную разность потенциалов). Обнаружить их удалось потому, что они встроены в цитоплазматическую мембрану, которую можно исследовать отдельно, удалив цитоплазму и тем самым сильно повысив их концентрацию. Если столько же каких-либо иных молекул находится в клетке в виде раствора, то обнаружить их крайне трудно (если вообще возможно), но, как будет показано ниже, они могут играть важную роль в регуляции функциональной деятельности клетки.

Описанный разностный механизм допускает возможность регуляции скорости синтеза нужных клетке молекул, а значит и их концентрации, в цитоплазме. При этом возможна как плавная регуляция, так и скачкообразная (по принципу "да-нет"). Рассмотрим сперва плавную регуляцию. Как уже говорилось, в каждой клетке есть пара ферментов, конкурирующих за общий субстрат, синтезируемый третьим ферментом. Обозначим через Φ_I фермент, синтезирующий вещество I и через Φ_K – фермент, синтезирующий вещество K . Поскольку скорость синтеза субстрата этой пары ферментов не зависит от их собственной активности, даже небольшое изменение активности (или концентрации) одного из них может вызвать заметное изменение разности скоростей синтеза, а значит, и разности концентраций веществ I и K .

Допустим, например, что в данной клетке скорость синтеза вещества K составляла 80% от скорости синтеза I и что эта скорость снизилась еще на 10%. Тогда при тех же величинах параметров, которые были приняты при вычислении кривых рис. 2, получится, что разность скоростей синтеза веществ K и I возрастет на 40% от своей величины. То же получится, если скорость синтеза I останется неизменной, но возрастет скорость синтеза K . Если K влияло на считывание информации, необходимой для синтеза некоторого гормона, то на столько же процентов увеличится и скорость его синтеза. Молекулы гормона вскоре после синтеза покидают клетку, молекулы, вызвавшие возрастание разности скоростей синтеза K и I , остаются в ней долго и все это время синтез гормона идет с повышенной скоростью. Внешне это выглядит так, как будто многие молекулы поступившего в клетку вещества синтезировали огромное количество молекул гормона. А нужно этих регулирующих молекул действительно очень немного. Так, если они действуют непосредственно на фермент, изменяя его активность, их надо

раз в десять меньше, чем молекул фермента. Если же они действуют на хромосому, например, приоткрывая на некоторое время локус, содержащий информацию, необходимую для синтеза вещества, влияющего на активность фермента, то их требуется еще гораздо меньше. Все это показывает, что при описанном разностном механизме специализации клеток, в регуляции их функциональной деятельности могут играть важную роль молекулы, имеющиеся в клетке в ничтожных количествах. Это могут быть, в частности, белки, информация о которых записана в тех двух третях локусов, которые пока считаются избыточными.

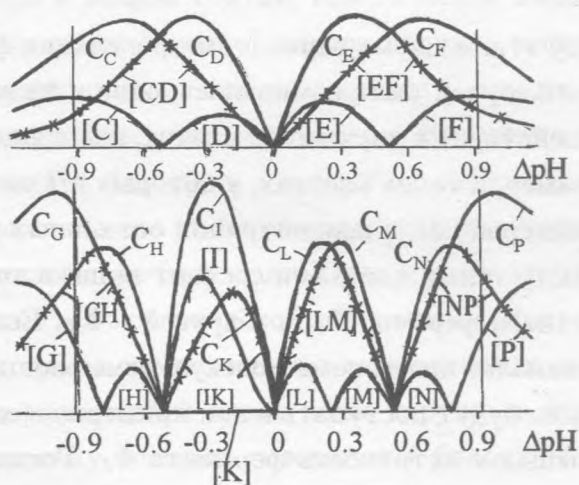


Рис. 3. Вторая и третья стадии дискриминации по pH в случае, когда активность фермента, синтезирующего вещество I, увеличилась в 2 раза (по сравнению с рис. 2) при неизменной активности всех остальных ферментов. Видно, что свободные молекулы K практически исчезли.

Регуляция по принципу "да-нет" тоже естественно получается при разностном механизме специализации. Так, если клетка, в среднем, находится в таких условиях, когда активности обоих конкурирующих ферментов одинаковы, а значит, одинаковы и скорости синтеза веществ I и K, то в ее цитоплазме почти нет свободных молекул I и K, ибо они быстро соединяются друг с другом, образуя молекулы IK. Поэтому и соответствующие гормоны в ней почти не синтезируются. Но достаточно условиям немного измениться (например, величине pH измениться на несколько сотых), как активности этих ферментов перестанут быть одинаковыми, в клетке появится избыток молекул I или K и начнется синтез соответствующего гормона. Если условия изменятся в проти-

в противоположную сторону, то в той же клетке начнется синтез другого гормона. Вместо pH может изменяться соотношение концентраций каких-либо двух макроэргов или иных молекул. В любом случае внешне это будет выглядеть как переключение клетки с синтеза одного гормона на синтез другого. Такие пары гормонов-антагонистов известны. Например, поджелудочная железа выделяет либо инсулин, либо глюкагон. Веществом, вызывающим переключение, здесь, по-видимому, служит глюкоза. Когда ее в крови много, то в норме выделяется инсулин, способствующий поглощению глюкозы клетками тканей, а когда ее мало, то выделяется глюкагон, способствующий поступлению глюкозы из печени.

Вообще говоря, между этими двумя вариантами регуляции функции клетки нет резкой границы. Действительно, как уже упоминалось, одна и та же пара конкурирующих за субстрат ферментов действует в двух видах клеток, находящихся, так сказать, в "соседних" условиях. Например, в таких клетках, у которых pH цитоплазмы принадлежит соседним допустимым интервалам, а концентрации остальных регулирующих веществ одинаковы. Разница между этими клетками состоит лишь в том, что в клетках одной специализации более активен фермент Φ_I , а в другой – Φ_K . Если эти клетки не имеют особых рецепторов или каналов для приема молекул, изменяющих активность этих ферментов, то такие молекулы будут поступать в них примерно в одинаковых количествах. Допустим, что они повышают активность фермента Φ_I . Тогда она повысится в клетках и той и другой специализации и может случиться, что в клетках, где активность Φ_I была меньше активности Φ_K , она станет больше нее. Тогда клетки той и другой специализации начнут синтезировать один и тот же гормон, а его антагонист не будет синтезироваться ни в той, ни в другой. Разница с предыдущим случаем здесь лишь в том, что при увеличении активности Φ_I концентрация молекул K убывает постепенно, значит, постепенно убывает и скорость синтеза соответствующего гормона, т.е. для полного переключения требуется достаточно сильное воздействие. Поскольку в то время, когда клетка синтезирует "не свой" гормон, в ней накапливаются соответствующие (тоже "не свои") ферменты, для обратного переключения требуется еще более сильное воздействие.

До сих пор речь шла о положительной обратной связи (через считывание информации с ДНК), обеспечивающей специализацию клеток. Но получив "специальность", клетка должна ее сохранить. Для этого необходима стабилизация состава цитоплазмы (гомеостаз), а для всякой стабилизации требуется отрицательная обратная связь. В описанном механизме специализации она осуществляется через концентрацию ма-

кроэргов. Повышение активности одного из ферментов увеличивает расход именно тех макроэргов, из которых этот фермент черпает энергию для синтеза. Их концентрация уменьшается, с ней падает и скорость возникновения синтезируемых им молекул и – через описанную выше цепочку положительной обратной связи – скорость синтеза самого фермента. Обе эти скорости приближаются к норме, хотя и остаются несколько повышенными, пока существует фактор, вызвавший повышение активности фермента.

Остается ответить на главный вопрос – откуда клетки "знают", что им "начертано судьбой" – стать ли клетками печени, легких, сетчатки глаза, или еще какими-нибудь? Поскольку, как отмечено в начале статьи, генетическая информация во всех клетках одинакова, сведения о будущей "судьбе" клеток должны поступать извне. Они поступают благодаря взаимодействию клеток, в частности, при их соприкосновении друг с другом. При развитии зародыша многоклеточного организма клетки сначала все одинаковы, но только на стадии бластулы – пузырька, состоящего из одного слоя клеток. В таком пузырьке условия обмена молекулами между цитоплазмой и окружающей средой у всех клеток одинаковы, потому одинаковы и сами клетки. Но такой тонкостенный пузырек легко поддается механической деформации. Например, если осмолярность окружающей бластулу среды немного выше осмолярности находящегося внутри нее раствора, возникает диффузионный поток воды наружу и внутренний объем начинает уменьшаться. А поскольку площадь поверхности бластулы остается неизменной, то часть ее неизбежно вдавливается внутрь и бластула принимает форму продырявленного мячика. Так начинается ее превращение в гастролу. Причина возникновения разности осмолярностей заключается в том, что питательные вещества из раствора, оказавшегося внутри пузырька, поглощаются клетками его стенок точно так же, как и из раствора, находящегося снаружи. Но снаружи их концентрация поддерживается благодаря диффузии, а внутри она непрерывно убывает. Возникающие же при их окислении молекулы CO_2 не являются осмотическими частицами (в ионы HCO_3^- они превращаются очень медленно).

Как только вогнутость возникла, клетки, оказавшиеся на вогнутой части бывшей бластулы, попадают в несколько иные условия диффузионного обмена с окружающей средой – к ним поступает меньше питательных веществ и кислорода и от них медленнее удаляются возникающие при окислительных процессах ионы водорода. Цитоплазма этих клеток закисляется. Поскольку разница в условиях диффузии увеличивается по мере превращения бластулы в гастролу, возрастает и закисление цитоплазмы, причем она закисляется сильнее всего у клеток, наиболее глубоко продвинувшихся внутрь

пузырька. Заметим, что когда образование гастролы заканчивается, т.е. эти клетки начинают соприкасаться со слоем наружных клеток, в гастрале начинает образовываться нервная пластинка (зародыш головного мозга), причем она образуется как раз в том месте, где соприкоснулись оба клеточных слоя. Этот пример показывает, насколько важны внешние условия, и, в частности, контакт между клетками, для начала их дифференциации.

Количественной стороны дела мы намеренно почти не рассматривали, ибо неизвестны численные значения почти всех необходимых для расчетов параметров. Неизвестно даже, какой из возможных вариантов описанного механизма специализации работает в каждом конкретном случае. Однако, можно утверждать, что предложенный механизм обеспечивает не только разнообразие специализированных клеток, но и возможность регуляции скоростей синтеза ими гормонов, а также позволяет стабилизировать состав их цитоплазмы.

Косвенным подтверждением существования разностного механизма специализации клеток служит то, что эволюция не пошла по пути выбора "наилучшего" вида молекул с макроэргическими связями, а оставила в работе более десятка видов молекул. Для обеспечения энергетики клетки хватило бы и одного – двух видов, а для получения двух сотен "специальностей" требуется как раз десяток.

По всей вероятности, примитивный разностный механизм работает и у простейших, но у них он служит для быстрого переключения с одного энергетического субстрата на другой при резком изменении их концентрации в окружающей среде.

Заметим в заключение, что все высказанное здесь – пока лишь идея, принцип действия, а выяснить то, как именно он действует в том или ином случае, могут только физиологи и биохимики.

Я благодарен А. Р. Зарицкому за конструктивную критику и весьма полезные советы.

Поступила в редакцию 19 января 1999 г.